

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Farmacología



## TESIS DOCTORAL

**Evaluación de la actividad neuroprotectora de quinonas y piridazinas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Andrea Ortega Mardones**

Directores

Paloma Bermejo Bescós  
Sagrario Martín-Aragón  
Aurelio G. Csáky

**Madrid, 2015**

**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Farmacia**  
**Departamento de Farmacología**



**Evaluación de la actividad neuroprotectora  
de quinonas y piridazinas**

Memoria para optar al Grado de Doctor presentada por:

**Andrea Ortega Mardones**

Madrid, 2015



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación de la actividad neuroprotectora  
de quinonas y piridazinas**

**Andrea Ortega Mardones  
Facultad de Farmacia  
Universidad Complutense de Madrid  
2015**



# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

## Facultad de Farmacia

La Dra. Paloma Bermejo Bescós y la Dra. Sagrario Martín-Aragón, ambas del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia, y el Dr. Aurelio G. Csáky del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de C.C. Químicas,

### CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "*Evaluación de la actividad neuroprotectora de quinonas y piridazinas*" realizada por D.<sup>a</sup> Andrea Ortega Mardones bajo su dirección, reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos se firma la presente en Madrid, a 25 de abril de 2015.

D.<sup>a</sup> Paloma Bermejo

D.<sup>a</sup> Sagrario Martín-Aragón

D. Aurelio G. Csáky



## *Agradecimientos*

Esta Tesis Doctoral no hubiera podido ser posible sin la ayuda de muchas personas e instituciones a las que he tenido la suerte de conocer y con las que he trabajado durante estos años. Me siento privilegiada porque siempre hubo alguien que creyó en mí, que me apoyó o que me enseñó a sobrellevar dificultades, de quien aprendí, o quien me cerró puertas y con ello encontré un mejor camino; con quien reí y con quien lloré.

A todos, ¡mil gracias! El desarrollo de este estudio ha sido un gran reto conseguido y a la vez una experiencia muy enriquecedora. Quiero expresar, a continuación, mi más sincero agradecimiento a diversas personas e instituciones.

En primer lugar, mi gratitud se dirige a mis directores de tesis:

A la Dra. Sagrario Martín-Aragón, por su incalculable colaboración y paciencia. Por su constante apoyo para la realización y finalización de este trabajo de investigación, como también por sus conocimientos aportados, porque con su ayuda, este trabajo ha llegado a buen puerto.

A la Dra. Paloma Bermejo Bescós, por su apoyo constante, su inestimable consejo y experiencia. Quisiera agradecerle su estrecha colaboración en muchas de las tareas realizadas, así como su completa disposición a resolver cualquier duda o problema que surgía en el día a día.

Al Dr. Aurelio G. Csáky, por creer desde el primer momento en este proyecto, facilitando en todo lo posible su buen desarrollo y mostrando siempre una actitud colaboradora excepcional con sus excelentes consejos y revisiones.

A Karim Jiménez Aliaga, por ayudarme y acompañarme desde mis primeros días en el laboratorio. A Ángela Rincón y a Silvia Roscales, por ayudarme y por guiarme en el mundo de la Química.

A todos mis compañeros del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid: a Irene Cuadrado, a Ana López, a Miguel Vázquez, a Nicolò Bonora, a Vanesa Carmona y a Ahmed Anis Shiha, por su colaboración y todos los buenos momentos compartidos con ellos. A mis amigos, a pesar del poco tiempo compartido, a Laura González, a Ángela Rincón, a Juan Carlos Ortega y a Jorge Santos; conocerlos ha sido todo un

regalo y, ahora que me alejo, espero que ni el tiempo ni la distancia puedan con el cariño. Nos vemos pronto en Chile o en España.

A todas las personas del Departamento de Farmacología, por su simpatía, acogida y colaboración y, porque me han hecho sentir como en casa.

A todos los miembros de mi familia, que constituyen el pilar fundamental de mi vida, que aun estando distantes, siempre me hacen sentir acompañada. Especialmente a mi madre, Sonia Mardones, que es mi principal apoyo.

A mis amigos, los que me acompañan desde Chile, a los que siempre siento muy de cerca, a Estela Morales, a Marioly Tapia y a Francisco de la Fuente y, en especial, a Paulina Gajardo y a Cristián Aguilar, quienes ya forman parte de mi familia, pues compartí con ellos momentos tan difíciles y me dieron la fortaleza para continuar.

A todos los académicos del Departamento de Farmacia de la Universidad Católica del Norte, gracias por distribuirse mi carga académica, pues sin ustedes no hubiera tenido la autorización para realizar este doctorado.

A continuación, dirijo mi agradecimiento a las instituciones que han financiado mis estudios de Doctorado.

A la Universidad Católica del Norte, en Chile, por otorgarme la beca de perfeccionamiento Académico y con ello darme la oportunidad de realizar este doctorado.

Al Programa MECESUP del Gobierno de Chile por otorgarme una Beca de Doctorado para Académicos en el Extranjero, actividad enmarcada en el desarrollo del Proyecto UCN0604.

Finalmente, al Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN), a través del proyecto titulado "Nuevos métodos catalíticos de síntesis estereoselectiva basados en el empleo de ácidos borónicos. Evaluación de la actividad neuroprotectora de los productos resultantes."





# ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Summary.....	3
<b>1. Introducción y objetivos del estudio.....</b>	<b>11</b>
1.1. Introducción y justificación.....	13
1.2. Objetivos del estudio.....	15
<b>2. Enfermedad de Alzheimer y dianas farmacológicas.....</b>	<b>17</b>
2.1. Enfermedad de Alzheimer.....	19
2.1.1. Teoría amiloidogénica.....	20
2.1.2. Estrés oxidativo.....	21
2.1.3. Neuroinflamación y activación microglial.....	23
2.2. Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.....	26
2.2.1. Inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE).....	26
2.2.2. Prevención de la excitotoxicidad glutamatérgica.....	27
2.2.3. Modulación de la producción de $\beta$ A.....	28
2.2.4. Inhibición de la agregación de $\beta$ A.....	30
2.2.5. Aumento del aclaramiento de $\beta$ A.....	31
2.2.6. Inmunoterapia.....	32
2.2.7. Antiinflamatorios.....	35
2.2.8. Estrategias dirigidas a la patología tau.....	37
2.2.9. Estrategias dirigidas a APOE.....	38
2.2.10. Función metabólica y función cognitiva.....	39
2.2.11. Factor de crecimiento nervioso.....	41
2.2.12. Regulación de la función serotoninérgica.....	41
2.2.13. Restauración de la LTP y la plasticidad sináptica.....	42
2.2.14. Agentes neurotróficos.....	42
<b>3. Naftoquinonas. Interés farmacológico.....</b>	<b>45</b>
3.1. Naftoquinonas. Estructura, distribución y actividades biológicas.....	47
3.2. Naftoquinonas. Potencial actividad neuroprotectora.....	49
<b>4. Piridazinonas y piridazinas. Interés farmacológico.....</b>	<b>53</b>
4.1. Piridazinonas.....	55
4.2. Piridazinas.....	60
<b>5. Metodología.....</b>	<b>67</b>
5.1. Determinación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE).....	69
5.2. Determinación de la actividad $\beta$ -secretasa.....	71

5.3. Determinación de la actividad $\gamma$ -secretasa.....	73
5.4. Fibrilogénesis <i>in vitro</i> del péptido $\beta$ -amiloide.....	77
5.4.1. Evaluación cualitativa. Microscopía electrónica de transmisión.....	79
5.4.2. Evaluación cuantitativa. Ensayo fluorimétrico.....	81
5.5. Línea celular SH-SY5Y.....	84
5.6. Línea celular APPswe.....	85
5.6.1. Determinación de la viabilidad celular.....	86
5.6.2. Generación intracelular de radicales libres.....	87
5.7. Línea celular BV2.....	88
<b>6. Resultados y Discusión. Naftoquinonas.....</b>	<b>91</b>
6.1. Síntesis Química.....	93
6.2. Viabilidad celular.....	95
6.3. Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE).....	96
6.4. Actividad inhibitoria de $\beta$ -secretasa.....	98
6.5. Fibrilogénesis del péptido $\beta$ -amiloide.....	101
6.5.1. Evaluación cualitativa. Microscopía electrónica.....	101
6.5.2. Evaluación cuantitativa. Espectroscopía de fluorescencia.....	103
6.6. Actividad inhibitoria de la liberación de óxido nítrico.....	109
<b>7. Resultados y Discusión. Piridazinonas y piridazinas.....</b>	<b>117</b>
7.1. Síntesis Química.....	119
7.2. Viabilidad celular.....	121
7.3. Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE).....	123
7.4. Actividad inhibitoria de $\beta$ -secretasa.....	126
7.5. Actividad inhibitoria de $\gamma$ -secretasa.....	129
7.6. Fibrilogénesis del péptido $\beta$ -amiloide.....	133
7.7. Actividad de los compuestos en modelos celulares de toxicidad celular.....	136
7.7.1 Inhibición de la generación intracelular de radicales libres.....	137
7.8. Actividad inhibitoria de la liberación de óxido nítrico.....	142
7.9. Evaluación conjunta de la actividad farmacológica por familia de compuesto.....	147
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>153</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>157</b>

## ABREVIATURAS

AChE	<i>Acetylcholinesterase</i> (Acetilcolinesterasa)
AINEs	Antinflamatorios no esteroídicos
APOE	Apolipoproteína E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (Proteína precursora de amilode)
APP <sub>swe</sub>	APP humana portadora de la mutación sueca
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i> (Activador del factor de transcripción 4)
ATPZ	Aminotienopiridazinas
βA	β-amiloide
BACE1	<i>β-Site APP-Cleaving Enzyme1</i> (enzima de escisión de APP1 en el sitio β)
BuChE	<i>Butyrylcholinesterase</i> (butirilcolinesterasa)
CaMK II	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II</i> (quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II)
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50
COX-1-(2)	Ciclooxigenasa-1-(2)
CR1	Receptor del complemento 1
DABCYL	Ácido 4-(4-dimetilamin-fenil-azo) benzoico
DAPK	<i>Death associated protein kinase</i> (Proteína quinasa asociada a muerte)
DNP	2,4-dinitrofenil
dppben	1,2-difenilfosfanilbenceno
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAAT2	<i>Excitatory aminoacid transporter 2</i> (Transportador de aminoácidos excitatorios 2)
EDANS	ácido 5-(2-aminoetilamino)naftaleno-1-sulfónico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicolicotetraacético
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EM	Esclerosis múltiple
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agencia Europea del Medicamento)
EP	Enfermedad de Parkinson
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> (transferencia de energía de resonancia fluorescente)
GABA	Ácido γ-aminobutírico
DCF	Diclorofluoresceína
H <sub>2</sub> DCFDA	Diacetato de diclorofluoresceína
HD	Enfermedad de Huntington
HMG-CoA	Hidroxi-metil-glutaril CoA
HSP90	Heat shock protein 90 (Proteína de choque térmico 90)
IACHe	Inhibidor de acetilcolinesterasa
IL-1	interleucina 1
INFγ	interferón gamma
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
LCR	Líquido cefaloraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
LTP	<i>Long term potentiation</i> (Potenciación a largo plazo)
MAO	Monoamino oxidasa

MDR	<i>Multi-drug resistance</i> (Resistencia a múltiples fármacos)
MTDLs	<i>Multi-targeted-directed ligands</i>
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NGF	<i>Neural growth factor</i> (Factor de crecimiento neuronal)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido nítrico)
NOS-2	Óxido nítrico sintasa-2
NQTrp	1,4-naftoquinon-2-L-triptófano-il
OGDH	2-oxoglutarato deshidrogenasa mitocondrial
OGDHC	2-oxoglutarato deshidrogenasa mitocondrial cerebral
PAI-1	Activador del plasminógeno
PDE	Fosfodiesterasa
Pen-2	Presenilin enhancer 2
PGE2	Prostaglandina E2
P-gp	Glicoproteína P
Pin1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
PKC	Proteín quinasa C
PPAR $\gamma$	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas $\gamma$
PSD 95	Proteína de densidad postsináptica 95
R <sup>2</sup> B(OH) <sub>2</sub>	Ácidos arilborónicos
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> (Especies reactivas de nitrógeno)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Especies reactivas de oxígeno)
S100B	Sinaptofisina
sAPP $\alpha$	Fragmento $\alpha$ extracelular soluble de APP
SNC	Sistema nervioso central
TCSPC	Time-Correlated Single-Photon Counting (Contaje de fotones individuales correlacionados en el tiempo)
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math>1</i> (Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1)
TMN	2,3,6-trimetil-1,4-naftoquinona
TNB	5-tio-2-nitro-benzoato
TNF $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> (Factor de necrosis tumoral $\alpha$ )
(R <sup>1</sup> B(OH) <sub>2</sub> )	Ácidos borónicos
4-HNE	4-Hidroxinonenal
5-LOX	5-lipoxigenasa

## SUMMARY

### Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia. The pathology of AD is characterized by the formation of extracellular plaques formed by the  $\beta$ -amyloid peptide ( $\beta$ A), intracellular neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein and the presence of chronic neuroinflammation which cause gradual decline of memory and cognitive functions. The hypothesis of the "amyloid cascade" establishes that oligomerization and fibrillation of  $\beta$ A could be the triggering event of the biochemical processes which leads to neuronal death and as a result, to cognitive impairment.

Several of the current therapeutic strategies in AD aimed at decreasing the formation and accumulation of  $\beta$ A. However, a simultaneous approach of several pharmacological targets as responsible for the disease is, *a priori*, a more effective approach for drug designing. These new strategies have been known under the name of "multitargeted therapies." Multitargeted drug development is one of the most promising approaches currently being investigated for the therapy of complex multifactorial diseases, such as AD. The search for privileged structures which are able to give ligands for more than one "pharmacological" target led us to an interest in two families of compounds: 1,4-naphthoquinones and pyridazines.

Naphthoquinones are pigments widely distributed in nature. Neuroprotective effects have been reported for the 1,4-naphthoquinone which may be explained by different mechanisms, such as activation of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ , Nrf2/ARE pathway activation, inhibition of Hsp90, competitive inhibition of MAO-B, PDE3 inhibition, inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS), inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2), and reduction of proinflammatory mediator release.

On the other hand, molecules with pyridazinone structure exhibit a wide spectrum of biological activities, and among the mechanisms responsible for their neuroprotective effects are inhibiting COX-2, acetylcholinesterase (AChE) and p38 MAP kinase. Besides, several activities which have been described for pyridazine structures are related to drug targets involved in AD, highlighting the inhibition of AChE, inhibition of COX-2, modulation of  $\gamma$ -secretase activity, inhibition of tau aggregation and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), inhibition of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production and iNOS, inhibition of superoxide anion radical and lipid peroxidation *in vitro*, among themselves.

## Objectives

This work intends to search for new molecules of low molecular weight and of moderate polar nature, in order to submit simultaneous activities of the several processes involved in the development of AD. In short, this work aims to search for new compounds capable of inhibiting AChE,  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase activities, inhibiting  $\beta$ A peptide fibrillogenesis, and attenuating intracellular generation of free radicals and nitric oxide release as a result of microglial activation.

## Methodology

Different non-commercial naphthoquinones were synthesized by either conventional methods described in the literature or by direct arylation using boronic acids and dicationic catalysis with Pd(II) complexes, as previously developed and described by our research group.

In the synthesis of pyridazines, 3-aryloxoglutarates **1** were obtained as intermediates by conjugate addition with a Pd(II) catalyst. From them, the reaction with hydrazines led to the dihydropyridazines **2**, which after their aromatization resulted in pyridazinones **3**. Treatment of the latter ones with phosphorus oxychloride provided chloropyridazines **4**, which were transformed into pyridazines **5** with boronic acids using the Suzuki reaction.

The determination of viability in neuroblastoma cell lines under the influence of the synthesized compounds was performed by the reduction of bromide 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan by mitochondrial dehydrogenases.

Acetylcholinesterase activity *in vitro* was determined spectrophotometrically from acetylthiocholine degradation and the reaction of thiocholine with 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid (Ellman's reagent) to give 5-thio-2-nitro-benzoate as an indicator of the amount of degraded acetylthiocholine.

The detection of potential inhibitors of secretases ( $\beta$ -secretase,  $\gamma$ -secretase) was based on the cleavage of a specific fluorogenic peptide to result in a fluorescent signal. The intensity of the fluorimetric signal is proportional to the degree of hydrolysis of the peptide substrate, and therefore, to the secretase activity.

The assessment of the test compounds in the process of  $\beta$ A fibrillogenesis was both qualitative and quantitative. In both cases, a simplified model of fibrillogenesis *in vitro* was used from the incubation of a solution of a commercial monomer  $\beta$ -amyloid peptide (25-35) at 37°C for 96 hours. The qualitative evaluation was carried out by transmission electron microscopy. The

quantitative evaluation was performed using both fluorescence spectroscopy of time-resolved phase and stationary phase. Single photon counting temporally correlated was used for measurements of time-resolved fluorescence. The sample is excited by a short pulse of laser light and the fluorescent response detected in function of time is recorded. The half-live time of fluorescence obtained allowed quantifying the activity of compounds in terms of both  $\beta$ A aggregation inhibition and  $\beta$ A disaggregation.

The influence of test compounds in the regulation of the inflammatory response was assessed in two models of cellular toxicity: a) generation of intracellular free radicals in an APPswe neuroblastoma cell line by treatment with hydrogen peroxide; and b) release of nitric oxide from the BV2 microglia cell line by treatment and activation with interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ).

## Results and discussion

For the analysis of our test compounds on the events related to amyloidogenesis, the determination of cell viability in an APPswe neuroblastoma cell line under the influence of the compounds was the first evaluation performed in order to establish a concentration range without cellular toxicity.

Compounds with 1,4-naphthoquinone structure exhibited a significant AChE inhibitory activity showing an  $IC_{50}$  value lower than 32  $\mu$ M, concentration which was not cytotoxic in the viability assay. Among them, compounds **9**, **21** and **24** were particularly interesting. Compound **9** has a bromine atom in position 2 of the skeleton 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone. Replacing the hydroxy group on C-5 of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone by an acetoxy group resulted in lower activity, but replacing the hydroxyl group on C-5 by a nitro group resulted in the most active compound of the 1,4-naphthoquinone series.

In determining the inhibition of  $\beta$ -secretase activity *in vitro*, most of the 1,4-naphthoquinones provided an  $IC_{50}$  value lower than 10  $\mu$ M, concentration which was not cytotoxic in the viability assay. It was observed that 1,4-naphthoquinone did not show inhibitory effect, however, the presence of various substituents significantly increased the inhibition of  $\beta$ -secretase. The presence of a phenyl as a substituent at C-2 increased the inhibitory activity of  $\beta$ -secretase. Substitution in the 1,4-naphthoquinone ring with hydroxyl groups at C-2 or C-5 rendered active compounds.

In the qualitative assessment of the *in vitro* fibrillogenesis by electronic microscopy, the incubation of the monomer  $\beta$ A (37°C, 96 h) in the absence of 1,4-naphthoquinones rendered micrographs displaying  $\beta$ A deposits, fiber shaped, in bundles, unbranched, straight and of rigid aspect and of variable length and a diameter in the order of 75-120 Å. In contrast, in the presence of some of the 1,4-naphthoquinones (**1**, **4**, **8**, **19** and **24**) the micrographs showed insoluble particles of

variable size of the amyloid microaggregates, not filamentous, indicating different degrees of inhibition of the *in vitro* fibrillogenesis process.

In the quantitative assessment of the *in vitro* fibrillogenesis process, analyzing the account probability histograms of the samples tested, thioflavin T- $\beta$ A (10 mM) versus thioflavin T- $\beta$ A-1,4-naphthoquinone, we observed that the longest fluorescence half-life time of the product corresponded to the incubated  $\beta$ A peptide in the absence of potentially inhibitory compounds, accounting for a 100% of fibrillar aggregation. Instead, the incubation of the  $\beta$ A peptide in the presence of increasing concentrations of various 1,4-naphthoquinones caused a decrease in the average of the fluorescence half-life time of thioflavin T, approaching the instrumental response at the highest concentration (10  $\mu$ M) of the tested 1,4-naphthoquinone. It was observed that some of the 1,4-naphthoquinones which had shown  $\beta$ -secretase inhibition could also inhibit  $\beta$ A peptide aggregation and/or be capable of disaggregating pre-formed  $\beta$ A fibrils. Compounds **4** and **8** had the lowest IC<sub>50</sub> values in the inhibition of  $\beta$ A aggregation. As for disaggregating  $\beta$ A fibrils, compounds **4** and **9** presented the lowest IC<sub>50</sub> values.

The 1,4-naphthoquinone, which had not shown any significant inhibition of  $\beta$ -secretase, instead, inhibited  $\beta$ A aggregation and was capable of disaggregating fibrils. Substitutions by a methyl, an aryl or a hydroxyl group at C-2 and dihalogenated derivatives led to compounds without activity on  $\beta$ A aggregation or disaggregation. The substitution on the C-5 by a hydroxyl or nitro group led to active compounds on both fibrillogenesis processes, however, methoxy substitution led to an active compound only in the disaggregation process. Compounds with bromo at C-2 and with a hydroxy group at C5 or C8 gave active compounds only on inhibiting  $\beta$ A aggregation. The 5-methoxy derivative, which had shown inhibitory activity of  $\beta$ -secretase, was only active on  $\beta$ A disaggregation. However, the substitution at C-3 in the *p*-hydroxyphenyl gave an active compound on both fibrillogenesis processes.

For the analysis of our test compounds on microglial activation, the determination of viability in the BV2 microglial cell line under the influence of the compounds was the first evaluation performed in order to establish a concentration range without cellular toxicity. All the 1,4-naphthoquinones, a concentration of 0.25  $\mu$ M, showed inhibition of nitric oxide release between a 13 and 52%. Compound **15** was the most active of the series possessing structural features as a skeleton of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone substituted at position 2 by a *p*-hydroxyphenyl group. Compound **16**, in which the hydroxy group in the phenyl ring of compound **15** is replaced by a methoxy group, showed

inhibition rates slightly lower. For compound **13**, lacking the hydroxyl group of the phenyl ring, the activity was lower.

As for the 3-aryloxoglutarates, pyridazinones and pyridazines, their capability to inhibit the *in vitro* AChE activity did not exceed a 30% of the control reaction, except for the compound **3a** which displayed a significant inhibitory AChE activity with an IC<sub>50</sub> value slightly lower than that shown by the reference compound galantamine. In this regard, it should be stressed the importance of the planarity and a conjugation system in the molecular structure, since the dihydropyridazinone **2** showed no significant activity. In contrast, the presence in the system of electron-accepting (**3b**, **3c**) or electron-donating substituents (**3d**) and alkylation of the endocyclic nitrogen atom (**3e**) did not improve the activity exhibited by the **3a**. In general, we may therefore discard the potential therapeutic utility of these chemical structures as AChE inhibitors.

Regarding the *in vitro* inhibition of the  $\beta$ -secretase activity, the 3-aryloxoglutarates showed significant inhibition of enzyme activity with respect to the control reaction in a concentration range of 10-100  $\mu$ M, highlighting compound **1d**. As for the dihydropyridazinones and pyridazinones, except compound **3a**, all exerted significant effects inhibiting the activity at a concentration of 10  $\mu$ M, highlighting the pyridazinone **3b**. Regarding the pyridazines, all showed significant inhibition of enzyme activity, being compound **4c** the most potent.

As for the target  $\gamma$ -secretase, 3-aryloxoglutarates showed an inhibition of the activity above 75% at the concentration of 100  $\mu$ M. Major inhibitory activities were observed for **1d** and **1e**. Regarding to the dihydropyridazinones and pyridazinones, only the compound **3a** displayed an inhibition higher than 50% of the control reaction at 100  $\mu$ M. Regarding the pyridazines, all compounds, except **4a** and **5b**, exceeded a 50% inhibition at 100  $\mu$ M, compound **5a** being the most potent.

On the *in vitro* fibrillogenesis process of  $\beta$ A, the 3-aryloxoglutarates did not show notable effects as none of the compounds exerted over a 40% inhibition of aggregation or a 30% disaggregation at the concentration of 10  $\mu$ M. Among the dihydropyridazinones and pyridazinones, all compounds significantly inhibited  $\beta$ A aggregation and displayed disaggregating activity. The highest percentages of inhibition were observed for compounds **2a**, **2c** and **3d**. The highest percentages of disaggregation were observed with compounds **2a** and **3a**. IC<sub>50</sub> values of the dihydropyridazinones **2** and pyridazinones **3** fluctuated between 6 and 8  $\mu$ M for the inhibition of the aggregation process, and about 8  $\mu$ M for the process of disaggregation. Among the pyridazines, none of the compounds exerted over a 40% inhibition of aggregation or a 30% disaggregation at the concentration of 10  $\mu$ M, being the best **4a** and **5b**. In short, among the pyridazinones and

pyridazines, compound **2a** was the only one which showed greater activity in inhibiting  $\beta$ A aggregation and disaggregating the pre-formed fibrils.

The treatment of APP<sup>swe</sup> neuroblastoma cells with the 3-aryloxoglutarates **1d** and **1e**, respectively, significantly reduced the generation of intracellular free radicals from hydrogen peroxide treatment. Both pyridazinones and dihydropyridazinones presented an effect that, in general, was concentration-dependent for all compounds and remained unaltered even at the concentration of 1  $\mu$ M. This antioxidant activity resulted much more remarkable for pyridazinones **3** and **4**. The behavior of pyridazinone **3d** was relevant, with an  $IC_{50}$  value of about 0,4  $\mu$ M. Among all compounds tested, pyridazines significantly decreased intracellular free radical generation from hydrogen peroxide treatment and this effect was concentration-dependent in the case of the compounds **4a**, **4c**, **5a** and **5c**, highlighting the pyridazine **4a** with an  $IC_{50}$  value of about 4  $\mu$ M.

Regarding attenuation the release of nitric oxide from microglial activation, most of the 3-aryloxoglutarates, pyridazinones and pyridazines had lower  $IC_{50}$  values than the compound used as reference (flurbiprofen). The 3-aryloxoglutarates with the highest activity were **1a** and **1d** showing similar  $IC_{50}$  values of approximately 300 nM, while compound **1e** showed a slightly higher value (400 nM). The  $IC_{50}$  values of dihydropyridazinones **2** and pyridazinones **3** were lower than those exhibited by the compounds **1**. The best results were obtained for compound **3a**. However, the presence in the system with electron withdrawing (**3b**, **3c**) or electron donating substituents (**3d**) and alkylation of the endocyclic nitrogen atom **3e** did not improved the activity exhibited by the **3a**. The best results for pyridazines were obtained with **4a** and **5a**, both replaced by non-functionalized phenyl group.

## Conclusions

In our study we have reported novel mechanisms of neuroprotection to those already described for some naphthoquinones, as it is the case of the plumbagin (2-methyl-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone). In this sense, it has been described that the Nrf2/ARE pathway activation by this naphthoquinone provides protection against oxidative damage due to the cell metabolism. To this mechanism, it should be added on one hand, the prevention/inhibition of the amyloidogenic processing of APP and, on the other hand, the inhibition of microglial activation in terms of nitric oxide release. As possible candidates for the development of drugs with therapeutic potential in Alzheimer's disease, we suggest to explore derivatives of 1,4-naphthoquinone, especially 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (**3**) and 3-(*p*-hydroxyphenyl)-5-methoxy-1,4-naphthoquinone (**19**) in other drug targets involved in this multifactorial pathology. Its activity *in vivo* would be favored because they are low molecular weight compounds, which is an advantage for its passage through the blood brain barrier.

To date, it has not yet been described pyridazinones nor even pyridazines with inhibitory activity of  $\beta$ -secretase. In view of our results and seeking to improve the activity demonstrated by the compounds under study, we could design a molecule of low molecular weight (<300 Da) from the core of oxoglutarate, pyridazinone or pyridazine, capable of crossing the brain barrier and certain conformational constraints to facilitate access to the active site of BACE.

In our study, although the influence of the structures of pyridazine in the fibrillogenesis process have not been notable, however we have demonstrated for the first time that pyridazinones and 3-aryloxoglutarates possess inhibitory effect on  $\beta$ A aggregation and disaggregating effect of pre-formed fibrils.

The magnitude of the inhibition of  $\gamma$ -secretase activity achieved with the three groups of molecules (aryloxoglutarates, pyridazinones and pyridazines) was moderate in the present work. In this line, it has been described a modulating activity of  $\gamma$ -secretase by different pyridazinones with fused five-membered heterocyclic rings. Thus, our present study compounds possess structures subjective to promising chemical optimization which could probably lead to new  $\gamma$ -secretase modulators with low toxicity and able to cross the blood brain barrier.

Moreover, regarding to the release of nitric oxide, most of the 3-aryloxoglutarates, pyridazinones and pyridazines studied had lower  $CI_{50}$  than the compound used as a positive control (flurbiprofen), indicating a potential anti-inflammatory activity that could be responsible for potential neuroprotective effect.

As possible candidates for the development of drugs with therapeutic potential in Alzheimer's disease, it is proposed that the 3-aryloxoglutarate derivatives **1d** and **1e**, all the pyridazinone derivatives, especially the compound **3a**, and all pyridazines derivatives, especially the compound **4c**, could be explored in other drug targets related to AD. Furthermore, these data suggest that the preparation of new derivatives from these types of compounds could result in interesting molecules for the development of multitarget drugs for AD.



## **1. Justificación y objetivos del estudio**



## 1.1. Introducción y justificación

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de un 50-60% de los casos de la demencia. La patología de la EA se caracteriza por la formación de placas extracelulares constituidas por el péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), los Ovillos neurofibrilares (Neurofibrillary Tangles, intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada y la presencia de neuroinflamación crónica que causa deterioro progresivo de la memoria y las funciones cognitivas.<sup>1</sup>

Las estrategias terapéuticas actuales para mejorar el déficit de la memoria tienen por objeto evitar la formación y acumulación de  $\beta$ A y la fosforilación de tau. Más allá de estas dianas, otros aspectos de la fisiopatología de la EA, como el daño oxidativo y la inflamación, pueden también ser objetivos de la terapéutica con el fin de frenar la progresión de la pérdida de memoria.<sup>2</sup>

La metodología tradicional en el desarrollo de un nuevo fármaco consiste en identificar una proteína diana (con función enzimática, de receptor, etc.) que esté involucrada en un determinado proceso fisiológico, y diseñar un ligando capaz de interactuar con la misma bloqueando o potenciando dicho proceso. Esta aproximación, un tanto reduccionista, de “una patología, una diana terapéutica” sigue estando vigente. Sin embargo, existen enfermedades complejas como la EA, cuyo carácter multifactorial representa una limitación en el diseño de fármacos efectivos en su prevención y/o tratamiento. Así pues, como consecuencia de la compleja interrelación entre las distintas hipótesis que se han propuesto como contribuyentes a esta patología, el uso de terapias destinadas sólo al abordaje selectivo de una de las posibles causas de la enfermedad no parece resultar demasiado adecuado para revertir la degeneración neuronal. Por el contrario, el abordaje simultáneo de varias de las dianas farmacológicas reconocidas hoy en día como responsables con la enfermedad constituye una aproximación *a priori* más eficaz para el diseño de fármacos de nueva generación. Estas nuevas estrategias se han documentado bajo el nombre de “terapias multidiana.” El desarrollo de fármacos multidiana constituye una de las aproximaciones modernas más prometedoras que se investiga en la actualidad para la terapia de patologías complejas multifactoriales, como la EA.

Se han desarrollado diferentes estrategias para conseguir terapias multidiana. La primera estrategia, la más convencional, consiste en el denominado *cóctel de fármacos*, ampliamente utilizada, por ejemplo, como terapia antirretroviral para el virus de la inmunodeficiencia humana

---

<sup>1</sup> Salomone, S.; Caraci, F.; Leggio, G.M.; Fedotova, J.; Drago, F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *73*, 504.

<sup>2</sup> Sodhi, R. K.; Singh, N.; Jaggi, A. S. Neuroprotective mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor agonists in Alzheimer's disease. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2011**, *384*, 115.

(VIH) y en terapias de cáncer. El riesgo de interacciones farmacológicas es el inconveniente principal de esta metodología.

El desarrollo de la combinación de diferentes fármacos como única formulación ha sido la segunda estrategia que se ha llevado a cabo. Las diferentes propiedades farmacocinéticas, metabólicas y de biodisponibilidad hacen que la combinación de principios activos no sea un problema trivial.

La última estrategia consiste en el diseño de una entidad molecular con polifarmacología selectiva. Este último tipo de compuestos presentarían una ventaja a la hora de su registro como medicamento. La aprobación de un único compuesto que actúe en diferentes dianas terapéuticas tendría menos barreras reglamentarias que la aprobación de la combinación de nuevos fármacos.<sup>3</sup> Tradicionalmente, el diseño de ligandos múltiples (DML, *multi-targeted-directed ligands*, MTDLs)<sup>4</sup> se ha basado en tres estrategias diferentes: anexión, unión y fusión. Una de las principales ventajas es su perfil farmacocinético y farmacodinámico propio, independiente de los compuestos por separado. Finalmente, la disminución de las interacciones farmacológicas mejora la eficacia y aumenta el perfil de seguridad de este tipo de moléculas (ligandos) duales. En la literatura han sido publicados diferentes compuestos con actividad dual.<sup>5</sup>

Como grupos de fármacos multidiana para la EA se han documentado fundamentalmente compuestos que combinan actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE) o butirilcolinesterasa (BuChE) con otras actividades relevantes, como la capacidad inhibitoria de  $\beta$ -secretasa, antiagregante del péptido  $\beta$ A, antioxidante, antihistamínica, antagonista del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, o quelante

---

<sup>3</sup> Hopkins, A. L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nature Chem. Biol.* **2008**, *4*, 682.

<sup>4</sup> Véase (revisiones recientes, 2013-2011): (a) Trippier, B. C.; Labby, K. J.; Hawker, D. D.; Mataka, J. J.; Silverman, R. B. Target- and mechanism-based therapeutics for neurodegenerative diseases: Strength in numbers. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3121. (b) Geldenhuys, W. J.; Van der Schyf, C. J. Designing drugs with multi-target activity: the next step in the treatment of neurodegenerative disorders. *Expert Opin. Drug Discov.* **2013**, *8*, 115. (c) Bajda, M.; Guzior, N.; Ignasik, M.; Malawska, B. Multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease treatment. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4949. (d) Rampa, A.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Bisi, A. Hybrid-based multi-target ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2716. (e) Bolognesi, M. L.; Simoni, e.; Rosini, M.; Minarini, A.; Tumiatti, V.; Melchiorre, C. Multitarget-directed ligands: innovative chemical probes and therapeutic tools against Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2797. Véase adicionalmente: (f) Zheng, H.; Fridkin, M.; Youdim, M. B. H. From antioxidant chelators to site-activated multi-target chelators targeting hypoxia inducing factor, beta-amyloid, acetylcholinesterase and monoamine oxidase A/B. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 364. (g) Egea, J. Rios, C. 1,8-Naphthyridine derivatives as cholinesterases inhibitors and cell Ca<sup>2+</sup> regulators, a multitarget strategy for Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2807. (h) León R.; Marco-Contelles, J. A step further towards multitarget drugs for Alzheimer and neuronal vascular diseases: targeting the cholinergic system, amyloid- $\beta$  aggregation and Ca<sup>(2+)</sup> dyshomeostasis. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 552.

<sup>5</sup> Constantino, L.; Barloco, D. Designed multiple ligands: basic research vs clinical outcomes. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3353.

de metales; combinación de actividad inhibidora de  $\beta$ -secretasa con capacidad quelante de metales; y combinación de actividad moduladora de  $\gamma$ -secretasa y de los receptores PPAR $\gamma$ .

Uno de los cuellos de botella fundamentales a la hora de desarrollar fármacos activos a nivel del sistema nervioso central reside en las propiedades farmacocinéticas. Muchos de los compuestos que se diseñan fallan en los ensayos clínicos debido a su baja penetrabilidad a través la barrera hematoencefálica. Este reto se vuelve de particular importancia en el caso de los fármacos multidiana, especialmente en aquellos que se han diseñado mediante anexión u unión de dos o más fármacos, debido a que tienden a ser compuestos grandes, más lipófilos y con mayor flexibilidad molecular en comparación con otros fármacos selectivos de menor tamaño. Los fármacos multidiana diseñados mediante fusión de moléculas pequeñas presentan mejores perspectivas a nivel farmacocinético *a priori*.

### 1.2. Objetivos del estudio

En la presente Memoria se pretende la búsqueda de nuevas moléculas de bajo peso molecular, con carácter moderadamente polar, que presenten actividad simultánea sobre varios de los procesos que participan en el desarrollo de la EA. Así pues, se buscan nuevos compuestos que al mismo tiempo sean capaces de inhibir la actividad de las enzimas AChE,  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, inhibir la fibrillogénesis del péptido  $\beta$ A, y atenuar la generación intracelular de radicales libres y la liberación de óxido nítrico (NO) microglial.

Para ello, hemos centrado nuestra atención en dos familias de moléculas diferentes, quinonas y piridazinas. La elección de estas moléculas no ha sido aleatoria. Por una parte, se recogen en la bibliografía ejemplos del empleo de quinonas y de piridazinas y sus derivados en el diseño de moléculas con actividad farmacológica frente a algunas de las dianas de interés relacionadas con la EA; por otra parte, ambos tipos de compuestos han sido reconocidos como *estructuras privilegiadas*, terminología originalmente propuesta por Evans<sup>6</sup> en alusión a aquellas arquitecturas moleculares identificadas a lo largo del tiempo por su capacidad de dar lugar a ligandos para más de una diana. Dentro de las distintas estrategias que pueden permitir el descubrimiento de nuevos fármacos, el uso de estructuras privilegiadas ha ganado una atención relevante con respecto a otras aproximaciones.

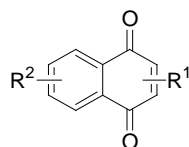
---

<sup>6</sup> Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; Di Pardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, S. L.; Lotti, V. J.; Cerino, D. J.; Chen, T. B. P. J. K.; Kunkel, K. A.; Springer, J. P.; Hirshfield, J. Methods for Drug Discovery: Development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235.

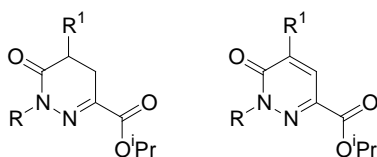
La hipótesis de partida de este trabajo radica en considerar que la adecuada funcionalización de estos esqueletos puede conducir a moléculas de tamaño pequeño, moderadamente lipófilas, capaces de actuar a modo de ligandos multidentada.

En concreto, se llevará a cabo la evaluación farmacológica de las series de compuestos que se recogen en la Figura 1. Los estudios de los compuestos de la Serie 1 se recogen en el Capítulo 1. Para mayor claridad expositiva, los estudios de los compuestos de las Series 2 y 3 se recogen conjuntamente en el Capítulo 2, ya que los compuestos de la Serie 2 (piridazinonas) han sido empleados como precursores sintéticos de los compuestos de la Serie 3 (piridazinas).

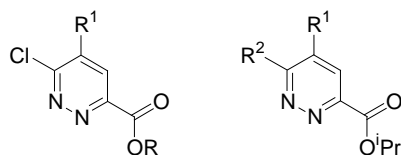
En el presente trabajo se han empleado numeraciones independientes para los compuestos del Capítulo 1 y para los del Capítulo 2.



Serie 1: Quinonas (Capítulo 1)



Serie 2: Piridazinonas (Capítulo 2)



Serie 3: Piridazinas (Capítulo 2)

Fig. 1. Estructura general de los compuestos objeto del presente estudio

## 2. Enfermedad de Alzheimer y dianas farmacológicas



## 2.1. Enfermedad de Alzheimer

La EA es la causa más frecuente de demencia, y se define como un trastorno neurodegenerativo que se asocia con una alteración global de las funciones mentales superiores y cuyo síntoma cardinal es la pérdida de memoria.<sup>7</sup> La manifestación clínica inicial es la alteración de la memoria de los sucesos recientes. Al progresar la enfermedad, se van afectando otras funciones cognitivas, como las habilidades verbal y visuoespacial. La disfunción cognitiva suele acompañarse de trastornos del comportamiento, como depresión, psicosis, agresión, agitación y trastornos del sueño. El establecimiento de la enfermedad es gradual pero imparable, y su lenta progresión conduce a trastornos de la función motora, y en último término a la muerte.<sup>8</sup>

La EA se conoce desde 1907, cuando el neurólogo alemán Alois Alzheimer la describió por primera vez, y aunque el conocimiento que se tiene actualmente de la enfermedad es muy extenso aún se desconoce la causa, y la opinión más general es que la EA tiene un origen multifactorial con predisposición genética.<sup>9</sup> Se estima que 35,6 millones de personas en todo el mundo la han padecido en el año 2010; y se calcula que esta cifra se convertirá en 277 millones en el año 2050, según el informe Mundial sobre el Alzheimer del año 2013 (*Alzheimer Disease International, ADI*).<sup>10</sup>

La EA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por atrofia cerebral y pérdida de neuronas y función sináptica, secundaria a la formación de ovillos neurofibrilares y placas de  $\beta$ A. En la actualidad no hay tratamientos curativos o terapias efectivas que modifiquen el curso de la enfermedad.<sup>11</sup>

Los rasgos microscópicos característicos de la patología están constituidos por las *placas de amiloide* extracelulares (placas seniles o agregados amiloides) formadas por depósitos amorfos de proteína que probablemente producen la atrofia neuronal característica de la enfermedad.<sup>12</sup> Glenner y colaboradores estudiaron la composición química de estos agregados distribuidos a lo largo del parénquima de los cerebros de pacientes con EA y hallaron que su componente mayoritario era un

---

<sup>7</sup> Lorenzo Fernández, P.; Lorenzo-Velázquez, B.; Moreno González, A.; Lizasoain Hernández, I.; Leza Cerro, J. C.; Moro Sanchez, M. A.; Portolés Pérez, A. *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª edición. Ed. Médica Panamericana, 2008.

<sup>8</sup> Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9, 387.

<sup>9</sup> Mount, C.; Downton C. Alzheimer disease: progress or profit? *Nat. Med.* 2006, 12, 780.

<sup>10</sup> Alzheimer Disease International (ADI) es la federación internacional de asociaciones de Alzheimer de todo el mundo, en las relaciones oficiales con la Organización Mundial de la Salud (OMS). Está integrada por cada una de las asociaciones de Alzheimer de cada país. Su objetivo es apoyar a las personas con demencia y a sus familias. ADI organiza una conferencia internacional anual sobre la demencia de la que deriva el Informe Internacional Anual sobre Alzheimer.

<sup>11</sup> Fan, L. Y.; Chiu, M. J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol. Taiwan* 2010, 19, 228.

<sup>12</sup> Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006, 368, 387.

pequeño péptido que se denominó péptido  $\beta$ A ( *$\beta$ -amyloid peptide*).<sup>13</sup> La secuenciación del péptido  $\beta$ A permitió aislar el gen que codificaba una proteína de mayor tamaño que contenía en su secuencia este péptido. La proteína se denominó “proteína precursora del péptido  $\beta$ A” (*Amyloid Precursor Protein, APP*).

### 2.1.1. Teoría amiloidogénica

Hoy día se sabe que la clave de la patogenia de la EA consiste en un procesamiento alterado de la APP.<sup>14</sup> La hipótesis de la “cascada amiloide” establece que la formación y agregación del péptido  $\beta$ A es el evento desencadenante de los procesos bioquímicos que desembocan en la muerte neuronal y el deterioro de las capacidades cognitivas de las personas que sufren EA.<sup>15</sup>

Con el progreso en el conocimiento de los cambios patológicos en la EA, la investigación se ha centrado en las alteraciones más específicas del procesamiento de APP en péptidos  $\beta$ A ( $\beta$ A 1-40 y  $\beta$ A 1-42) y en la importancia de los oligómeros de  $\beta$ A (pequeños agregados de 2-12 péptidos). Las isoformas se ven influenciadas por el patrón de hidrólisis de APP por acción de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas.

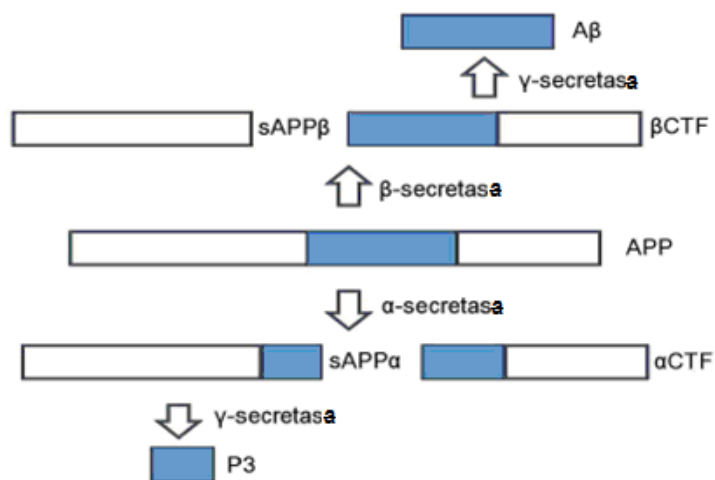


Fig. 2. Vías de procesamiento de APP<sup>16</sup>

<sup>13</sup> Glenner, G. G.; Wong, C. W.; Quaranta, V.; Eanes, ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl. Pathol.* **1984**, *2*, 357.

<sup>14</sup> Bossy-Wetzler, E.; Schwarzenbacher, R.; Lipton, S. A. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat. Med.* **2004**, *10* Suppl, S2.

<sup>15</sup> Oddo, S.; Caccamo, A.; Smith, I. F.; Green, K. N.; LaFerla, F. M. A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of  $A\beta$ . *Am. J. Pathol.* **2006**, *168*, 184.

<sup>16</sup> Sun, X. T., Jin, L.; Ling, P. X. Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug Discov. Ther.* **2012**, *6*, 285.

El procesamiento de APP puede seguir dos vías proteolíticas alternativas (Fig. 2). La vía "no amiloidogénica," la que prevalece en condiciones fisiológicas neuronales, transcurre con la acción del enzima  $\alpha$ -secretasa que escinde la proteína dentro de la secuencia correspondiente al  $\beta$ A, entre Lys687 y Leu688, liberando un fragmento  $\alpha$  extracelular soluble de APP de gran tamaño (~ 695 aa) que contiene la mayor parte del dominio extracelular. El fragmento  $\alpha$  extracelular soluble de APP (sAPP $\alpha$ ) se libera de las terminales presinápticas y esta liberación se incrementa en respuesta a la actividad eléctrica y a la activación de receptores muscarínicos de acetilcolina, lo que sugiere que la actividad neuronal incrementa el procesamiento de la APP mediante  $\alpha$ -secretasa.<sup>17</sup> Una segunda enzima, el complejo tetramérico enzimático  $\gamma$ -secretasa, corta por el final de la secuencia del  $\beta$ A produciendo el fragmento p3 que finalmente se degrada. En la vía "amiloidogénica" interviene, por un lado, el enzima  $\beta$ -secretasa (BACE1,  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme1), que constituye el paso limitante en la producción de  $\beta$ A, y que escinde la proteína APP por el extremo N-terminal de la secuencia del  $\beta$ A, y la  $\gamma$ -secretasa que escinde la proteína en el C-terminal de la secuencia del  $\beta$ -, cerca de la superficie celular. El punto de corte de  $\gamma$ -secretasa varía, dando lugar a péptidos de diferente longitud que oscila entre 39-42 aminoácidos, longitud que condicionará el comportamiento de agregación de dicho péptido. El péptido 1-42 de mayor longitud es el que posee mayor capacidad agregante y por tanto carácter patogénico.<sup>18</sup> A mayor longitud del péptido mayor capacidad agregante, y por tanto, mayor patogenicidad.

### 2.1.2. Estrés oxidativo

Por otro lado, un gran número de estudios revelan que el estrés oxidativo aumenta en cerebro y tejidos periféricos de pacientes con EA, así como en modelos animales de EA. Por ejemplo, se ha descrito un aumento de las mutaciones del ADN mitocondrial en cerebro de pacientes con EA, y un aumento de los marcadores de estrés oxidativo en la orina de pacientes con EA.<sup>19</sup>

El oxígeno es necesario para generar energía en las células aerobias, pero tiene el inconveniente de producir pequeñas cantidades de especies reactivas que pueden provocar lesiones en las macromoléculas. El estrés oxidativo se refiere a las consecuencias citopatológicas del desequilibrio entre la generación de radicales libres de oxígeno y la capacidad de la célula para

---

<sup>17</sup> Postina, R. J. Activation of  $\alpha$ -secretase cleavage. *Neurochem.* **2012**, *120*, 46.

<sup>18</sup> Luheshi, L. M.; Tartaglia, G. G.; Brorsson, A. C.; Pawar, A. P.; Watson, I. E.; Chiti, F.; Vendruscolo, M.; Lomas, D. A.; Dobson, C. M.; Crowther, D. C. Systematic in vivo analysis of the intrinsic determinants of amyloid Beta pathogenicity. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e290.

<sup>19</sup> Gibson, G. E.; Huang, H. M. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2005**, *26*, 575.

defenderse de ellos. Son muchas las observaciones experimentales que apoyan la idea que el estrés oxidativo juega un papel importante en la degeneración neuronal en la EA.<sup>9</sup>

Los cerebros de pacientes con EA muestran modificaciones oxidativas de proteínas, lípidos y ADN (DNA), principalmente alrededor de los agregados del péptido  $\beta$ A.<sup>20,21</sup> La interrelación del péptido A $\beta$  y el estrés oxidativo en la patogénesis de la EA permite desarrollar un modelo integral de neurodegeneración en pacientes con EA. La inserción del péptido A $\beta$  agregado en las membranas neuronales podría inducir peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). En el proceso de oligomerización del péptido  $\beta$ A se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, molécula fundamental de señalización de muerte celular. Este proceso requiere oxígeno e involucra la reducción de Fe<sup>3+</sup> o Cu<sup>2+</sup> mediante la reacción de Fenton. Cuando la oligomerización del péptido A $\beta$  tiene lugar en la membrana celular, el estrés oxidativo asociado a ésta resulta en peroxidación lipídica. Uno de los principales productos de peroxidación es el 4-hidroxinonenal (4-HNE), un aldehído que tiene la particularidad de ser neurotóxico ya que modifica covalentemente proteínas en residuos de cisteína, lisina e histidina. Entre las proteínas susceptibles de ser modificadas se encuentran bombas ATPasas, transportadores de glutamato, transportadores de glucosa, etc. La pérdida de la función de estos sistemas de transporte desencadena excitotoxicidad por glutamato, disminución de la disponibilidad de glucosa, disminución de la comunicación intracelular y aumento de neurotoxicidad.<sup>22</sup> La proteína tau puede sufrir modificaciones oxidativas por el 4-HNE y otras especies activas de oxígeno que pueden provocar su agregación y la formación de ovillos neurofibrilares. De esta manera, se genera un círculo vicioso de eventos de estrés oxidativo<sup>23</sup> que conducen al aumento de la actividad de enzimas antioxidantes tales como catalasa, superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa, como se ha podido observar en áreas cerebrales con severos cambios degenerativos.<sup>24</sup>

---

<sup>20</sup> Gackowski, D.; Rozalski, R.; Siomek, A.; Dziaman, T.; Nicpon, K.; Klimarczyk, M.; Araszkiewicz, A.; Olinski, R. Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia. *J. Neurol. Sci.* **2008**, *266*, 57.

<sup>21</sup> Sultana, R.; Perluigi, M.; Butterfield, D. A. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid. Redox Signal* **2006**, *8*, 2021.

<sup>22</sup> Butterfield, D. A.; Drake, J.; Pocernich, C.; Castegna, A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.* **2001**, *7*, 548.

<sup>23</sup> Siegel, S. J.; Bieschke, J.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. The oxidative stress metabolite 4-hydroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. *Biochemistry* **2007**, *46*, 1503.

<sup>24</sup> Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* **2001**, *18*, 685.

Además, se ha sugerido que el estrés oxidativo promueve la vía amiloidogénica de procesamiento del APP,<sup>25,26</sup> incrementándose la producción de  $\beta$ A que genera mayor producción de  $H_2O_2$  conduciendo así a un incremento del daño oxidativo.<sup>27</sup> Todas estas evidencias apoyan la teoría amiloidogénica de la EA sugiriendo que en la disfunción y degeneración de las sinapsis neuronales en la EA podría estar involucrado el estrés oxidativo inducido por los agregados de  $\beta$ A. La proteómica ha demostrado que proteínas del metabolismo energético y proteínas estructurales se ven afectadas principalmente por el incremento del estrés oxidativo observado en la EA.<sup>28</sup>

En este sentido, el hallazgo de nuevos compuestos con actividad inhibidora/moduladora de las diferentes enzimas que participan en el procesamiento de APP puede constituir una prometedora estrategia terapéutica.

### 2.1.3. Neuroinflamación y activación microglial

La neuroinflamación implica respuestas gliales específicas en el SNC que no reproducen las características clásicas de la inflamación en la periferia, pero que pueden engendrar eventos neurodegenerativos. Una enfermedad neurodegenerativa se define como un deterioro irreversible progresivo de las funciones motoras, sensoriales o cognitivas asociado a la pérdida neuronal. Los conceptos tradicionales han tendido a centrar la atención en mecanismos puramente neurodegenerativos o puramente inflamatorios, descuidando una perspectiva integrada. Estas dos áreas de la neurociencia están en realidad muy relacionadas. El cerebro no reproduce las características clásicas de la inflamación como en otras partes del organismo. Hay un cambio reciente en el concepto fundamental a medida que se ha evidenciado la importancia de las reacciones inflamatorias relacionadas con la inmunidad en el cerebro.<sup>29</sup> Se indica un papel más activo de la neuroinflamación en la fisiopatología de los trastornos neurodegenerativos progresivos. Las respuestas y acciones de las células microgliales y astrocitos en el cerebro tienen un carácter similar a la inflamación. Estas células juegan un papel importante en la neuroinflamación y en las

---

<sup>25</sup> Sultana, R.; Perluigi, M.; Butterfield, D. A. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid. Redox Signal* **2006**, *8*, 2021.

<sup>26</sup> Komatsu, H.; Liu, L.; Murray, I.V.; Axelsen, P. H. A mechanistic link between oxidative stress and membrane mediated amyloidogenesis revealed by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1913.

<sup>27</sup> Bayer, T. A.; Schäfer, S.; Breyhan, H.; Wirths, O.; Treiber, C.; Multhaup, G. A vicious circle: role of oxidative stress, intraneuronal Abeta and Cu in Alzheimer's disease. *Clin. Neuropathol.* **2006**, *25*, 163.

<sup>28</sup> Swomley, A. M.; Förster, S.; Keeney, J. T.; Triplett, J.; Zhang, Z.; Sultana, R.; Butterfield, D. A. Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, doi:10.1016/j.bbadis.2013.09.015.

<sup>29</sup> Fuster-Matanzo, A.; Llorens-Martín, M.; Hernández, F.; Avila, J. Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators Inflamm.* **2013**, *2013*, 260925.

enfermedades neurodegenerativas, y están involucradas en muchas respuestas celulares complejas.<sup>30</sup> Muchos eventos patológicos pueden provocar neuroinflamación; el desencadenante puede ser infeccioso, degenerativo, metabólico o isquémico. Por ejemplo, la inflamación aguda está asociada con traumatismo, accidente cerebrovascular y encefalitis, mientras que la EA, esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington (HD) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), son algunas de las condiciones que implican inflamación crónica. La inflamación se ha identificado como un factor importante en trastornos neurodegenerativos primarios.<sup>31</sup>

En el pasado, las respuestas inflamatorias gliales asociadas a estas enfermedades se han considerado como "gliosis reactiva" no específica. Este punto de vista podría estar relacionado con la falta de sensibilidad de las técnicas de imagen anatómica convencionales para detectar cambios en la materia gris, como la aparición de placas, gliosis o atrofia sutil. Sin embargo, se ha descubierto que la neurodegeneración y la neuroinflamación interactúan mediante la respuesta inmune. La destrucción neuronal y el daño a la mielina pueden producirse en el curso de la neuroinflamación y la neurodegeneración. Por ejemplo, la disminución de los niveles de N-acetil-aspartato detectada mediante espectroscopía por resonancia magnética ha demostrado ser un indicador de daño neuronal en enfermedades neurodegenerativas como la EM. A la luz de estos resultados, tanto las patologías puramente inflamatorias como puramente neurodegenerativas están controladas y reguladas por mecanismos moleculares comunes con daño colateral neuronal.<sup>32</sup> Inicialmente, eventos divergentes como la isquemia, la disfunción peroxisomal y la acumulación del péptido  $\beta$ A dan lugar a una respuesta del sistema inmune, que a su vez interactúa con el sistema nervioso y finalmente establece un daño tisular progresivo.<sup>33</sup>

La microglía deriva de la estirpe monocítica y muestra una elevada sensibilidad frente a los diferentes tipos de lesión del SNC. Durante la neuroinflamación, la microglía sufre cambios drásticos en su morfología, migra hacia el sitio de la lesión, prolifera y produce factores neurotóxicos, como citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno. El accidente cerebrovascular, la hipoxia y el trauma comprometen la supervivencia neuronal e indirectamente desencadenan neuroinflamación, en tanto que la microglía se activa en respuesta al daño con el fin de limitar la

---

<sup>30</sup> Graeber, M. B.; Li, W.; Rodriguez, M. L. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 3798.

<sup>31</sup> Fuster-Matanzo, A.; Llorens-Martín, M.; Hernández, F.; Avila, J. Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators Inflamm.* **2013**, *2013*, 260925.

<sup>32</sup> Jacobs, A.H.; Tavittian, B. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **2012**, *32*, 1393.

<sup>33</sup> Rubio-Perez, J. M.; Morillas-Ruiz, J. M. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*, **2012**, *2012*, 756357.

extensión de la lesión. Una leve reacción autoinmune con activación microglial puede tener una función neuroprotectora tras una lesión en SNC.<sup>23</sup>

El daño agudo, que puede provocar estrés oxidativo y nitrosativo, es normalmente de vida corta y, es poco probable que sea perjudicial para la supervivencia neuronal a largo plazo. Por el contrario, la neuroinflamación crónica es de larga duración y con frecuencia es una respuesta que se perpetúa a sí misma y que persiste durante mucho tiempo tras una primera lesión o injuria. Incluye no solo activación microglial de larga duración sino también la posterior liberación de factores inflamatorios. En la inflamación crónica, la respuesta inmune puede tener lugar a gran escala, incluyendo la activación de la microglía, y dañar el tejido cerebral mediante autoinmunógenos. Esto significa que la microglía activada puede ser amiga o enemiga para las neuronas vecinas. Aún no está claro cómo se debe manipular para minimizar sus efectos dañinos.<sup>34</sup>

En conclusión, la evidencia genética y patológica apoya la hipótesis de la cascada amiloide en la EA. La función crucial de  $\beta$ A en la patogenia de la EA se apoya en cinco argumentos clave:

- Los depósitos de amiloide proporcionan una evidencia patológica temprana de la EA y las placas neuríticas son clave en el criterio diagnóstico.
- En la amiloidosis periférica (no relacionada con  $\beta$ A y EA), la carga de amiloide conduce a la disfunción tisular, lo que sugiere que el amiloide cerebral es patógeno también.
- Los oligómeros  $\beta$ A muestran efectos de toxicidad sináptica aguda, mientras que la placa derivada de las fibrillas de  $\beta$ A producen efectos inflamatorios y causan toxicidad neuronal.
- APOE4 es el factor de riesgo genético más importante que se asocia con un aumento de la carga de amiloide.
- Todas las mutaciones que causan EA familiar, de inicio temprano, aumentan la producción de  $\beta$ A (1-42) o la proporción de  $\beta$ A (1-42), en comparación con la isoforma menos propensa a la agregación,  $\beta$ A (1-40).<sup>35</sup>

---

<sup>34</sup> Ransohoff, R. M. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, S152.

<sup>35</sup> Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 387.

## 2.2. Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

En la actualidad no hay tratamientos curativos o terapias efectivas que modifiquen la enfermedad, incluso 15 años después de que la Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency*, EMA) aprobara el donepezilo, inhibidor de acetil colinesterasa (IACHe).<sup>36</sup> Hay muy pocos medicamentos aprobados por la EMA para el tratamiento de la EA. Se incluyen tres IACHe y un antagonista del receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA) de glutamato.

La hipótesis colinérgica de la EA concluye que el sistema colinérgico en el pre-encéfalo basal es tempranamente afectado en la enfermedad. El proceso comprende la pérdida de neuronas colinérgicas y la pérdida de funciones enzimáticas para la síntesis y degradación de acetilcolina, lo que conduce a la pérdida de memoria y al deterioro de otras funciones cognitivas y no cognitivas, como los síntomas psiquiátricos.<sup>37,38,39</sup>

A continuación se describen las diferentes estrategias farmacoterapéuticas de la EA, actualmente en la clínica o en estudio, atendiendo a las principales dianas farmacológicas.

### 2.2.1. Inhibidores de acetilcolinesterasa (IACHe)

Una estrategia para mejorar la transmisión colinérgica consiste en el uso de los IACHe para retrasar la degradación de la acetilcolina en la hendidura sináptica. En 1997, la EMA aprobó la tacrina, que hoy día ya no se utiliza debido al elevado riesgo de hepatotoxicidad. En años siguientes, la EMA aprobó otros tres IACHe, donepezilo (1998), rivastigmina (1998) y galantamina (2000). Estos fármacos han sido considerados como tratamiento de primera línea de la EA.

En numerosos estudios doble ciego, aleatorizados y controlados con placebo, los tres IACHe han mostrado beneficios en las funciones cognitivas, en las actividades de la vida diaria y en la función global de los pacientes con EA leve a moderada. El donepezilo es beneficioso para la EA más severa. Los estudios clínicos sugieren que el donepezilo tiene un mayor perfil de tolerabilidad

---

<sup>36</sup> Fan, L. Y.; Chiu, M. J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol. Taiwan* **2010**, *19*, 228.

<sup>37</sup> Bozzali, M.; Parker, G. J.; Spanò, B.; Serra, L.; Giulietti, G.; Perri, R.; Magnani, G.; Marra, C.; G Vita, M.; Caltagirone, C.; Cercignani, M. Brain tissue modifications induced by cholinergic therapy in Alzheimer's disease. *Hum. Brain Mapp.* **2013**, *34*, 3158.

<sup>38</sup> Craig, L. A.; Hong, N. S.; McDonald, R. J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2011**, *35*, 1397.

<sup>39</sup> Dumas, J. A.; Newhouse, P. A. The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional compensation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2011**, *99*, 254.

en comparación con la rivastigmina y la galantamina; presenta una menor incidencia de eventos adversos gastrointestinales y un mayor número de sujetos alcanza una dosis máxima tolerada. La eficacia a largo plazo de los IChE sigue siendo controvertida, sin embargo, el tratamiento continuo resulta beneficioso y es bien tolerado.<sup>40</sup>

El ladostigil [(3*R*)-3-(prop-2-inilamino)indan-5-il]-*N*-propilcarbamato] es un inhibidor dual que inhibe tanto AChE-BuAChE como monoamina oxidasa (MAO-A y MAO-B) *in vivo*. Actualmente se encuentra en ensayo clínico de fase IIb y está destinado para el tratamiento de la demencia con trastornos extrapiramidales y depresión.<sup>41</sup> Apenas inhibe la MAO en hígado e intestino, lo que sugiere que el ladostigil no debería causar una potenciación significativa de la respuesta cardiovascular a tiramina, siendo por tanto un potencial antidepressivo más seguro que otros inhibidores irreversibles de MAO-A.

### 2.2.2. Prevención de la excitotoxicidad glutamatérgica

En la EA hay gran evidencia de que el receptor NMDA, que regula la excitotoxicidad estrechamente relacionada con la plasticidad neuronal y la función de la memoria, juega un papel importante en la neurodegeneración mediada por el péptido  $\beta$ A. Dicho péptido altera la función de los receptores postsinápticos NMDA conduciendo a un exceso del flujo de calcio lo que conduce a una sobrecarga en el citosol y en las mitocondrias con la consiguiente citotoxicidad oxidativa y apoptosis.<sup>42</sup> La memantina, un antagonista del receptor NMDA, no competitivo y de moderada afinidad, puede proteger a las neuronas de dicha excitotoxicidad. Este fármaco fue aprobado por la EMA en 2002 para el tratamiento de pacientes con EA moderada a grave. El  $\beta$ A interrumpe la potenciación a largo plazo (*Long term potentiation*, LTP) dependiente del receptor NMDA en el área CA1 del hipocampo y en el gyrus dentatus, tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>43</sup> La subunidad NR2B del receptor NMDA juega un papel en la neuroplasticidad y en el aprendizaje; y así, mientras la reducción en la expresión de

---

<sup>40</sup> Lockhart, I. A.; Mitchell, S. A.; Kelly, S. Safety and tolerability of donepezil, rivastigmine and galantamine for patients with Alzheimer's disease: systematic review of the 'real-world' evidence. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2009**, *28*, 389.

<sup>41</sup> Weinreb, O.; Amit, T.; Bar-Am, O.; Youdim, M. B. Ladostigil: a novel multimodal neuroprotective drug with cholinesterase and brain-selective monoamine oxidase inhibitory activities for Alzheimer's disease treatment. *Curr. Drug Targets.* **2012**, *13*, 483.

<sup>42</sup> Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 329.

<sup>43</sup> Yamin, G. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87*, 1729.

NR2B aumenta el riesgo de EA, la mejora de la actividad de NR2B del receptor de NMDA podría restaurar la función de memoria.<sup>44</sup>

Los ensayos clínicos doble ciego de grupos paralelos de memantina mostraron una mejora en la función de desarrollo cognitivo, las actividades de la vida diaria y en el comportamiento de personas con EA moderada a grave después de seis meses de tratamiento. La memantina, por lo general, es bien tolerada, excepto en un grupo pequeño de pacientes en que puede desarrollar agitación.<sup>45</sup> Otros estudios clínicos indican que la memantina puede reducir los síntomas conductuales y psicológicos de la demencia.<sup>46</sup>

### 2.2.3. Modulación de la producción de $\beta$ A

El enfoque más directo en la terapia anti-amiloide es la reducción de la producción de  $\beta$ A (1-42). Básicamente, existen tres posibles estrategias para reducir los niveles de  $\beta$ A: inhibición de  $\gamma$ -secretasa, inhibición de  $\beta$ -secretasa, o estimulación de  $\alpha$ -secretasa. La  $\gamma$ -secretasa fue el primer objetivo en la vía amiloidogénica desde la década de 1990, cuando se demostró que las células de cultivo de tejidos expresan  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa para generar de manera constitutiva el péptido  $\beta$ A. Este hallazgo condujo a la búsqueda de inhibidores no tóxicos de la producción celular de  $\beta$ A. Existen distintos tipos de moléculas que inhiben la producción de todas las isoformas de  $\beta$ A a través de la vía  $\gamma$ -secretasa.<sup>47</sup> El complejo  $\gamma$ -secretasa está formado por la asociación de una presenilina, como componente catalítico, con otras tres proteínas transmembrana de retículo endoplásmico (Nicastrina, Aph-1 y Pen-2). Debido al carácter complejo de esta asociación ha sido difícil obtener información de la estructura del sitio activo.<sup>48</sup> Uno de los problemas del desarrollo de fármacos inhibitorios de este complejo enzimático es el efecto de la inhibición de  $\gamma$ -secretasa sobre otros sustratos distintos a la APP. El semagacestat (LY450139) es un inhibidor de  $\gamma$ -secretasa, que en los ensayos clínicos ha demostrado una disminución dosis-dependiente de  $\beta$ A en plasma, pero no en líquido cefalorraquídeo, y no ha mostrado ningún beneficio cognitivo o funcional en pacientes con EA leve a moderada, en un estudio de fase II. Tampoco frena la progresión de la enfermedad y se

---

<sup>44</sup> Li, F.; Tsien, J. Z. Memory and the NMDA receptors. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 302.

<sup>45</sup> Fan, L. Y.; Chiu, M. J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol. Taiwan* **2010**, *19*, 228.

<sup>46</sup> Maidment I. D.; Fox, C. G.; Boustani, M.; Rodriguez, J.; Brown, R. C.; Katona, C. L. Efficacy of memantine on behavioral and psychological symptoms related to dementia: a systematic meta-analysis. *Ann. Pharmacother.* **2008**, *42*, 32.

<sup>47</sup> Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1172.

<sup>48</sup> De Strooper, B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **2003**, *38*, 9.

asocia con un empeoramiento de la función cognitiva y la capacidad para realizar las actividades de la vida diaria. Además se asoció a un mayor riesgo de cáncer de piel. Por tanto, el ensayo clínico de semagacestat fue suspendido.<sup>49</sup> Avagacestat es un inhibidor de  $\gamma$ -secretasa que se concibió para evitar que se uniera a sustratos que no fueran APP. Sin embargo el ensayo clínico fue suspendido a finales de 2012 por empeoramiento clínico.<sup>50</sup>

La segunda estrategia principal involucra a la  $\beta$ -secretasa, que se identificó en 1999 como *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1* (BACE1). Se trata de una proteína transmembrana de tipo I, con el sitio activo en el lado luminal de la membrana, donde se une a la APP. Los cultivos de tejidos y los estudios en animales indican que  $\beta$ -secretasa se expresa en todos los tejidos, aunque los niveles son más elevados en cerebro. No se han descrito mutaciones en BACE1 que produzcan EA, pero se ha detectado una mayor actividad  $\beta$ -secretasa en los cerebros de pacientes con EA esporádica. En este momento se desconoce si el aumento de la actividad  $\beta$ -secretasa conduce a patología o si es sólo una secuela de la última etapa de la patología de la EA. Sin embargo, en modelos preclínicos, el aumento en la expresión BACE1 cerebral puede ser desencadenado por la privación de energía, lo que conduce a la posibilidad de que la glucosa en el cerebro hipometabólico, como se observa en portadores de APOE4, pueda directamente desencadenar la cascada amiloide. El papel biológico de  $\beta$ -secretasa todavía no se ha determinado. El desarrollo de inhibidores ha demostrado ser un reto; sólo una compañía (Merck) ha presentado datos clínicos de un inhibidor de  $\beta$ -secretasa. Los inhibidores son grandes péptidos hidrofílicos cuyo paso a través de la barrera hematoencefálica supone un obstáculo adicional en el desarrollo de inhibidores de  $\beta$ -secretasa.<sup>51</sup> Recientemente se ha descrito la acción de un inhibidor de  $\beta$ -secretasa, MK-8931, para el cual la escalada de dosis fue bien tolerada y produjo una reducción dosis-dependiente de los niveles de  $\beta$ A en LCR de hasta un 47%. Actualmente se están reclutando pacientes para un ensayo de fase II/III con este inhibidor indicado en la EA leve a moderada (NCT01739348).<sup>52</sup>

En cuanto a la tercera estrategia, la estimulación de  $\alpha$ -secretasa produce una disminución del sustrato APP disponible para la vía amiloidogénica, y se ha demostrado que esta vía puede ser

---

<sup>49</sup> Fleisher, A. S.; Raman, R.; Siemers, E. R.; Becerra, L.; Clark, C. M.; Dean, R. A.; Farlow, M. R.; Galvin, J. E.; Peskind, E. R.; Quinn, J. F.; Sherzai, A.; Sowell, B. B.; Aisen, P. S.; Thal, L. J. Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a gamma-secretase inhibitor in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **2008**, *65*, 1031.

<sup>50</sup> Nygaard, H. B. Current and emerging therapies for Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* **2013**, *35*, 1480.

<sup>51</sup> Velliquette, R. A.; O'Connor, T.; Vassar, R. Energy inhibition elevates beta-secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 10874.

<sup>52</sup> Nygaard, H. B. Current and emerging therapies for Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* **2013**, *35*, 1480.

estimulada a través de receptores de superficie celular. Sin embargo, para la APP es mucho más activa la vía de la  $\alpha$ -secretasa que la vía de la  $\beta$ -secretasa, por lo que la reducción deseada de A $\beta$  requiere un cambio marcado en el metabolismo de APP y de otras proteínas de membrana que son sustratos de  $\alpha$ -secretasa. Por tanto, el potencial de efectos secundarios de este enfoque es desconocido.<sup>53</sup> El estímulo de  $\alpha$ -secretasa ha sido explorado en profundidad en el contexto de agonistas de receptores muscarínicos M1 que podrían funcionar como potenciadores de la función cognitiva. Se ha descrito que reducen la producción de  $\beta$ A en un pequeño ensayo clínico. Sin embargo, el desarrollo de agonistas muscarínicos M1 específicos es complejo y los fármacos inespecíficos pueden causar efectos secundarios.<sup>54</sup>

### 2.2.4. Inhibición de la agregación de $\beta$ A

Las células constitutivamente generan pequeñas cantidades de las diferentes isoformas de  $\beta$ A. Las moléculas monoméricas de  $\beta$ A, en particular de  $\beta$ A (1-42), pueden formar agregados oligoméricos que se consideran iniciadores de la cascada patogénica. Inicialmente se supuso que sólo el A $\beta$  agregado, que constituía las placas neuríticas maduras de amiloide, podría ejercer propiedades tóxicas.

En principio, el desarrollo de pequeñas moléculas que atraviesen la barrera hematoencefálica y que interfieran con las interacciones peptídicas  $\beta$ A- $\beta$ A, parece ser un enfoque atractivo. Si las interacciones peptídicas son las mismas en los oligómeros y en las grandes fibrillas, estas pequeñas moléculas podrían inhibir tanto la formación de oligómeros tóxicos como de placas neuríticas. Si las interacciones péptido-péptido fueran diferentes en los oligómeros y en los agregados se podrían identificar moléculas que interfieren con uno de los dos procesos.<sup>55</sup>

El tramiprosato (ácido 3-amino-1-propanosulfónico, homotaurina) es una molécula pequeña que se une a los monómeros y oligómeros de  $\beta$ A, y que permanece unido a las formas no fibrilares,<sup>56</sup> lo que conduce al aclaramiento del péptido  $\beta$ A del cerebro. Un ensayo clínico de fase II en pacientes con EA leve a moderada mostró que el nivel de  $\beta$ A (1-42) en el líquido cefalorraquídeo se redujo de forma dosis-dependiente. Sin embargo, otro estudio de fase III llevado a cabo en 1052

---

<sup>53</sup> Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9, 387.

<sup>54</sup> Hock, C.; Maddalena, A.; Raschig, A.; Müller-Spahn, F.; Eschweiler, G.; Hager, K.; Heuser, I.; Hampel, H.; Müller-Thomsen, T.; Oertel, W.; Wienrich, M.; Signorell, A.; Gonzalez-Agosti, C.; Nitsch, R. M. Treatment with the selective muscarinic m1 agonist talsaclidine decreases cerebrospinal fluid levels of A beta 42 in patients with Alzheimer's disease. *Amyloid* 2003, 10, 1.

<sup>55</sup> Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* 2007, 101, 1172.

<sup>56</sup> Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9, 387.

pacientes con EA leve a moderada no demostró ningún efecto beneficioso en la función cognitiva o demencia después de 18 meses de tratamiento.<sup>57</sup>

Uno de los isómeros de ciclohexanohexol podría estabilizar las moléculas  $\beta$ A en una conformación no tóxica, que inhibe la fibrilación del  $\beta$ A, en distintos fenotipos de ratones transgénicos APP.<sup>58</sup> Otro enfoque basado en la interferencia con las especies tóxicas de  $\beta$ A está basado en la quelación de metales, en particular zinc y cobre, que contribuyen a la patología amiloide. Esto ha llevado a la investigación de compuestos quelantes de metales, como el clioquinol, que de forma drástica reduce la patología amiloide en ratones transgénicos que sobreexpresan APP.

El compuesto PBT2 es un derivado 8-hidroxiquinolina que está siendo desarrollado por la empresa de biotecnología *Prana Biotechnology*.<sup>59</sup> PBT2 ha demostrado que mejora la cognición en un ensayo clínico de fase II con pacientes con Alzheimer. Podría actuar como una eficaz chaperona, desagregando las placas amiloides enriquecidas con metales, mediante la inhibición de las interacciones  $\text{Cu}^{2+}/\beta$ A.<sup>60</sup>

### 2.2.5. Aumento del aclaramiento de $\beta$ A

Se han identificado varias enzimas clave implicadas en la degradación del péptido  $\beta$ A, especialmente las proteasas neprilisin, que degradan insulina y plasmina. Desde el punto de vista del desarrollo de fármacos, la activación específica de enzimas constituye un mayor desafío que la inhibición. Basándose en que la plasmina puede hidrolizar el péptido  $\beta$ A *in vitro* y que el activador del plasminógeno (PAI-1), tisular se inhibe *in vivo* por el inhibidor 1 del PAI-1, se han generado inhibidores de PAI-1 de administración por vía oral que disminuye los niveles de  $\beta$ A en plasma y cerebro de ratones transgénicos. Por otro lado, no sería necesario activar directamente proteasas

---

<sup>57</sup> Fan, L. Y.; Chiu, M. J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol. Taiwan* **2010**, *19*, 228.

<sup>58</sup> McLaurin, J.; Kierstead, M. E.; Brown, M. E.; Hawkes, C. A.; Lambermon, M. H.; Phinney, A. L.; Darabie, A. A.; Cousins, J. E.; French, J. E.; Lan, M. F.; Chen, F.; Wong, S. S.; Mount, H. T.; Fraser, P. E.; Westaway, D.; St George-Hyslop, P. Cyclohexanehexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 801.

<sup>59</sup> Lannfelt, L.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Batsman, S.; Ames, D.; Harrison, J.; Masters, C. L.; Targum, S.; Bush, A. I.; Murdoch, R.; Wilson, J.; Ritchie, C. W. PBT2-201-EURO study group. Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* **2008**, *7*, 779.

<sup>60</sup> Kenche, V. B.; Zawisza, I.; Masters, C. L.; Bal, W.; Barnham, K. J.; Drew, S. C. Mixed ligand  $\text{Cu}^{2+}$  complexes of a model therapeutic with Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptide and monoamine neurotransmitters. *Inorg Chem.* **2013**, *52*, 4303

que degraden  $\beta$ A en el cerebro si el péptido se pudiera movilizar desde el SNC hacia la periferia para su degradación.<sup>61</sup>

El tramiprosato (ácido 3-amino-1-propanosulfónico) posee capacidad de unirse a los oligómeros  $\beta$ A, lo que conduce al aclaramiento del péptido  $\beta$ A cerebral. Un ensayo clínico de fase II en pacientes con EA leve a moderada mostró que el nivel  $\beta$ A (1-42) en el LCR se redujo de forma dosis-dependiente. Sin embargo, otro estudio de fase III de 1052 pacientes con EA leve a moderada no mostró un efecto beneficioso sobre el resultado primario, ni cambios en la función cognitiva o en la demencia tras 18 meses de intervención. Este resultado negativo fue considerado como inexplicable y con una gran variación entre los distintos centros, a pesar de que el tramiprosato fue bien tolerado.<sup>62</sup>

### 2.2.6. Inmunoterapia

En los últimos años, la inmunoterapia  $\beta$ A se ha convertido en una de las aéreas más dinámicas de la investigación en EA, con más de diez agentes inmunoterapéuticos en ensayos clínicos. El efecto resultante de la inmunoterapia es la reducción de la placa, sin ningún signo evidente de daño para los cerebros de los animales inmunizados con  $\beta$ A (1-42). Los autores proponen que la inmunización con  $\beta$ A (1-42) aumenta la respuesta inmune específica  $\beta$ A, reduciendo notablemente la patología en diferentes modelos animales transgénicos. Los mecanismos de la inmunoterapia en la EA no están totalmente claros. Se han propuesto cuatro hipótesis que no son mutuamente excluyentes. Diversos estudios apoyan un mecanismo basado en la activación y fagocitosis de la microglía. En este escenario, los anticuerpos administrados en la periferia alcanzan el SNC y activan la microglía endógena que fagocita el amiloide. La evidencia directa de la unión de anticuerpos amiloide-específicos administrados periféricamente frente a los depósitos de amiloide en el cerebro ha sido propuesta en ensayos *ex vivo* como mecanismo de eliminación y se ha estimado la eficacia observada *in vivo* para todos los anticuerpos estudiados.<sup>63</sup> Además, los anticuerpos pueden disgregar *in vitro* las fibrillas agregadas de  $\beta$ A; esta disminución directa de los depósitos de amiloide podría ser la base de sus efectos terapéuticos. El anticuerpo monoclonal 266 de la región media de  $\beta$ A, que muestra una afinidad del orden de pico molar por el  $\beta$ A soluble, no se une a las placas, y se

---

<sup>61</sup> Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 387.

<sup>62</sup> Gauthier, S.; Aisen, P. S.; Ferris, S. H.; Saumier, D.; Duong, A.; Haine, D.; Garceau, D.; Suhy, J.; Oh, J.; Lau, W.; Sampalis, J. Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: exploratory analyses of the MRI sub-group of the Alphase study. *J. Nutr. Health Aging.* **2009**, *13*, 550.

<sup>63</sup> Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 387.

observó que reducía los niveles de amiloide tras la administración. Se sugiere que los anticuerpos, en concentraciones suficientes para producir niveles detectables en el líquido cefalorraquídeo de  $\beta$ A soluble, producen un flujo neto de  $\beta$ A desde el SNC a la periferia, lo que durante un período de tiempo prolongado podría conducir a la disminución de la carga amiloide del parénquima.<sup>64</sup>

Aunque el péptido  $\beta$ A es relativamente pequeño, es posible crear anticuerpos para las distintas regiones amino terminal, región media y carboxi-terminal. Es probable que la elección del epítipo afecte al mecanismo predominante de la acción y determine qué isoformas de  $\beta$ A se suprimen. La elección del epítipo también determina problemas asociados con la administración de ciertos anticuerpos  $\beta$ A específicos, como la hemorragia intracerebral. Aunque hay varios agentes inmunoterapéuticos  $\beta$ A actualmente en desarrollo clínico, no hay datos definitivos sobre su eficacia. Se requiere el análisis de los resultados de los estudios de fase III de inmunoterapia  $\beta$ A para determinar si los tratamientos presentan el efecto deseado.<sup>65</sup>

### *Inmunización pasiva*

Bapineuzumab es un anticuerpo monoclonal que se une al extremo N-terminal de  $\beta$ A para mejorar el aclaramiento de  $\beta$ A del cerebro. En un ensayo clínico de fase II que incluyó 234 pacientes con EA leve a moderada, bapineuzumab (i.v.) no mostró una ventaja significativa en el desarrollo cognitivo y en las actividades de la vida diaria tras 78 semanas de tratamiento.<sup>66</sup> El anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ A, solanezumab, que es una inmunoglobulina humanizada G-1, se encuentra actualmente en estudios clínicos de fase II/III. En un estudio de fase II que incluyó a 52 pacientes con EA leve a moderada, solanezumab no produjo un aumento de la eliminación de  $\beta$ A en plasma y LCR, y ningún cambio significativo en la función cognitiva o en la cantidad de  $\beta$ A cerebral.<sup>67</sup> Recientemente han comenzado dos ensayos clínicos de fase III que se centrarán en el estudio de la eficacia de solanezumab en la función cognitiva y en las actividades de la vida diaria en pacientes con EA leve a moderada.<sup>68</sup>

---

<sup>64</sup> Deane, R.; Wu, Z.; Zlokovic, B. V. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* **2004**, *35*, 2628.

<sup>65</sup> Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 387.

<sup>66</sup> Salloway, S.; Sperling, R.; Gilman, S.; Fox, N. C.; Blennow, K.; Raskind, M.; Sabbagh, M.; Honig, L. S.; Doody, R.; van Dyck, C. H.; Mulnard, R.; Barakos, J.; Gregg, K. M.; Liu, E.; Lieberburg, I.; Schenk, D.; Black, R.; Grundman, M. Bapineuzumab 201 Clinical Trial Investigators. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* **2009**, *73*, 2061.

<sup>67</sup> Fan, L. Y.; Chiu, M. J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol. Taiwan* **2010**, *19*, 228.

<sup>68</sup> Nygaard, H. B. Current and emerging therapies for Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* **2013**, *35*, 1480.

Gantenerumab es un nuevo anticuerpo anti- $\beta$ A completamente humano, optimizado *in vitro* para su unión, con una afinidad sub-nanomolar, a un epítipo conformacional que se expresa en las fibrillas de  $\beta$ A. A diferencia de otros anticuerpos anti- $\beta$ A, gantenerumab no altera los niveles de  $\beta$ A en plasma, lo sugiere que produce un aclaramiento sistémico del  $\beta$ A soluble. Se ha demostrado que gantenerumab interactúa preferentemente con el  $\beta$ A agregado en cerebro. Actualmente se encuentra en fase de ensayo clínico II/III.<sup>69</sup>

### *Inmunización activa*

El péptido  $\beta$ A o parte del él se utiliza en la inmunización activa para inducir anticuerpos anti- $\beta$ A con el fin de que el sistema inmune aumente el aclaramiento cerebral de  $\beta$ A. Este primer concepto tiene su origen en 1999 cuando Schenk y colaboradores<sup>70</sup> mostraron una disminución de la placa amiloide y de la neuritis en ratones transgénicos PDAPP (Mutación: Human APP, APP V717F; gen promotor: human platelet derived growth factor b) inmunizados con  $\beta$ A. Un ensayo de fase II con un compuesto derivado del péptido  $\beta$ A (1-42), AN-1792, en combinación con el adyuvante QS21, fue suspendido repentinamente en el año 2002 debido a que 15 participantes desarrollaron síntomas de meningoencefalitis aséptica. En este ensayo se mostró un efecto adverso patológico definitivo que guardaba una fuerte relación con el TGF- $\beta$ 1 y con la toxicidad inducida por las células T.<sup>57</sup> Desde entonces, una segunda generación de vacunas se encuentra en investigación. Estas disminuyen el  $\beta$ A insoluble y la placa amiloidea pero no el  $\beta$ A soluble y los oligómeros de amiloide, y no ejercen efecto en la tauopatía. Como se ha mencionado los pacientes que recibieron inmunización con AN-1792 (derivado de  $\beta$ A1-42, de gran longitud) mostraron un gran aumento del volumen ventricular del encéfalo. El volumen del hipocampo mostró una mayor reducción en pacientes tratados con AN-1792 que en los pacientes tratados con placebo. Es posible que el cambio de volumen se deba a la eliminación del  $\beta$ A o esté asociado al desplazamiento del fluido cerebral. Sin embargo, la mayor pérdida de volumen cerebral no se reflejó en la mejora cognitiva. Además, el  $\beta$ A fue movilizado desde el cerebro hacia el espacio intravascular, lo que pudo aumentar el precipitado  $\beta$ A generando

---

<sup>69</sup> Ostrowitzki, S.; Depta, D.; Thurfjell, L.; Barkhof, F.; Bohrmann, B.; Brooks, D. J.; Klunk, W. E.; Ashford, E.; Yoo, K.; Xu, Z. X.; Loetscher, H.; Santarelli, L. Mechanism of amyloid removal in patients with Alzheimer disease treated with gantenerumab. *Arch. Neurol.* **2012**, *69*, 198.

<sup>70</sup> Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandever, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **1999**, *400*, 173.

angiopatía amiloide y dando lugar a lesiones microvasculares o micro-hemorragias tras la vacunación.<sup>71</sup>

En la nueva vacuna Lu AF20513, los epítopes de células Th de  $\beta$ A (1-42) se han sustituido por dos epítopes Th de toxoide tetánico, P2 y P30, y el epítopo inmunodominante de células B de  $\beta$ A (1-12). Los resultados de inmunogenicidad, eficacia, y seguridad de Lu AF20513 de grado GMP (Good Manufacturing Practice) en el modelo transgénico de ratón APP, en cobayas y en mono *cynomolgus* apoya la continuación de su desarrollo mediante ensayo clínico de fase I/IIa.<sup>72</sup>

### 2.2.7. Antiinflamatorios

La inflamación podría resultar el área más controvertida en la terapia de la EA. Un estudio de la asociación del genoma establece un vínculo genético entre la inflamación y la EA, con la identificación del gen que codifica para el receptor del complemento 1 (CR1), el cual es fundamental para permitir la respuesta inmune-humoral innata, lo que es un verdadero factor de riesgo para la EA.<sup>73</sup> Desde hace tiempo se sabe que la microglía activada está fuertemente asociada con las placas seniles y, que muchos mediadores inflamatorios, tales como las prostaglandinas, pentraxinas, componentes del complemento, citocinas, quimiocinas, proteasas e inhibidores de proteasa, son reguladas al alta en las zonas afectadas del cerebro con EA. Esto ha llevado a la hipótesis de que la terapia anti-inflamatoria podría ser beneficiosa, y esta idea se apoya en una menor incidencia de EA en pacientes con artritis, la mayoría de los cuales utilizan AINEs. Esto se podría explicar de varias maneras. En primer lugar, los datos son consistentes con la idea de que los AINEs y los enfoques anti-inflamatorios en general son útiles sólo en la prevención primaria de la EA, no en el tratamiento de la misma. En segundo lugar, en los ensayos no se han seleccionado las dianas moleculares correctas. Por ejemplo, se ha sugerido prestar atención a ciclooxigenasa 1

---

<sup>71</sup> Fan, L. Y.; Chiu, M. J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol. Taiwan* **2010**, *19*, 228.

<sup>72</sup> Davtyan, H.; Ghochikyan, A.; Petrushina, I.; Hovakimyan, A.; Davtyan, A.; Poghosyan, A.; Marleau, A. M.; Movsesyan, N.; Kiyatkin, A.; Rasool, S.; Larsen, A. K.; Madsen, P. J.; Wegener, K. M.; Ditlevsen, D. K.; Cribbs, D. H.; Pedersen, L. O.; Agadjanyan, M. G. Immunogenicity, efficacy, safety, and mechanism of action of epitope vaccine (Lu AF20513) for Alzheimer's disease: prelude to a clinical trial. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 4923.

<sup>73</sup> Lambert, J. C.; Heath, S.; Even, G.; Campion, D.; Sleegers, K.; Hiltunen, M.; Combarros, O.; Zelenika, D.; Bullido, M. J.; Tavernier, B.; Letenneur, L.; Bettens, K.; Berr, C.; Pasquier, F.; Fiévet, N.; Barberger-Gateau, P.; Engelborghs, S.; De Deyn, P.; Mateo, I.; Franck, A.; Helisalmi, S.; Porcellini, E.; Hanon, O. European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, de Pancorbo M. M. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 1094.

(COX-1), ya que a diferencia de COX-2, es regulada al alza en la microglía.<sup>74</sup> Además, los AINEs pueden actuar en otras dianas moleculares, además de COX, lo cual no ha sido óptimamente previsto en los ensayos clínicos previos. Por ejemplo, la activación específica del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) provoca efectos anti-amiloidogénicos, antiinflamatorios y sensibilización a la insulina. Sin embargo, el reciente fracaso de la rosiglitazona en estudios clínicos de fase III no es compatible con una nueva evaluación de este objetivo en el tratamiento de EA.<sup>75</sup>

Aunque la inflamación se reconoce como parte de la patología de la EA, un número creciente de estudios preclínicos sugiere que algunos aspectos de la respuesta inmune pueden en realidad ser beneficiosos. En la EA, la microglía probablemente fagocita el péptido  $\beta$ A depurando así al organismo del mismo. Los estudios clínicos en curso de terapia inmunológica prometen mejorar la fagocitosis microglial de  $\beta$ A, reduciendo así la patología amiloide.

Por tanto, los mecanismos inflamatorios se deberían redirigir en la EA, en lugar de suprimirse. Los datos preclínicos sugieren que esta realidad puede ser factible. Por ejemplo, la supresión de los receptores de prostaglandina E2 (PGE2). ha demostrado reducir el daño oxidativo y la carga amiloide en un modelo de ratón transgénico para APP. Esto plantea la posibilidad de que un antagonista del receptor de PGE2 podría aumentar la fagocitosis microglial de  $\beta$ A y al mismo tiempo disminuir el daño oxidativo potencial y la neurotoxicidad secundaria.<sup>76</sup>

La 5-lipoxigenasa (5-LOX) se presenta como una diana farmacológica en la EA. El metabolismo de 5-LOX es un elemento clave en la promoción de la disfunción del retículo endoplásmico, y su inhibición bajo condiciones de estrés es suficiente para reducir la proteotoxicidad, tanto *in vivo* como *in vitro*, como consecuencia de la acumulación de proteínas ubiquitinadas y agregadas. Así se ha demostrado que inhibidores de 5-LOX disminuyen la expresión de 5-LOX y aumentan la actividad del proteasoma. La inhibición de 5-LOX induce la fosforilación de la prostaglandina F2 $\alpha$  y de PERK (*protein kinase R-like extracellular signal-regulated kinase*) y los niveles de HSP90 y de ATF4 (*activating transcription factor 4*).<sup>77</sup>

---

<sup>74</sup> McGeer, P. L.; McGeer, E. G. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol. Aging* **2007**, *28*, 639.

<sup>75</sup> Wyss-Coray, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.* **2006**, *12*, 1005.

<sup>76</sup> Liang, X.; Wang, Q.; Hand, T.; Wu, L.; Breyer, R. M.; Montine, T. J.; Andreasson, K. Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 10180.

<sup>77</sup> Valera, E.; Dargusch, R.; Maher, P. A.; Schubert, D. Modulation of 5-lipoxygenase in proteotoxicity and Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 10512.

### 2.2.8. Estrategias dirigidas a la patología tau

Los ovillos neurofibrilares son agregados de proteína tau hiperfosforilada<sup>78</sup> que se conocen más comúnmente como marcador primario de la EA. También se encuentran en numerosas enfermedades conocidas como tauopatías, aunque poco se sabe acerca de su relación exacta con las diferentes patologías. Este es un notable hallazgo patológico de la EA, paralelo y similar a los péptidos  $\beta$ A.<sup>79</sup> La patología de tau y los ovillos neurofibrilares no son específicos de la EA<sup>80</sup> ya que constituyen parte de la patología de una serie trastornos, como la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración cortico-basal y enfermedades de las neuronas motoras.

En la EA, existe una fuerte correlación entre la disfunción cognitiva y la carga de ovillos neurofibrilares.<sup>81</sup> Por otra parte, el descubrimiento de las mutaciones de tau que causan algunas formas de demencia frontotemporal proporciona un vínculo directo entre tau y la enfermedad neurológica.<sup>82</sup> La proteína tau, que forma parte del citoesqueleto de la neurona, es una proteína soluble que se une a los microtúbulos proporcionándoles su estabilización en los axones, como vías para el transporte axonal y los elementos del citoesqueleto para el crecimiento y la sinapsis.<sup>83</sup> Cuando tau es hiperfosforilada se interrumpe su ensamble con el microtúbulo, alterando así la función axonal de transporte y reduciendo las espinas dendríticas. Además, la hiperfosforilación de tau conduce a su autoagregación, dando lugar a filamentos intermediarios helicoidales apareados y finalmente a los ovillos neurofibrilares. Los productos intermediarios agregados, al igual que los oligómeros de  $\beta$ A, están asociados a inflamación, citotoxicidad oxidativa y neurodegeneración.

La inhibición de la agregación de la proteína tau y el bloqueo de su hiperfosforilación son las estrategias principales de tratamiento que se están estudiando.<sup>68</sup> La hiperfosforilación de tau es regulada por quinasas y fosfatasas. Existen evidencias que prueban que  $\beta$ A induce la cascada de quinasas que da lugar a la fosforilación de tau. Por tanto, la inhibición de quinasas o el aumento de la función de las fosfatasas pueden alterar la fosforilación anormal de tau.<sup>84</sup> Se ha demostrado que

---

<sup>78</sup> Ren, Y.; Sahara, N. Characteristics of tau oligomers. *Front. Neurol.* **2013**, *4*, 102.

<sup>79</sup> Fan, L.Y.; Chiu, M. J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol. Taiwan* **2010**, *19*, 228.

<sup>80</sup> Guzmán-Martínez, L.; Farías, G. A.; Maccioni, R. B. Tau Oligomers as Potential Targets for Alzheimer's Diagnosis and Novel Drugs. *Front. Neurol.* **2013**, *4*, 167.

<sup>81</sup> Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 387.

<sup>82</sup> Liang, X.; Wang, Q.; Hand, T.; Wu, L.; Breyer, R. M.; Montine, T. J.; Andreasson, K. Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 10180.

<sup>83</sup> Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 387.

<sup>84</sup> Lee, H. G.; Perry, G.; Moreira, P. I.; Garrett, M. R.; Liu, Q.; Zhu, X.; Takeda, A.; Nunomura, A.; Smith, M. A. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol. Med.* **2005**, *11*, 164.

las quinasas (GSK-3 y Cdk5/p25) juegan un papel importante en la neurodegeneración de la EA aumentando la producción de  $\beta$ A.

Estudios realizados con litio han demostrado que no sólo inhibe GSK-3 sino que además puede modular la apoptosis neuronal. Aunque se ha probado que el litio disminuye la carga de tau anormal tanto *in vitro* como *in vivo*, su beneficio neuroprotector y en la función cognitiva sigue aun siendo controvertido.<sup>85</sup> En un ensayo de fase II, con pacientes amnésicos y con deterioro cognitivo leve, fue visible la atenuación de los déficits cognitivos y la modificación de los marcadores biológicos, como consecuencia del tratamiento con litio. Existen otros inhibidores selectivos potentes de GSK-3 que han mostrado efectos prometedores en modelos de estudio preclínicos.<sup>86</sup>

PP2A es la principal fosfatasa que se encuentra disminuida en la EA. La peptidil-prolil cis-trans isomerasa (Pin1), que facilita la desfosforilación de la fosfatasa, puede ser activada por oligómeros de  $\beta$ A e inducida por la hiperfosforilación de tau. La posibilidad de regular estas moléculas relacionadas con tau puede conducir a nuevas terapias.<sup>87</sup>

### 2.2.9. Estrategias dirigidas a APOE

La APOE es el portador principal de la apolipoproteína y el colesterol en el cerebro. Hay tres isoformas humanas principales, APOE2, APOE3 y APOE4, codificadas por alelos polimórficos e2, e3 y e4, respectivamente. Los portadores del alelo e4 tienen un mayor riesgo relativo de EA de aparición tardía por carga genética frente a los portadores de e3 y e2. Aunque sólo el 15% de la población tiene al menos un alelo e4, el 40% de todos los casos de EA son portadores de dicho gen. De todas las posibles causas genéticas de la EA, e4 es la que participa en la mayoría de los casos.<sup>88</sup>

Estudios epidemiológicos muestran que las personas con un nivel de colesterol elevado presentan un riesgo mayor de desarrollar EA. En estudios con animales, la reducción de los niveles

---

<sup>85</sup> Davenport, C. M.; Sevastou, I. G.; Hooper, C.; Pocock, J. M. Inhibiting p53 pathways in microglia attenuates microglial-evoked neurotoxicity following exposure to Alzheimer peptides. *J. Neurochem.* **2010**, *112*, 552.

<sup>86</sup> Uno, Y.; Iwashita, H.; Tsukamoto, T.; Uchiyama, N.; Kawamoto, T.; Kori, M.; Nakanishi, A. Efficacy of a novel, orally active GSK-3 inhibitor 6-Methyl-N-[3-[[3-(1-methylethoxy)propyl]carbamoyl]-1H-pyrazol-4-yl]pyridine-3-carboxamide in tau transgenic mice. *Brain Res.* **2009**, *1296*, 148.

<sup>87</sup> Sigurdsson, E.M. Tau-focused immunotherapy for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* **2009**, *6*, 446.

<sup>88</sup> Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 387.

de colesterol puede disminuir la expresión de la patología de Alzheimer, reducir la carga de amiloide y ovillos neurofibrilares, y atenuar la pérdida de memoria y capacidad de aprendizaje.<sup>89</sup>

### 2.2.10. Función metabólica y función cognitiva

Los defectos metabólicos que no se reflejan directamente en las señales de identidad de la EA pueden tener un papel importante en el proceso de la enfermedad. Los estudios epidemiológicos sugieren que existe una asociación entre el síndrome metabólico y la EA, y dicha asociación se mantiene aun cuando se excluye a los pacientes diabéticos.<sup>90</sup> Además, se ha descrito que el colesterol puede modular la producción de  $\beta A$  *in vitro* y en modelos animales. En concreto, los estudios con inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas) y acil-CoA colesterol aciltransferasa han demostrado disminuir los niveles de  $\beta A$  en animales. Pero no se conoce actualmente si el efecto terapéutico requiere la reducción del colesterol del cerebro. La eficacia de las estatinas en la EA se ha estudiado en diversos ensayos clínicos, aunque no se ha encontrado una mejora en los síntomas y en la progresión de la EA,<sup>91</sup> como lo demuestra un estudio retrospectivo de atorvastatina (*Lipitor*<sup>®</sup>, Pfizer).<sup>92</sup>

Es interesante el hecho de que los portadores homocigotos para el alelo e4, con función cognitiva normal, presentan una disminución del metabolismo de la glucosa en las mismas áreas cerebrales que los pacientes con EA probable. En estudios longitudinales de individuos cognitivamente normales y heterocigotos para el alelo e4 se ha encontrado una disminución significativamente mayor del metabolismo cerebral de la glucosa que en los no portadores. Estas alteraciones en el metabolismo de la glucosa se pueden identificar en los estadios iniciales de la EA y podrían desempeñar un papel importante en el proceso de la enfermedad. Otros estudios sugieren que la resistencia a la insulina puede acelerar la patogénesis de la EA mediante diversos mecanismos y, así, se han descrito efectos directos de la hiperinsulinemia periférica en la memoria, en el proceso de la inflamación, en la regulación de los niveles de  $\beta A$  y en el metabolismo de tau.<sup>93</sup>

---

<sup>89</sup> McGuinness, B.; Craig, D.; Bullock, R.; Passmore, P. Statins for the prevention of dementia. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2009**, (2), CD003160.

<sup>90</sup> Vanhanen, M.; Koivisto, K.; Moilanen, L.; Helkala, E. L.; Hänninen, T.; Soininen, H.; Kervinen, K.; Kesäniemi, Y. A.; Laakso, M.; Kuusisto, J. Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurology* **2006**, *67*, 843.

<sup>91</sup> Kandiah, N.; Feldman, H. H. Therapeutic potential of statins in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **2009**, *283*, 230.

<sup>92</sup> Sever, P. S.; Chang, C. L.; Gupta, A. K.; Whitehouse, A.; Poulter, N. R.; ASCOT Investigators. The Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial: 11-year mortality follow-up of the lipid-lowering arm in the U.K. *Eur. Heart J.* **2011**, *32*, 2525.

<sup>93</sup> Craft, S. Insulin resistance syndrome and Alzheimer disease: pathophysiologic mechanisms and therapeutic implications. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2006**, *20*, 298.

Sobre la base de estos hallazgos, se han iniciado estudios clínicos con factores de sensibilización a la insulina, como los agonistas PPAR $\gamma$ . Estos fármacos podrían proporcionar beneficios a través de su acción directa en el cerebro y/o por su influencia en los niveles periféricos de insulina.<sup>94</sup>

El daño de la vía de la insulina se manifiesta con reducción de la protección de la plasticidad sináptica, daño causado por la acumulación de  $\beta$ A y por la sobreactivación de GSK-3 que podría llevar a la hiperfosforilación de tau y a la formación de ovillos neurofibrilares. La resistencia central puede ser consecuencia de la hiperinsulinemia crónica, la hiperglucemia y la resistencia periférica en la *diabetes mellitus* tipo II. La hiperinsulinemia que es modulada por la enzima que degrada la insulina, produce aumento en los depósitos de amiloide. La hiperglucemia puede inducir glicación avanzada de productos finales y estrés oxidativo, que son críticos en la progresión de la EA. La unión del péptido  $\beta$ A a la sinapsis interfiere con la vía de señalización normal de la insulina y con la función cognitiva.<sup>95</sup>

Un estudio que incluyó pacientes con EA leve a moderada y diabetes mellitus demostró que la administración oral de medicamentos anti-diabéticos en combinación con insulina puede disminuir el deterioro cognitivo y mantener la función global de un modo superior a la monoterapia con antidiabéticos orales en un período de un año. Se encuentra en curso un estudio clínico en fase II que evalúa, mediante resonancia magnética funcional, la eficacia de la insulina en la función cognitiva de pacientes con EA leve.<sup>96</sup>

La rosiglitazona, agonista del receptor PPAR $\alpha$ , puede aumentar la sensibilidad a la insulina. En ensayos clínicos, se demostró que produce una mejoría de la función cognitiva y funcional de los pacientes con EA. Sin embargo, los portadores del alelo e4 no obtienen beneficios con rosiglitazona.<sup>97</sup>

---

<sup>94</sup> Gold, M.; Alderton, C.; Zvartau-Hind, M.; Egginton, S.; Saunders, A. M.; Irizarry, M.; Craft, S.; Landreth, G.; Linnamägi, U.; Sawchak, S. Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2010**, *30*, 131.

<sup>95</sup> Ma, Q. L.; Yang, F.; Rosario, E. R.; Ubeda, O. J.; Beech, W.; Gant, D. J.; Chen, P. P.; Hudspeth, B.; Chen, C.; Zhao, Y.; Vinters, H. V.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 9078.

<sup>96</sup> Plastino, M.; Fava, A.; Pirritano, D.; Cotronei, P.; Sacco, N.; Sperli, T.; Spanò, A.; Gallo, D.; Mungari, P.; Consoli, D.; Bosco, D. Effects of insulinic therapy on cognitive impairment in patients with Alzheimer disease and diabetes mellitus type-2. *J. Neurol. Sci.* **2010**, *288*, 112.

<sup>97</sup> Risner, M. E.; Saunders, A. M.; Altman, J. F.; Ormandy, G. C.; Craft, S.; Foley, I. M.; Zvartau-Hind, M. E.; Hosford, D. A.; Roses, A. D. Rosiglitazone in Alzheimer's Disease Study Group. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J.* **2006**, *6*, 246.

### 2.2.11. Factor de crecimiento nervioso

La pérdida de neuronas colinérgicas en el cerebro basal anterior guarda una fuerte correlación con la severidad de la EA, como se ha demostrado en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Los factores de crecimiento nervioso (*Neural growth factor*, NGF) muestran un efecto de protección neuronal, aumentando la función colinérgica por aumento de la acetilcolin transferasa y por favorecer la diferenciación de células progenitoras de neuronas de tipo colinérgico. La sobreexpresión de pro-NGF atenúa la maduración de NGF y aumenta la degradación del NGF maduro, incrementando la producción de  $\beta$ A mediante la vía metabólica amiloidogénica de la APP. Además, el aumento de APP interfiere con la función del NGF lo que es perjudicial para las neuronas colinérgicas.<sup>98</sup> La administración intranasal o mediante implante de NGF recombinante en modelos animales de EA ha logrado el restablecimiento de las neuronas colinérgicas y la recuperación del aprendizaje y la memoria.<sup>99</sup>

### 2.2.12. Regulación de la función serotoninérgica

Se ha destacado la asociación entre la serotonina y las enfermedades neurodegenerativas. Pacientes con EA y deterioro cognitivo leve presentan un incremento de los receptores 5-HT1 que disminuye al progresar la enfermedad, por lo que parece existir una asociación de la reducción de receptores con la gravedad de la demencia. Los estudios han mostrado que los antagonistas 5-HT1 podrían activar el ciclo neuronal mejorando la función cognitiva.<sup>100</sup> El antagonista 5-HT6, por ejemplo, aumenta la transmisión colinérgica, mejora el aprendizaje y la memoria, probablemente ampliando la transmisión monoaminérgica tanto *in vivo* como *in vitro*. Algunos de estos antagonistas (por ejemplo, SB-742456) están ahora en ensayo clínico de fase II. Los agonistas 5-HT4 pueden modular la liberación de acetilcolina a través de la activación de la vía del AMPc y promover el

---

<sup>98</sup> Salehi, A.; Delcroix, J. D.; Belichenko, P. V.; Zhan, K.; Wu, C.; Valletta, J. S.; Takimoto-Kimura, R.; Kleschevnikov, A. M.; Sambamurti, K.; Chung, P. P.; Xia, W.; Villar, A.; Campbell, W. A.; Kulnane, L. S.; Nixon, R. A.; Lamb, B. T.; Epstein, C. J.; Stokin, G. B.; Goldstein, L. S.; Mobley, W. C. Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron* **2006**, *51*, 29.

<sup>99</sup> Gu, H.; Long, D.; Song, C.; Li, X. Recombinant human NGF-loaded microspheres promote survival of basal forebrain cholinergic neurons and improve memory impairments of spatial learning in the rat model of Alzheimer's disease with fimbria-fornix lesion. *Neurosci. Lett.* **2009**, *453*, 204.

<sup>100</sup> Lancôt, K. L.; Hussey, D. F.; Herrmann, N.; Black, S. E.; Rusjan, P. M.; Wilson, A. A.; Houle, S.; Kozloff, N.; Verhoeff, N. P.; Kapur, S. A positron emission tomography study of 5-hydroxytryptamine-1A receptors in Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **2007**, *15*, 888.

aumento del fragmento APP $\alpha$  soluble y reducir la producción de  $\beta$ A. RRX-03140 es un agonista 5-HT4 que se encuentra en fase II en combinación con donepezilo.<sup>101</sup>

### 2.2.13. Restauración de la LTP y la plasticidad sináptica

Los oligómeros de  $\beta$ A pueden causar deterioro de la potenciación a largo plazo (*LTP, long term potentiation*) y en la plasticidad sináptica. Por tanto, el aumento de la LTP y de la plasticidad sináptica por modulación de las moléculas asociadas podría ser efectivo en la terapia de la EA. Los oligómeros  $\beta$ A pueden alterar la fosforilación de la quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II (CaMK II), molécula importante en la generación de la LTP. De este modo ZSET1446 (ST-101) puede estimular CaMK II y la proteína quinasa C (PKC), lo que mejora el efecto cognitivo, demostrado en estudios preclínicos.<sup>102</sup>

Otras vías contribuyen a la plasticidad sináptica, como NO/GMPc/CGK o la cascada de CREB que también pueden ser interrumpidas por  $\beta$ A. Por lo tanto, la mejora de la fosforilación de GMPc mediante la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) puede reforzar la plasticidad sináptica. Un inhibidor de PDE9A, la PF-04447943, ha demostrado aumentar GMPc en LCR. La eficacia en el desarrollo cognitivo, conductual y en general sobre los síntomas de la EA está actualmente bajo investigación en un estudio de fase II.<sup>103</sup>

### 2.2.14. Agentes neurotróficos

Un agente neurotrófico es un compuesto capaz de restaurar la neuroplasticidad, de mejorar la supervivencia de las neuronas, o incluso de la promoción de la neurogénesis; por tanto podría considerarse una terapia para la EA. Entre estos agentes, Cerebrolysin es una preparación de péptidos derivados de cerebros porcinos que se administra por vía parenteral, que actuando como

---

<sup>101</sup> Fan, L.Y.; Chiu, M. J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol. Taiwan* **2010**, *19*, 228.

<sup>102</sup> Han, F.; Shioda, N.; Moriguchi, S.; Yamamoto, Y.; Raie, A. Y.; Yamaguchi, Y.; Hino, M.; Fukunaga, K. Spiro[imidazo[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one (ZSET1446/ST101) treatment rescues olfactory bulbectomy-induced memory impairment by activating Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II and protein kinase C in mouse hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *326*, 127.

<sup>103</sup> Verhoest, P. R.; Fonseca, K. R.; Hou, X.; Proulx-Lafrance, C.; Corman, M.; Helal, C. J.; Claffey, M. M.; Tuttle, J. B.; Coffman, K. J.; Liu, S.; Nelson, F.; Kleiman, R. J.; Menniti, F. S.; Schmidt, C. J.; Vanase-Frawley, M.; Liras, S. Design and discovery of 6-[(3S,4S)-4-methyl-1-(pyrimidin-2-ylmethyl)pyrrolidin-3-yl]-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one (PF-04447943), a selective brain penetrant PDE9A inhibitor for the treatment of cognitive disorders. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9045.

neurotrofina endógena ha demostrado mejorar la función global en estudios clínicos.<sup>104</sup> En ensayos clínicos, Cerebrolysin ha mostrado eficacia en la EA moderada a moderadamente grave. Sin embargo, los beneficios de Cerebrolysin en la EA avanzada necesitan ser confirmados en ensayos más amplios.<sup>105</sup>

Souvenaid® es un producto alimenticio, *dieta multi-nutriente*,<sup>106,107</sup> recientemente desarrollado para su uso en la EA. Contiene una mezcla exclusiva de nutrientes que son precursores de los fosfolípidos esenciales para la salud de la función neuronal. En su composición entran a formar parte ácidos grasos omega-3 (dosis diaria equivalente a 3 ó 4 arenques), uridina y colina (concentración elevada, como en la leche materna), selenio, ácido fólico y las vitaminas B6, B12, C y E. Después de los resultados positivos obtenidos en un ensayo de fase II, en el que se trataron pacientes con EA leve y que registraron mejoras leves en la función cognitiva durante un período de 24 semanas, se encuentra a la espera de entrar en fase III. Este producto fue desarrollado originariamente por investigadores del Instituto de Tecnología de Massachusetts y de la Universidad de Harvard. Se espera que su debut tenga lugar en Europa próximamente, después de una década de estudio.<sup>108</sup>

---

<sup>104</sup> Allegri, R. F.; Guekht, A. Cerebrolysin improves symptoms and delays progression in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Drugs Today (Barc)*. 2012, 48, Suppl A, 25.

<sup>105</sup> Alvarez, X. A.; Cacabelos, R.; Sampedro, C.; Aleixandre, M.; Linares, C.; Granizo, E.; Doppler, E.; Moessler, H. Efficacy and safety of Cerebrolysin in moderate to moderately severe Alzheimer's disease: results of a randomized, double-blind, controlled trial investigating three dosages of Cerebrolysin. *Eur. J. Neurol*. 2011, 18, 59.

<sup>106</sup> Broersen, L. M.; Kuipers, A. A.; Balvers, M.; van Wijk, N.; Savelkoul, P. J.; de Wilde, M. C.; van der Beek, E. M.; Sijben, J. W.; Hageman, R. J.; Kamphuis, P. J.; Kiliaan, A. J. A specific multi-nutrient diet reduces Alzheimer-like pathology in young adult A $\beta$ PP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. *J. Alzheimers Dis*. 2013; 33, 177.

<sup>107</sup> Wiesmann, M.; Jansen, D.; Zerbi, V.; Broersen, L. M.; Garthe, A.; Kiliaan, A. J. Improved spatial learning strategy and memory in aged Alzheimer A $\beta$ PP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice on a multi-nutrient diet. *J. Alzheimers Dis*. 2013, 37, 233.

<sup>108</sup> Nygaard, H. B. Current and emerging therapies for Alzheimer's disease. *Clin. Ther*. 2013, 35, 1480.



### 3. Naftoquinonas. Interés farmacológico



### 3.1. Naftoquinonas. Estructura, distribución y actividades biológicas

Las naftoquinonas son pigmentos naturales cuya característica estructural es la de poseer dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4 o 1,2 del anillo de naftaleno. Su distribución en la naturaleza es amplia ya que se han aislado de plantas, hongos, bacterias, e incluso de animales. Sin embargo, se encuentran en mayor proporción en plantas superiores de determinadas familias de Angiospermas como: *Ebenaceae*, *Droseraceae*, *Bignoniaceae*, *Verbenaceae*, *Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Boraginaceae*, etc.<sup>109</sup> En la naturaleza se presentan con grupos hidroxilo y/o metilo como sustituyentes, además de encontrarse en forma libre o condensada con diversos monosacáridos.<sup>110</sup>

Aunque el primer uso de estos compuestos tuvo lugar en la industria de los pigmentos, debido a sus propiedades tintóreas (lawsona, yuglona), se han descrito numerosas actividades biológicas, destacando como agentes antiparasitarios, antibacterianos, antifúngicos y antitumorales. Y así, diversas naftoquinonas que han sido aisladas de fuentes vegetales (lawsona, yuglona, plumbagina, lapachol, alkanina y shikonina) destacan por su uso en la medicina tradicional.<sup>111</sup>

La actividad biológica de naftoquinonas se ha relacionado, en general, con sus propiedades de oxidación-reducción y ácido-base, que dependen directamente de su estructura química y de la naturaleza electrónica de los sustituyentes en el núcleo naftoquinona.<sup>112,113</sup> En general, se ha descrito que su toxicidad es ocasionada por dos mecanismos principales: generación de especies reactivas de oxígeno, o mediante la formación de aductos con macromoléculas, como ADN y proteínas.<sup>114,115</sup>

En condiciones fisiológicas, las naftoquinonas pueden experimentar una reducción no enzimática por ganancia de un electrón generando la semiquinona, que es una especie de

---

<sup>109</sup> Bruneton, J. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales (2ª ed). Editorial Acribia, 2001.

<sup>110</sup> *Ibidem*.

<sup>111</sup> Kuklinskli, C. Farmacognosia. Editorial Omega, 2000.

<sup>112</sup> Aguilar-Martínez, M.; Cuevas, G.; Jiménez-Estrada, M.; González, I.; Lotina-Hennsen, B.; Macías-Ruvalcaba, N. An experimental and theoretical study of the substituent effects on the redox properties of 2-[(R-phenyl) amine]-1,4-naphthalenediones in acetonitrile. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3684.

<sup>113</sup> Tauraitė, D.; Razumas, V.; Butkus, E. Lipophilic 1,4-naphthoquinone derivatives: synthesis and redox properties in solution and entrapped in the aqueous cubic liquid-crystalline phase of monoolein. *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *159*, 45.

<sup>114</sup> Bergeron, F.; Klarskov, K.; Hunting, D. J.; Wagner, J. R. Near-UV photolysis of 2-methyl-1,4-naphthoquinone-DNA duplexes: characterization of reversible and stable interstrand cross-links between quinones and adenine moieties. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 745.

<sup>115</sup> Wang, Y. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 276.

moderada toxicidad, mediante la transferencia electrónica de un radical apropiado.<sup>116</sup> La formación de la semiquinona también puede llevarse a cabo enzimáticamente, usualmente por una reacción de reducción mediada por flavoenzimas. La reducción de la naftoquinona puede seguir un mecanismo de un electrón, en el que participan la NADPH-citocromo P450 reductasa, NADH deshidrogenasa y la NADP ferredoxina reductasa, y por un mecanismo mixto de reducción por uno y dos electrones, con participación de las enzimas NAD(P)H deshidrogenasa (ó DT-Diaforasa) y la lipoamida deshidrogenasa. En condiciones aeróbicas, los radicales semiquinona pueden auto-oxidarse para regenerar la quinona con la subsecuente formación de aniones superóxido para generar peróxido de hidrógeno. Tanto las especies activas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno resultan particularmente tóxicos para la célula, alterando en última instancia procesos celulares básicos como la biosíntesis de ácidos nucleicos y los mecanismos responsables de la síntesis de energía en forma de ATP.<sup>117</sup>

La plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona) se encuentra en las hojas, corteza y raíces de especies de géneros como *Plumbago* (*Plumbaginaceae*), *Drosera* (*Droseraceae*) y *Diospyros* (*Ebenaceae*).<sup>118,119</sup> Se ha descrito el uso de *Plumbago zeylanica* en el tratamiento del dolor reumático, destacando a la plumbagina como responsable del efecto analgésico. Otras actividades que se han descrito acerca de la plumbagina son antiespasmódica, antibacteriana, antifúngica antiparasitaria y antitumoral.<sup>120</sup>

El lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona), que se encuentra en la corteza y madera de los géneros *Tabebuia* spp. y *Tecoma* spp. (*Bignoniaceae*), destaca por su actividad antitumoral, antibacteriana, antimalárica y antifúngica.<sup>121</sup>

---

<sup>116</sup> Bergeron, F.; Klarskov, K.; Hunting, D. J.; Wagner, J. R. Near-UV photolysis of 2-methyl-1,4-naphthoquinone-DNA duplexes: characterization of reversible and stable interstrand cross-links between quinones and adenine moieties. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 745.

<sup>117</sup> Lin, P. H.; Pan, W. C.; Kang, Y. W.; Chen, Y. L.; Lin, C. H.; Lee, M. C.; Chou, Y. H.; Nakamura, J. Effects of naphthalene quinonoids on the induction of oxidative DNA damage and cytotoxicity in calf thymus DNA and in human cultured cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1262.

<sup>118</sup> Bruneton, J. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales (2ª ed). Editorial Acriba, **2001**.

<sup>119</sup> Kuklinski, C. Farmacognosia. Editorial Omega, **2000**.

<sup>120</sup> Padhye, S.; Dandawate, P.; Yusufi, M.; Ahmad, A.; Sarkar, F. H. Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 1131.

<sup>121</sup> Lu, J. J.; Bao, J. L.; Wu, G. S.; Xu, W. S.; Huang, M. Q.; Chen, X. P.; Wang, Y. T. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 456.

La alkanina (5,8-dihidroxi-2-(1(S)-hidroxi-4-metil-3-pentenil)-1,4-naftoquinona), que se ha aislado de la raíz desecada de *Ancusa* (*Alkanna tinctoria*, *Boraginaceae*),<sup>122</sup> se ha utilizada por sus propiedades colorantes en la detección histoquímica de aceites y grasas. En cambio, su enantiómero, la shikonina (semillas del mijo, *Lithospermum officinae*), se ha utilizado por sus propiedades antiinflamatorias en el tratamiento de quemaduras, heridas y úlceras. El mecanismo de la acción antiinflamatorio se ha explicado últimamente por su acción inhibitoria del proteasoma.<sup>123</sup>

La búsqueda de nuevos agentes antitrombóticos ha conducido al desarrollo de los compuestos 2-cloro-3-(3,5-diterbutil-4-hidroxifenil)-1,4-naftoquinona (CP201), 2-cloro-3-(4-etoxicarbonilfenilamino)-1,4-naftoquinona (NQ12), 2-cloro-3-(4-acetilfenilamino)-1,4-naftoquinona (NQ301), 2-cloro-3-(4-hexilfenilamino)-1,4-naftoquinona (NQ304) y 2-cloro-3-(2'-bromo-4'-fluorofenilamino)-8-hidroxi-1,4-naftoquinona (J78). Estos derivados de 1,4-naftoquinona mostraron efecto inhibitor en la agregación plaquetaria en plasma humano *in vitro* y en la trombosis pulmonar *in vivo*.<sup>124,125</sup>

#### 3.2. Naftoquinonas. Potencial actividad neuroprotectora

Se han descrito importantes mecanismos de acción de diversas naftoquinonas, mediante sistemas *in vitro* y/o modelos *in vivo*, que explican sus propiedades neuroprotectoras.

Diferentes derivados de la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona han demostrado que pueden actuar como agonistas del PPAR $\gamma$ . Este receptor se encuentra en neuronas y es capaz de regular la vulnerabilidad neuronal. En modelos *in vitro* e *in vivo* de excitotoxicidad neuronal glutamatérgica, los agonistas PPAR $\gamma$  reducen de forma significativa la muerte neuronal. Por tanto, estos derivados de

---

<sup>122</sup> Assimopoulou, A. N.; Sturm, S.; Stuppner, H.; Papageorgiou, V. P. Preparative isolation and purification of alkannin/shikonin derivatives from natural products by high-speed counter-current chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 182.

<sup>123</sup> Lu, L.; Qin, A.; Huang, H.; Zhou, P.; Zhang, C.; Liu, N.; Li, S.; Wen, G.; Zhang, C.; Dong, W.; Wang, X.; Dou, Q. P.; Liu, J. Shikonin extracted from medicinal Chinese herbs exerts anti-inflammatory effect via proteasome inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *11*, 658, 242.

<sup>124</sup> Yuk, D. Y.; Ryu, Ch. K.; Hong, J. T.; Chung, K. H.; Kang, W. S.; Kim, Y.; Yoo, M. K.; Lee, Ch. H.; Yun, Y. P. Antithrombotic and antiplatelet activities of 2-chloro-3-[4-(ethylcarboxy)-phenyl]-amino-1,4-naphthoquinone (NQ12), a newly synthesized 1,4-naphthoquinone derivative. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1001.

<sup>125</sup> Jin, Y. R.; Cho, M. R.; Ryu, Ch. K.; Chung, J. H.; Yuk, D. Y.; Hong, J. T.; Lee, K. S.; Lee, J. J.; Lee, M. L.; Lim, Y.; Yun, Y. P. Antiplatelet activity of J78 (2-chloro-3-[2'-bromo-4'-fluoro-phenyl]-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone), an antithrombotic agent, is mediated by thromboxane (TX) A2 receptor blockade with TXA2 synthase inhibition and suppression of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 214.

2-hidroxi-1,4-naftoquinona podrían sugerirse como candidatos para su estudio en el tratamiento de patologías neurológicas.<sup>126,127</sup>

En el contexto de la potencial acción neuroprotectora de algunas naftoquinonas, resulta interesante mencionar un mecanismo de acción, la *hormesis*, que comparten diversos compuestos fitoquímicos.<sup>128,129</sup> Este fenómeno se define como una estimulación de la protección celular a dosis bajas y una inhibición de la misma a dosis altas de compuesto, lo que resulta en una curva dosis-respuesta en forma de J o de U invertida. La respuesta hormética es transitoria, dinámica y puede ser mediada por la activación o inactivación de enzimas, por la modificación de una gran cantidad de genes o bien por ambos procesos.<sup>130</sup> Por tanto, la exposición de un organismo vivo al compuesto (estresor), en un rango de dosis baja (dosis subtóxicas) desencadenaría una respuesta de adaptación que aumentaría la resistencia al estrés. Un compuesto tóxico que produzca efecto de *hormesis* presenta a dosis bajas el efecto contrario al que tiene a dosis más elevadas. En particular, acerca de la plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona) se ha descrito su capacidad para aumentar la resistencia neuronal al estrés en células de neuroblastoma y neuronas corticales primarias mediante la activación de la vía Nrf2/ARE.<sup>131</sup> El factor de transcripción Nrf2 regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (*Antioxidant Response Element*), que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa. La activación de esta vía Nrf2/ARE por medio de compuestos, como la plumbagina, podría proteger a las neuronas frente al daño oxidativo, metabólico y excitotóxico involucrados en el accidente cerebrovascular isquémico y en enfermedades neurodegenerativas.

La evidencia epidemiológica sugiere una menor incidencia de enfermedad de parkinson en los fumadores respecto de los no fumadores. Esta evidencia, junto con los niveles más bajos de actividad monoamina oxidasa (MAO) cerebral en los fumadores y las propiedades neuroprotectoras de inhibidores de MAO ha conducido al interés en la identificación de principios activos en el tabaco

---

<sup>126</sup> Sundriyal, S.; Viswanad, B.; Ramarao, P.; Chakraborti, A. K.; Bharatam, P. V. New PPARgamma ligands based on barbituric acid: virtual screening, synthesis and receptor binding studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4959.

<sup>127</sup> Zhao, X.; Ou, Z.; Grotta, J. C.; Waxham, N.; Aronowski, J. Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity. *Brain Res.* **2006**, *1073-1074*, 460.

<sup>128</sup> Calabrese, E. J. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Hum. Exp. Toxicol.* **2010**, *29*, 249.

<sup>129</sup> Murakami, A. Modulation of protein quality control systems by food phytochemicals. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2013**, *52*, 215.

<sup>130</sup> López-Díazguerrero, N. E.; González Puertos, V. Y.; Hernández-Bautista, R. J.; Alarcón-Aguilar, A.; Luna-López, A.; Königsberg Fainstein, M. Hormesis: What doesn't kill you makes you stronger. *Gac. Med. Mex.* **2013**, *149*, 438.

<sup>131</sup> Son, T. G.; Camandola, S.; Arumugam, T. V.; Cutler, R. G.; Telljohann, R. S.; Mughal, M. R.; Moore, T. A.; Luo, W.; Yu, Q. S.; Johnson, D. A.; Johnson, J. A.; Greig, N. H.; Mattson, M. P. Plumbagin, a novel Nrf2/ARE activator, protects against cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **2010**, *112*, 1316.

responsables de la inhibición de MAO. En esta búsqueda se ha encontrado una naftoquinona en la planta y humo del tabaco, la 2,3,6-trimetil-1,4-naftoquinona (TMN), cuyas propiedades neuroprotectoras se han puesto de manifiesto en un modelo murino C57BL/6 de neurodegeneración por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).<sup>132,133</sup> Esta naftoquinona es un inhibidor de MAO-A y MAO-B, y cuando se administra a dosis que conducen a concentraciones cerebrales adecuadas para inhibir competitivamente la MAO-B protege al animal de la disminución de los niveles de dopamina neostriatal provocada por MPTP.

De gran interés son las propiedades antiinflamatorias de la  $\beta$ -lapachona (2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[h]cromeno-5,6-diona), una *orto*-naftoquinona que se ha aislado de *Tabebuia avellanae*. Se ha demostrado que esta naftoquinona inhibe la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), y modera la expresión de RNAm de citoquinas proinflamatorias, como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ ,<sup>134</sup> mecanismos que pueden ser responsables de un potencial efecto neuroprotector. Otras naftoquinonas con efectos interesantes, derivadas de lapachona, son 9-hidroxi- $\alpha$ -lapachona y 4,9-dihidroxi- $\alpha$ -lapachona, aisladas de *Catalpa ovata*, han mostrado potentes efectos inhibitorios en la producción de NO en la línea celular RAW 264.7 de macrófagos murinos activados con lipopolisacárido (LPS).<sup>135</sup>

Ciertas naftoquinonas derivadas de isobutirilshikonina y isovalerilshikonina, que se han aislado de la raíz de *Lithospermum erythrorhizon*, proporcionan neuroprotección mediante la reducción de la liberación de mediadores proinflamatorios de microglía primaria cuando es activada con LPS.<sup>136</sup>

En la interacción con la vía amiloidogénica de procesamiento de APP, se ha descrito que la yuglona, la 1,2-naftoquinona y la 5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona protegen las células de

---

<sup>132</sup> Castagnoli, K.; Petzer, J. B.; Steyn, S. J.; van der Schyf, C. J.; Castagnoli, N. Jr. Inhibition of human MAO-A and MAO-B by a compound isolated from flue-cured tobacco leaves and its neuroprotective properties in the MPTP mouse model of neurodegeneration. *Inflammopharmacology* **2003**, *11*, 183.

<sup>133</sup> Castagnoli, K. P.; Steyn, S. J.; Petzer, J. P.; Van der Schyf, C. J.; Castagnoli, N, Jr. Neuroprotection in the MPTP Parkinsonian C57BL/6 mouse model by a compound isolated from tobacco. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 523.

<sup>134</sup> Moon, D. O.; Choi, Y. H.; Kim, N. D.; Park, Y. M.; Kim, G. Y. Anti-inflammatory effects of beta-lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Int. Immunopharmacol.* **2007**, *7*, 506.

<sup>135</sup> Park, B. M.; Hong, S. S.; Lee, C.; Lee, M. S.; Kang, S. J.; Shin, Y. S.; Jung, J. K.; Hong, J. T.; Kim, Y.; Lee, M. K.; Hwang, B. Y. Naphthoquinones from *Catalpa ovata* and their inhibitory effects on the production of nitric oxide. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 381.

<sup>136</sup> Nam, K. N.; Son, M. S.; Park, J. H.; Lee, E. H. Shikonins attenuate microglial inflammatory responses by inhibition of ERK, Akt, and NF-kappaB: neuroprotective implications. *Neuropharmacology* **2008**, *55*, 819.

neuroblastoma mediante la inhibición en la formación *in vitro* de las fibrillas de  $\beta$ A.<sup>137</sup> Además, la yuglona y la 1,2-naftoquinona inhiben la formación *in vitro* de oligómeros de dicho péptido.<sup>138</sup> Entre otros inhibidores de la agregación del péptido  $\beta$ A destacan también la rifampicina y sus derivados, que poseen una estructura de naftohidroquinona o naftoquinona, así como las tetraciclinas y la doxiciclina.<sup>139</sup>

Finalmente, compuestos derivados de la estructura 1,4-naftoquinona se han identificado como una nueva clase de inhibidores de Hsp90 que podrían tener utilidad no sólo en el tratamiento del cáncer sino en numerosos trastornos neurodegenerativos, incluyendo la EA y la enfermedad de parkinson, en las que la agregación de proteínas es la etiología común.<sup>140</sup> Y así, el aumento en la expresión de Hsp90 en respuesta a la inhibición de Hsp90 por 1,4-naftoquinonas resulta en un descenso de la toxicidad por los agregados de  $\beta$ A y de tau.<sup>141,142</sup>

---

<sup>137</sup> Kim, H.; Park, B. S.; Lee, K. G.; Choi, C. Y.; Jang, S. S.; Kim, Y. H.; Lee, S. E. Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8537.

<sup>138</sup> Necula, M.; Kaye, R.; Milton, S.; Glabe, C. G. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10311.

<sup>139</sup> Forloni, G.; Colombo, L.; Girola, L.; Tagliavini, F.; Salmona, M. Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett.* **2001**, *487*, 404.

<sup>140</sup> Hadden, M. K.; Hill, S. A.; Davenport, J.; Matts, R. L.; Blagg, B. S. Synthesis and evaluation of Hsp90 inhibitors that contain the 1,4-naphthoquinone scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 634.

<sup>141</sup> Lu, Y.; Ansar, S.; Michaelis, M. L.; Blagg, B. S. Neuroprotective activity and evaluation of Hsp90 inhibitors in an immortalized neuronal cell line. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1709.

<sup>142</sup> Hadden, M. K.; Hill, S. A.; Davenport, J.; Matts, R. L.; Blagg, B. S. Synthesis and evaluation of Hsp90 inhibitors that contain the 1,4-naphthoquinone scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 634.

## 4. Piridazinonas y piridazinas. Interés farmacológico



#### 4.1. Piridazinonas

Las moléculas con estructura de piridazinona presentan un amplio espectro de actividades biológicas, tales como antiasmática, antialérgica, molusquicida, herbicida, antiulcerosa, ansiolítica y antidepressiva.<sup>143</sup> Estas entidades químicas poseen afinidad *in vitro* por los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ,<sup>144</sup> presentan analogía estructural con los neurotransmisores GABA y glutamato<sup>145</sup> y, son antagonistas de receptores de adenosina A1.<sup>146</sup> Algunos de estos compuestos se han utilizado como radiotrazadores para la obtención de imágenes cerebrales<sup>147</sup> y de miocardio<sup>148</sup> de rata.

Un gran número de piridazinonas tienen utilidad como agentes terapéuticos. La estructura de piridazinona forma parte del esqueleto de fármacos disponibles en la clínica, como por ejemplo, la hidralazina para el tratamiento de la hipertensión en el embarazo y, la minaprina<sup>149</sup> y pipofezina<sup>150</sup> para el tratamiento de la depresión.

Se han descrito múltiples actividades farmacológicas de diversas piridazinonas, entre las que destacan las siguientes:<sup>151</sup>

- Actividad cardiovascular: 4,5 dihidro-6-[2-[4-(1H-imidazol1-il)fenil]etenil-3(2H)-piridazinonas con actividad inotropa, vasodilatadora e inhibidora de la agregación plaquetaria;  $\pm$ 6-(4-(bencilamino)-7-1-H-quinazolinil)-4,5-dihidro-metil-5-3-(2H)piridazinona con actividad.
- cardiotónica; derivados 5-cloro-2 cianofenoxi con actividad hipotensora por bloqueo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

<sup>143</sup> Asif, M. Some recent approaches of biologically active substituted pyridazine and phthalazine drugs. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2984

<sup>144</sup> Barbaro, R.; Betti, L.; Botta, M.; Corelli, F.; Giannaccini, G.; Maccari, L.; Manetti, F.; Strappaghetti, G.; Corsano, S. Synthesis, biological evaluation, and pharmacophore generation of new pyridazinone derivatives with affinity toward  $\alpha_1(1)$ - and  $\alpha_2(2)$ -adrenoceptors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2118.

<sup>145</sup> Greenwood, J. R.; Vaccarella, G.; Capper, H. R.; Mewett, K. N.; Allan, R. D.; Johnston, G. A. R. Theoretical studies on the free-radical bromination of methyl-pyridazines in the synthesis of novel heterocyclic analogues of neurotransmitters. *J. Mol. Struct. Theochem.* **1996**, *368*, 235.

<sup>146</sup> Matsuya, T.; Takamatsu, H.; Murakami, Y.; Noda, A.; Ichise, R.; Awaga, Y.; Nishimura, S. Synthesis and evaluation of [11C]FR194921 as a nonxanthine-type PET tracer for adenosine A1 receptors in the brain. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 837.

<sup>147</sup> *Ibidem*.

<sup>148</sup> Purohit, A.; Radeke, H.; Azure, M.; Hanson, K.; Benetti, R.; Su, F.; Yalamanchili, P.; Yu, M.; Hayes, M.; Guaraldi, M.; Kagan, M.; Robinson, S.; Casebier, D. Synthesis and biological evaluation of pyridazinone analogues as potential cardiac positron emission tomography tracers. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2954.

<sup>149</sup> Chico, L. K.; Behanna, H. A.; Hu, W.; Zhong, G.; Roy, S. M.; Watterson, D. M. Molecular properties and CYP2D6 substrates: central nervous system therapeutics case study and pattern analysis of a substrate database. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 2204.

<sup>150</sup> Aleeva, G. N.; Molodavkin, G. M.; Voronina, T. A. Comparison of antidepressant effects of azafan, tianeptine, and paroxetine. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2009**, *148*, 54.

<sup>151</sup> Banerjee, P. S. Various Biological Activities of Pyridazinone Ring Derivatives. *Asian J. Chem.* **2011**, *23*, 1905.

- Actividad antiinflamatoria: heterociclos tales como 2-(2-benzotiazolil) y 2-(2-benzimidazolil)-6-aril-4,5-dihidro-3(2H)-piridazinonas.
- Actividad analgésica: 4-amino-2-fenil-6-metil-3-piridazinonas.
- Actividad antinociceptiva: piridazinonas con funciones morfolino, arilpiperidino o arilpiperazino en posición 6, con mayor actividad que el propio ácido acetilsalicílico.
- Actividad antidepresiva: la minaprina ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de varios desórdenes depresivos. El derivado 3-amino-6-fenilpiridazina representa a una nueva clase de compuestos con actividad psicótropa. El derivado 5-disustituido benciliden piridazina ha demostrado ser un antidepresivo eficaz.
- Actividad anticonvulsivante: 4,6 diaril-3-piridazinonas o n-etoxicarbonilalquil piridazinonas, 3-oxo-5-sustituido benciliden-6-metil-(4H)-2-piridazinilacetamidas y 2-piridazinacetilhidracidas, que han demostrado mejor efecto anticonvulsivante que el propio valproato sódico.

Una serie de pirrolopiridazinonas, carentes de toxicidad, han mostrado una potente actividad analgésica en el modelo de analgesia periférica en ratón ("prueba de contorsión"). Los compuestos más potentes presentaron actividad analgésica a la dosis de submiligramos y fueron del orden de 100-1000 veces más activos que el ácido acetilsalicílico. En el modelo de analgesia central ("placa caliente") uno de los compuestos de esta serie de pirrolopiridazinonas mostró cierta afinidad por los receptores opioides  $\mu$ , comparable a la del tramadol en ensayos de radioligando, lo que sugiere que posee un perfil de actividad analgésica que implica un mecanismo opioide  $\mu$ .<sup>152</sup>

Se han identificado dos derivados de piridazinona con potente actividad inhibidora selectiva de ciclooxigenasa-2 (COX-2), uno con sustitución N-bencil y un grupo isopropoxi en su estructura, y el otro con un *trans* (S,S) N-ciclopropilmetil. Ambos han mostrado una excelente eficacia en modelos animales de inflamación de rata, en el edema de pata y en ensayos de piresis.<sup>153</sup>

Los derivados de 5-metildihidropiridazinona, inhibidores de fosfodiesterasa 3 (PDE3), presentan actividad inhibitoria de la broncoconstricción inducida por histamina en cobaya y en un modelo de inflamación inducida por LPS en rata. Los derivados que presentan benzotiazol y

---

<sup>152</sup> Malinka, W.; Redzicka, A.; Jastrzębska-Więsek, M.; Filipiek, B.; Dybała, M.; Karczmarzyk, Z.; Urbańczyk-Lipkowska, Z.; Kalicki, P. Derivatives of pyrrolo[3,4-d]pyridazinone, a new class of analgesic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4992.

<sup>153</sup> Ochiai, K.; Takita, S.; Eiraku, T.; Kojima, A.; Iwase, K.; Kishi, T.; Fukuchi, K.; Yasue, T.; Adams, D. R.; Allcock, R. W.; Jiang, Z.; Kohno, Y. Phosphodiesterase inhibitors. Part 3: Design, synthesis and structure-activity relationships of dual PDE3/4-inhibitory fused bicyclic heteroaromatic-dihydropyridazinones with anti-inflammatory and bronchodilatory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1644.

quinolina en su molécula mostraron mejores resultados en los ensayos *in vitro* de inhibición del enzima PDE, respecto al resto.<sup>154</sup>

Los derivados de 2H-piridazin-3-ona y 6-cloropiridazina presentan actividad *captadora* de radicales superóxido y actividad inhibidora de la peroxidación lipídica. Sólo algunas de las 2H-piridazin-3-onas mostraron potente actividad *captadora* de radicales hidroxilo en condiciones *in vitro*.<sup>155</sup>

Estudios de *docking* han puesto de manifiesto que una serie de piridazinonas 2,6-disustituidas pueden comportarse como inhibidores de la AChE mediante una nueva conformación de unión de la piridazinona al sitio de unión dual del enzima. En ensayos *in vitro* han mostrado una elevada actividad inhibidora y gran selectividad por la AChE frente a la BuChE.<sup>156</sup>

El 6-metil-2-[4-(naftilpiperazin-1-il)-butil]-3-(2H)piridazinona (F-97013-GD) es un compuesto antipsicótico que en ensayos *in vitro* e *in vivo* presenta actividad mixta agonista-antagonista de receptores D2 y actividad agonista parcial de receptores 5-HT1A. También ha mostrado efectos antitremorígenos potentes en ensayos conductuales de rata y ratón.<sup>157</sup>

Una nueva clase de derivados de piridopiridazin-6-ona con actividad inhibidora de p38 MAP quinasa<sup>158</sup> han mostrado ser eficaces en el modelo de inflamación de rata inducido por LPS, y en su posible mecanismo se ha observado que suprimen la producción de TNF $\alpha$  bloqueando la cascada de transducción de señales de las p38 MAP quinasas.<sup>159</sup> Las piridazinonas 5-sustituido-N-arilo también poseen actividad inhibidora de p38 MAP quinasas aunque moderada.<sup>160</sup>

---

<sup>154</sup> Ochiai, K.; Takita, S.; Eiraku, T.; Kojima, A.; Iwase, K.; Kishi, T.; Fukuchi, K.; Yasue, T.; Adams, D. R.; Allcock, R. W.; Jiang, Z.; Kohno, Y. Phosphodiesterase inhibitors. Part 3: Design, synthesis and structure–activity relationships of dual PDE3/4-inhibitory fused bicyclic heteroaromatic-dihydropyridazinones with anti-inflammatory and bronchodilatory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1644.

<sup>155</sup> Caliskan-Ergün, B.; Süküroğlu, M.; Coban, T.; Banoğlu, E.; Suzen, S. Screening and evaluation of antioxidant activity of some pyridazine derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 225.

<sup>156</sup> Xing, W.; Fu, Y.; Shi, Z.; Lu, D.; Zhang, H.; Hu, Y. Discovery of novel 2,6-disubstituted pyridazinone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 95.

<sup>157</sup> Zazpe, A.; Artaiz, I.; Innerarity, A.; del Olmo, E.; Castro, E.; Labeaga, L.; Pazos, A.; Orjales, A. In vitro and in vivo characterization of F-97013-GD, a partial 5-HT1A agonist with antipsychotic- and antiparkinsonian-like properties. *Neuropharmacology* **2006**, *51*, 129.

<sup>158</sup> Tynebor, R. M.; Chen, M. H.; Natarajan, S. R.; O'Neill, E. A.; Thompson, J. E.; Fitzgerald, C. E.; O'Keefe, S. J.; Doherty, J. B. Synthesis and biological activity of pyridopyridazin-6-one p38 MAP kinase inhibitors. Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 411.

<sup>159</sup> Jerome, K. D.; Hepperle, M. E.; Walker, J. K.; Xing, L.; Devraj, R. V.; Benson, A. G.; Baldus, J. E.; Selness, S. R. Discovery of 5-substituted-N-arylpyridazinones as inhibitors of p38 MAP kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3146.

<sup>160</sup> Tao, M.; Raddatz, R.; Aimone, L. D.; Hudkins, R. L. Synthesis and structure–activity relationships of 4,5-fused pyridazinones as histamine H3 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6126.

Finalmente, se ha descrito para el compuesto 5-[4(ciclobutil-piperidin-4-iloxi)-fenil]-6-metil-2H-piridazin-3-ona que posee actividad antagonista/agonista inverso del receptor de histamina H3 en el modelo de dipsogenia de rata y, además, muestra un excelente perfil de seguridad en ensayos de genotoxicidad *in vitro*.<sup>161</sup> El modelo de dipsogenia en rata se utiliza como modelo *in vivo* para determinar la inhibición del receptor de histamina H3 en cerebro tras la administración periférica del compuesto en estudio. El receptor de histamina H3 receptor se expresa predominantemente en el SNC, donde funciona como autorreceptor, modulando la liberación de histamina, y como heterorreceptor, regulando la liberación de múltiples neurotransmisores como acetilcolina, histamina, noradrenalina y dopamina. Los antagonistas H3 están siendo actualmente evaluados como potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de déficits cognitivos asociados con diversas patologías del SNC, entre las que se encuentra la EA. La actividad de 5-[4(ciclobutil-piperidin-4-iloxi)-fenil]-6-metil-2H-piridazin-3-ona descrita en este modelo podría ser predictiva de su potencial eficacia en la función cognitiva.

El enzima monoamino oxidasa (MAO) juega un papel fundamental en la regulación de diversos neurotransmisores como serotonina, noradrenalina y dopamina. En los mamíferos existen dos isoformas de MAO, MAO-A y MAO-B, que se encuentran unidas a la membrana mitocondrial externa. MAO-A metaboliza preferentemente serotonina, noradrenalina y dopamina, mientras que MAO-B posee mayor afinidad por feniltetilamina y benzilamina. La inhibición de MAO-B constituye una estrategia terapéutica en el tratamiento adyuvante de la enfermedad de parkinson. En la década pasada se describieron diversas series de compuestos inhibidores reversibles de MAO y algunos de ellos permitieron la identificación del núcleo 5H-indeno-[1,2-c]piridazina como estructura base en el diseño de inhibidores selectivos de MAO-B.<sup>162</sup> Así, por ejemplo, los derivados de 5H-indeno [1,2-c]piridazin-5-ona han mostrado actividades inhibitoras de MAO en ensayos *in vitro* utilizando isoformas recombinantes HMAO que se expresan en células BTI (células de insecto infectadas con el baculovirus *Bacillus thuringiensis israelensis*). Entre estos derivados, se ha encontrado que el compuesto 3-metil-8-*m*-clorobenciloxi-5H-indeno[1,2-c]piridazin-5-ona, es el más activo y selectivo

---

<sup>161</sup> Tao, M.; Aimone, L. D.; Gruner, J. A.; Mathiasen, J. R.; Huang, Z.; Lyons, J.; Raddatz, R.; Hudkins, R. L. Synthesis and structure-activity relationship of 5-pyridazin-3-one phenoxy piperidines as potent, selective histamine H(3) receptor inverse agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1073.

<sup>162</sup> Kneubühler, S.; Thull, U.; Altomare, C.; Carta, V.; Gaillard, P.; Carrupt, P.-A.; Carotti, A.; Testa, B. Inhibition of monoamine oxidase-B by 5H-indeno[1,2-c]pyridazines: biological activities, quantitative structure-activity relationships (QSARs) and 3DQSARs. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3874.

de MAO-B dentro de esta serie.<sup>163</sup> El descubrimiento de inhibidores reversibles y selectivos ha supuesto una renovación por el interés en las enzimas MAO como dianas de fármacos.

---

<sup>163</sup> Carotti, A.; Catto, M.; Leonetti, F.; Campagna, F.; Soto-Otero, R.; Mendez-Alvarez, E.; Thull, U.; Testa, B.; Altomare, C. Synthesis and monoamine oxidase inhibitory activity of new pyridazine-, pyrimidine- and 1,2,4-triazine-containing tricyclic derivatives. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5364.

## 4.2. Piridazinas

Se han descrito diversas actividades para estructuras de piridazina, relacionadas con dianas farmacológicas involucradas en la enfermedad de Alzheimer (EA). Algunas de estas moléculas y su actividad se describen a continuación.

La 3-[2-(1-bencilpiperidin-4-il)-etilamino]-6-fenilpiridazina presenta una buena actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa de estriado de rata y de eritrocitos, respectivamente. Este compuesto, además, posee una potencia comparable a la tacrina, y la selectividad por AChE es aproximadamente 10 veces más favorable en comparación con donepezilo.<sup>164</sup> El derivado 3-[2-(1-bencilpiperidin-4-il)-etilamino]-5-metil-6-fenilpiridazina también presenta actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa, y en estudios *in vitro* ha mostrado una selectividad por AChE 100 veces mayor que la tacrina.<sup>165</sup> Mediante técnicas de *patch clamp* se demostró que las 3-bencidino-6(4-clorofenil)piridazinas reducían la corriente a través de los canales de potasio, haciendo los potenciales más positivos, en neuronas piramidales aisladas de hipocampo de rata.<sup>166</sup>

Una serie de pirazolo [1,5-b] piridazinas ha mostrado una elevada potencia y selectividad en la inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Entre ellas, diversos compuestos poseían buen perfil *in vitro* en la inhibición de prostaglandina PGE2 y derivados del ácido araquidónico en células COS estimuladas (fibroblastos sinoviales) e *in vivo* en un modelo de inflamación en pata de rata inducido con el Adyuvante Completo de Freund.<sup>167</sup>

Se ha descrito actividad moduladora del enzima  $\gamma$ -secretasa para la N-[(1S)-1-(4-fluorofenil)-etil-6-[3-metoxi-4-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-fenil]-4-metoxipiridazin-3-amina que se ha puesto de manifiesto mediante la disminución del cociente  $\beta$ A1-42/1-40 en la línea celular de neuroblastoma

---

<sup>164</sup> Contreras, J. M.; Rival, Y. M.; Chayer, S.; Bourguignon, J. J.; Wermuth, C. G. Aminopyridazines as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 730.

<sup>165</sup> Contreras, J. M.; Parrot, I.; Sippl, W.; Rival, Y. M.; Wermuth, C. G. Design, synthesis, and structure-activity relationships of a series of 3-[2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethylamino]pyridazine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2707.

<sup>166</sup> Du, H. Z.; Zhang, C. F.; Li, M. Y.; Yang, P. 3-Benzidino-6(4-chlorophenyl) pyridazine blocks delayed rectifier and transient outward potassium current in acutely isolated rat hippocampal pyramidal neurons. *Neurosci. Lett.* **2006**, *402*, 159.

<sup>167</sup> Beswick, P.; Bingham, S.; Bountra, C.; Brown, T.; Browning, K.; Campbell, I.; Chessell, I.; Clayton, N.; Collins, S.; Corfield, J.; Guntrip, S.; Haslam, C.; Lambeth, P.; Lucas, F.; Mathews, N.; Murkit, G.; Naylor, A.; Pegg, N.; Pickup, E.; Player, H.; Price, H.; Stevens, A.; Stratton, S.; Wiseman, J. Identification of 2,3-diaryl-pyrazolo[1,5-b]pyridazines as potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5445.

SH-SY5Y-APPswe.<sup>168</sup> Otro compuesto con efecto sobre el péptido  $\beta$ A es el N,N'-bis-(3-hidroxifenil)-piridazina 3,6-diamino (RS-0406), capaz de inhibir la fibrillogénesis de  $\beta$ A1-42 *in vitro*, mejorar la viabilidad de cultivos primarios de hipocampo de rata Wistar pretratados con  $\beta$ A, y mejorar la LTP en cultivo de microcortes hipocampales.<sup>169</sup>

Las aminotienopiridazinas (ATPZ) son moléculas capaces de inhibir la agregación de Tau. Junto a la actividad antiagregante *in vitro*, muestran propiedades farmacocinéticas favorables. Los estudios llevados a cabo con estos compuestos indican que el esqueleto de tienopiridazina es esencial para la inhibición de la fibrilación de Tau *in vitro*, mientras que los sustituyentes mejoran las propiedades farmacocinéticas. En cuanto al perfil de toxicidad *in vivo*, por ejemplo, el compuesto 5-amino-N-ciclopropil-3-(4-fluorofenil)-4-oxo-3,4-dihidrotieno [3,4-d] piridazina-1-carboxamida no presenta efectos secundarios notables a una dosis oral de 50 mg/kg/día.<sup>170,171</sup>

La actividad inhibidora de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) se ha puesto de manifiesto con la N-fenil-4-pirazolo [1,5-b] piridazin-3-ilpirimidin-2-amina, tanto a nivel celular, en estudios *in vitro* enzimáticos, como en ensayos de radioligando.<sup>172</sup> Otros compuestos tipo pirazolo [3,4-c] piridazina también han demostrado actividad inhibidora de GSK-3 $\beta$  determinada mediante la acumulación de glucógeno celular.<sup>173</sup>

Diversos estudios han mostrado que diversas piridazinas poseen actividad antiinflamatoria. Así, las 3,4-bis(4-metoxifenil)-piridazinas, sustituidas en posición 6, son capaces de inhibir la producción de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en células HL-60 (línea celular promielocítica humana)

---

<sup>168</sup> Wan, Z. H.; Hall, A.; Jin, Y.; Xiang, J. N.; Yang, E.; Eatherton, A.; Smith, B.; Yang, G.; Yu, H. H.; Wang, J.; Ye, L.; Lau, L. F.; Yang, T.; Mitchell, W.; Cai, W.; Zhang, X. M.; Sang, Y. X.; Wang, Y. H.; Tong, Z. L.; Cheng, Z. Q.; Hussain, I.; Elliott, J. D.; Matsuoka, Y. Pyridazine-derived gamma-secretase modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4016.

<sup>169</sup> Nakagami, Y.; Nishimura, S.; Murasugi, T.; Kaneko, I.; Meguro, M.; Marumoto, S.; Kogen, H.; Koyama, K.; Oda, T. A novel beta-sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid beta-induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *137*, 676.

<sup>170</sup> Ballatore, C.; Brunden, K. R.; Piscitelli, F.; James, M. J.; Crowe, A.; Yao, Y. M.; Hyde, E.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y.; Smith, A. B. Discovery of Brain-Penetrant, Orally Bioavailable Aminothienopyridazine Inhibitors of Tau Aggregation. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3739.

<sup>171</sup> Ballatore, C.; Crowe, A.; Piscitelli, F.; James, M.; Lou, K. V.; Rossidivito, G.; Yao, Y. M.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y.; Brunden, K. R.; Smith, A. B. Aminothienopyridazine inhibitors of tau aggregation: Evaluation of structure-activity relationship leads to selection of candidates with desirable *in vivo* properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4451.

<sup>172</sup> Tavares, F. X.; Boucheron, J. A.; Dickerson, S. H.; Griffin, R. J.; Preugschat, F.; Thomson, S. A.; Wang, T. Y.; Zhou, H. Q. N-Phenyl-4-pyrazolo[1,5-b]pyridazin-3-ylpyrimidin-2-amines as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase 3 with good cellular efficacy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4716.

<sup>173</sup> Maeda, Y.; Nakano, M.; Sato, H.; Miyazaki, Y.; Schweiker, S. L.; Smith, J. L.; Truesdale, A. T. 4-Acylamino-6-arylfuro[2,3-d]pyrimidines: potent and selective glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3907.

estimuladas con LPS, y carecen de efectos adversos en el comportamiento de ratones tratados con dosis de 30 mg/kg.<sup>174,175</sup>

Compuestos 3-amino-6-fenilpiridazinas, como 2-[11-oxo-11-[4-(2-pirimidinil)piperazin-1-il]undecil]-2,3,5,6-tetrahidrobenzo[h]cinnolin-3-imina (MW01-070C), son capaces de inhibir la iNOS y la producción y acumulación de NO e IL-1 $\beta$  en células microgliales BV2 de ratón estimuladas con LPS. En estudios *in vivo*, en ratas Long Evans, no se aprecia un descenso en la activación glial con dosis de hasta 2,5 mg/kg/día, por lo que a diferencia de los AINEs (antiinflamatorios no esteroídicos) el mecanismo de acción no parece que transcurra mediante inhibición de la activación glial.<sup>176</sup> Se ha observado para las piridazinas MW01-070C y 4,6-difenil-3-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)piridazina (MW01-5-188WH) que disminuyen los niveles de IL-1 $\beta$  y sinaptofisina (S100B), determinados en extractos solubles hipocámpales procedentes de la infusión de A $\beta$ 1-42 a través de bomba micro-oscsmótica en ventrículo cerebral de ratones adultos C57BL/6.<sup>177</sup>

Se ha puesto de manifiesto la acción neuroprotectora del compuesto MW01-5-188WH en células microgliales BV2 mediante la inhibición del daño sináptico inducido con  $\beta$ A, con supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y S100B). Además, en estudios *in vivo*, el tratamiento de ratones C57BL/6 con MW01-5-188WH después de tres semanas de la infusión intracerebroventricular de A $\beta$  humano, produce supresión de citoquinas proinflamatorias acompañada del restablecimiento de la disfunción sináptica del hipocampo (determinada por la S100B y la proteína de densidad postsináptica 95, PSD 95), y la atenuación de los déficit de aprendizaje. Como ventaja adicional y determinante para la terapéutica, este compuesto MW01-5-188WH presenta una buena biodisponibilidad oral y baja toxicidad.<sup>178</sup>

Otras piridazinas, como 5,6-dihidro-3-(4-fenilpiperazin-1-il)benzo[h]cinnolina (MW01-3-173WH), 5,6-dihidro-3-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)benzo[h]cinnolina (MW01-3-202) y 5,6-dihidro-3-

---

<sup>174</sup> Matsuda, T.; Aoki, T.; Ohgiya, T.; Koshi, T.; Ohkuchi, M.; Shigyo, H. Synthesis and bioactivities of novel pyridazine derivatives: inhibitors of interleukin-1 beta (IL-1beta) production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2369.

<sup>175</sup> Matsuda, T.; Aoki, T.; Koshi, T.; Ohkuchi, M.; Shigyo, H. Synthesis and bioactivities of novel 5,6-bis(4-methoxyphenyl)-2H-pyridazin-3-one derivatives: inhibitors of interleukin-1 beta (IL-1beta) production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2373.

<sup>176</sup> Watterson, D. M.; Velentza, A. V.; Zasadzki, M.; Craft, J.M.; Haiech, J.; Van Eldik, L. J. Discovery of a new class of synthetic protein kinase inhibitors that suppress selective aspects of glial activation and protect against beta-amyloid induced injury: a foundation for future medicinal chemistry efforts focused on targeting Alzheimer's disease progression. *J. Mol. Neurosci.* **2003**, *20*, 411.

<sup>177</sup> Craft, J. M.; Van Eldik, L. J.; Zasadzki, M.; Hu, W.; Watterson, D. M. Aminopyridazines attenuate hippocampus-dependent behavioral deficits induced by human beta-amyloid in a murine model of neuroinflammation. *J. Mol. Neurosci.* **2004**, *24*, 115.

<sup>178</sup> Ralay Ranaivo, H.; Craft, J. M.; Hu, W.; Guo, L.; Wing, L. K.; Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M. Glia as a therapeutic target: selective suppression of human amyloid-beta-induced upregulation of brain proinflammatory cytokine production attenuates neurodegeneration. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 662.

(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)benzo[*l*]cinnolina (MW01-2-151WH), son capaces de disminuir *in vivo* la liberación de citoquinas por la microglía activada en presencia A $\beta$ , y poseen buena biodisponibilidad determinada tras administración de una dosis de 2,5 mg/kg.<sup>179</sup> La actividad antiinflamatoria de los derivados 2H-piridazina-3-ona y análogos 6-cloropiridazina se ha demostrado mediante la inhibición del radical superóxido y de la peroxidación lipídica *in vitro*.<sup>180</sup>

La prevención de la excitotoxicidad glutamatérgica constituye otro de los enfoques farmacológicos en la terapéutica de la EA. Así, se ha comprobado que derivados de tiopiridazina aumentan los niveles del transportador de aminoácidos excitatorios 2 (EAAT2) en células PA-EAAT2 (línea de astrocitos primarios que expresan establemente EAAT2), con la consiguiente reducción de los niveles de glutamato sináptico y, por tanto, de la actividad glutamatérgica.<sup>181</sup>

El exceso de actividad neuronal también puede reducirse mediante la potenciación de los efectos del neurotransmisor inhibitorio del SNC, GABA. Compuestos arilpiridazinas, análogos de gabazina, son antagonistas de los receptores GABA<sub>A</sub> y presentan una potencia 30 veces mayor que gabazina, como se ha puesto de manifiesto mediante electrofisiología de *patch clamp* para receptores GABA<sub>A</sub> recombinantes  $\alpha 1\beta 2\gamma 2S$  expresados transitoriamente en células HEK293.<sup>182</sup> Otro modulador del receptor GABA<sub>A</sub> es la metil 3,5-difenilpiridazin-4-carboxilato, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y ocupar receptores hipocámpales GABA<sub>A</sub>  $\alpha 5$ . La exposición de ratas Long-Evans a este modular produce aproximadamente el 30% de ocupación de los receptores, y se ha observado que la modulación de la actividad GABA<sub>A</sub>  $\alpha 5$  por este y otros moduladores alostéricos positivos podría mejorar el déficit cognitivo asociado al envejecimiento y, potencialmente, los síntomas y la progresión prodrómica en la EA.<sup>183</sup>

Una diana potencial en la lesión cerebral aguda es la proteína quinasa asociada a muerte (*Death associated protein kinase*, DAPK), que es una enzima regulada por calcio-calmodulina y que posee funciones tempranas en la muerte celular programada o apoptosis. Una inyección única de

---

<sup>179</sup> Hu, W.; Ralay Ranaivo, H.; Craft, J. M.; Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M. Validation of the neuroinflammation cycle as a drug discovery target using integrative chemical biology and lead compound development with an Alzheimer's disease-related mouse model. *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, *2*, 197.

<sup>180</sup> Caliskan-Ergun, B.; Sukuroglu, M.; Coban, T.; Banoglu, E.; Suzen, S. Screening and evaluation of antioxidant activity of some pyridazine derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 225.

<sup>181</sup> Xing, X.; Chang, L. C.; Kong, Q.; Colton, C. K.; Lai, L.; Glicksman, M. A.; Lin, C. L.; Cuny, G. D. Structure-activity relationship study of pyridazine derivatives as glutamate transporter EAAT2 activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5774.

<sup>182</sup> Iqbal, F.; Ellwood, R.; Mortensen, M.; Smart, T. G.; Baker, J. R. Synthesis and evaluation of highly potent GABA(A) receptor antagonists based on gabazine (SR-95531). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4252.

<sup>183</sup> Koh, M. T.; Rosenzweig-Lipson, S.; Gallagher, M. Selective GABA(A)  $\alpha 5$  positive allosteric modulators improve cognitive function in aged rats with memory impairment. *Neuropharmacology* **2013**, *64*, 145.

un derivado de 3-amino-6-fenil-piridazina, administrada seis horas después de una lesión del tejido cerebral, atenúa la pérdida de peso cerebral y de los biomarcadores de lesión cerebral asociados a los microtúbulos-2 (MAP-2).<sup>184</sup>

Además de las acciones de piridazinas relacionadas con dianas farmacológicas involucradas en patologías neurodegenerativas o neurológicas, se han descrito otras propiedades para estos compuestos.

Se ha comprobado que la eficacia fungicida de derivados imidazólicos de piridazina se debe a su capacidad para promover la polimerización de la tubulina de hongos, lo que conduce a una interrupción de la dinámica de los microtúbulos en el hongo. Estos imidazoles poseen cinco miembros, y son análogos de triazolopirimidinas sustituidas y piridopiridazinas.<sup>185</sup>

Mediante estudios de relación estructura-actividad se han desarrollado moléculas con estructura central de imidazo [1,2-b] piridazina, con potente actividad inhibidora de la quinasa del factor nuclear kappa  $\beta$  (IKK $\beta$ ), así como actividad inhibidora de la liberación de TNF $\alpha$  en células THP-1.<sup>186</sup> También se demostró la inhibición de la producción de TNF $\alpha$  en plasma obtenido de células sanguíneas de ratón BALB/c estimulado con LPS.<sup>187</sup> Se optimizaron compuestos con sustitución en posiciones 3- y 6- de imidazo [1,2-b]piridazina buscando la combinación de una potente actividad inhibidora de IKK $\beta$  y TNF $\alpha$  y, una buena farmacocinética. Así se ha establecido que la sustitución 2-fluorobenzamida mejora la farmacocinética de los compuestos mientras que la (2S,4R)-4-fluoropirrolidin-2-il-metil mejora la potencia y las propiedades físico-químicas, como ocurre con el ciclopropilmetilamino con ciclobutilamino en posición 6 en el [1,2-b] piridazina grupo imidazo. El compuesto mostró una potente actividad, propiedades físicas favorables, buena

---

<sup>184</sup> Velentza, A. V.; Wainwright, M. S.; Zasadzki, M.; Mirzoeva, S.; Schumacher, A. M.; Haiech, J.; Focia, P. J.; Egli, M.; Watterson, D. M. An aminopyridazine-based inhibitor of a pro-apoptotic protein kinase attenuates hypoxia-ischemia induced acute brain injury. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3465.

<sup>185</sup> Lamberth, C.; Trah, S.; Wendeborn, S.; Dumeunier, R.; Courbot, M.; Godwin, J.; Schneiter, P. Synthesis and fungicidal activity of tubulin polymerisation promoters. Part 2: pyridazines. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2803.

<sup>186</sup> Shimizu, H.; Tanaka, S.; Toki, T.; Yasumatsu, I.; Akimoto, T.; Morishita, K.; Yamasaki, T.; Yasukochi, T.; Iimura, S. Discovery of imidazo[1,2-b]pyridazine derivatives as IKKbeta inhibitors. Part 1: Hit-to-lead study and structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5113.

<sup>187</sup> Shimizu, H.; Yasumatsu, I.; Hamada, T.; Yoneda, Y.; Yamasaki, T.; Tanaka, S.; Toki, T.; Yokoyama, M.; Morishita, K.; Iimura, S. Discovery of imidazo[1,2-b]pyridazines as IKKbeta inhibitors. Part 2: improvement of potency in vitro and in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 904.

farmacocinética, y una excelente eficacia en modelos de artritis inducida por colágeno bovino tipo II en adyuvante completo de Freund, en ratón DBA/1 y en rata Dark Agouti.<sup>188</sup>

---

<sup>188</sup> Shimizu, H.; Yamasaki, T.; Yoneda, Y.; Muro, F.; Hamada, T.; Yasukochi, T.; Tanaka, S.; Toki, T.; Yokoyama, M.; Morishita, K.; Iimura, S. Discovery of imidazo[1,2-b]pyridazines as IKKbeta inhibitors. Part 3: exploration of effective compounds in arthritis models. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4550.



## 5. Metodología



## 5.1. Determinación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad colinesterásica se determinó espectrofotométricamente siguiendo el método descrito por Ellman<sup>189,190</sup> Este método se basa en la reacción siguiente:

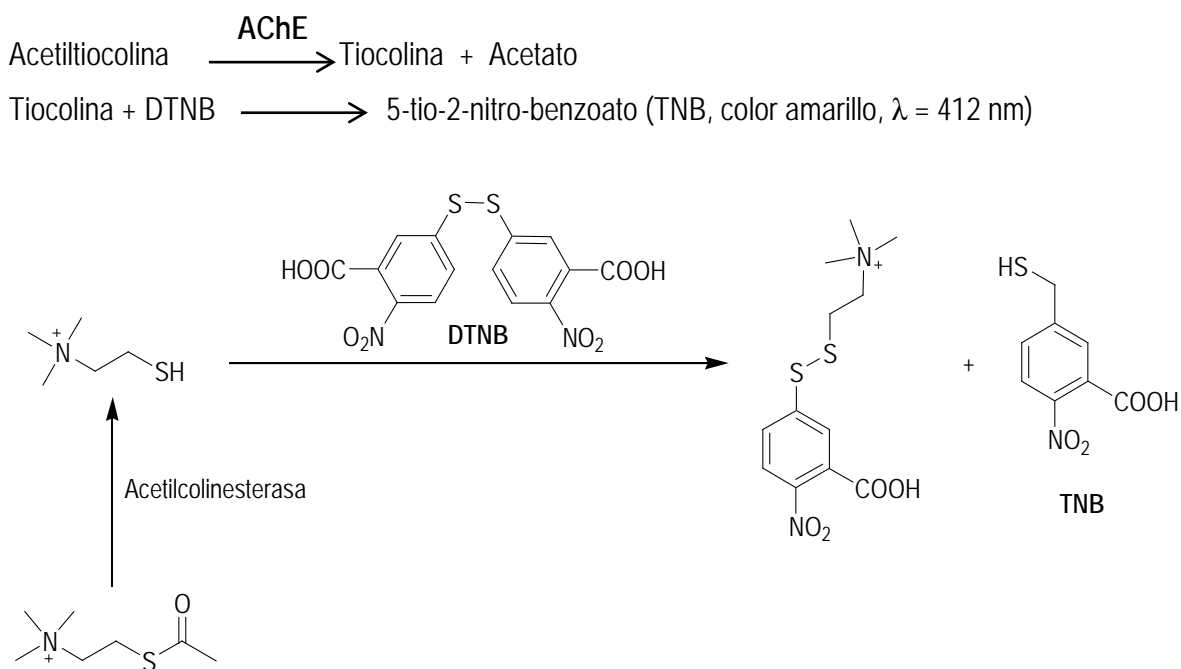


Fig. 3. Determinación de la actividad colinesterasa. Método de Ellman

La primera parte de la reacción consiste en la degradación de la acetiltiocolina por parte de la AChE, produciéndose tiocolina y acetato. En la segunda parte se produce la unión de la tiocolina al reactivo DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic acid, reactivo de Ellman) dando lugar al 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB,  $\lambda = 412 \text{ nm}$ , color amarillo), indicador de la cantidad de acetiltiocolina degradada por la AChE.

La actividad inhibitoria de AChE de los compuestos en estudio se evaluó utilizando un enzima acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus*. *E. electricus* es un pez eléctrico y la única especie del género *Electrophorus*. Es capaz de generar potentes descargas eléctricas de hasta 600 voltios que utiliza para la caza y la autodefensa. *E. electricus* se ha utilizado como modelo en numerosos estudios bioquímicos debido a la abundancia excepcional de AChE en los órganos eléctricos (Fig.

<sup>189</sup> Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. Jr., Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88.

<sup>190</sup> Froede, H. C.; Wilson, I. B. Direct determination of acetyl-enzyme intermediate in the acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylcholine and acetylthiocholine. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 11010.

4).<sup>191</sup> La acetilcolinesterasa de *E. electricus*<sup>192</sup> es un tetrámero compuesto de 4 subunidades iguales, de peso molecular de 70 kDa/subunidad. Cada subunidad contiene un centro activo (Fig. 4).

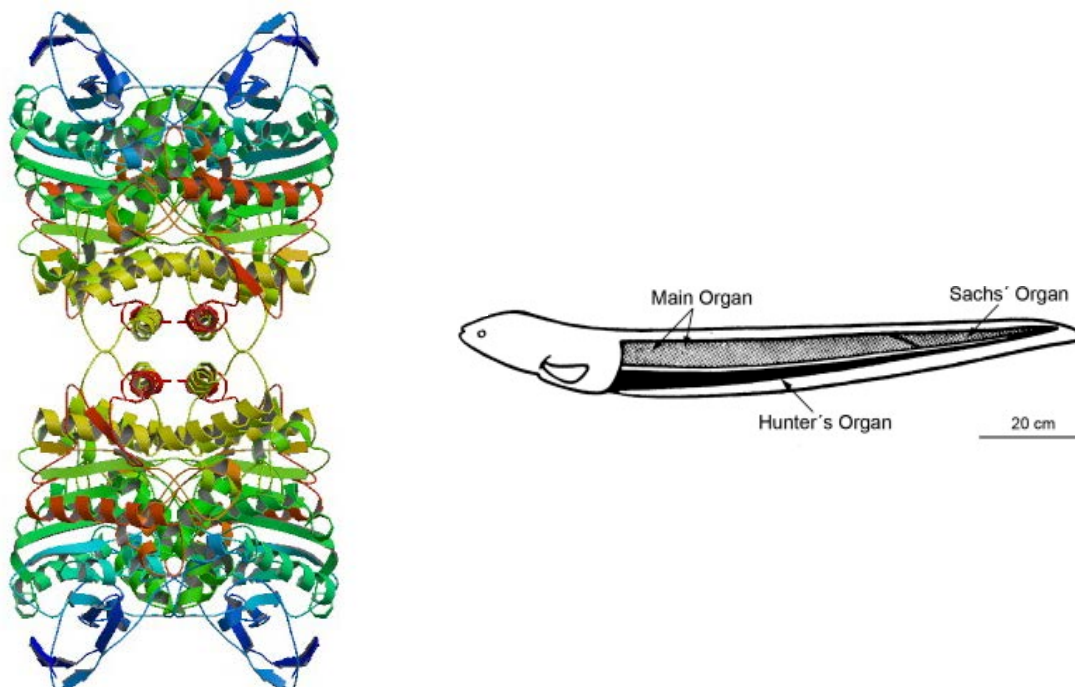


Fig. 4 Estructura tridimensional de AChE de *Electrophorus electricus* (difracción por Rayos X). Localización de los tres órganos eléctricos en el *Electrophorus electricus* adulto.<sup>193</sup>

### Procedimiento

A una solución que contenía tampón Tris-HCl (50 mM, pH 8,0), DTNB 6 mM y 0,05 U/ml del enzima (Sigma-Aldrich), se añadieron concentraciones crecientes del compuesto en estudio. La solución se incubó durante 5 min a 25°C. Finalmente se añadió la acetiltiocolina (1,5 mM). La reacción tuvo lugar en un volumen final de 200  $\mu$ l. La solución en ausencia del compuesto en estudio permitió alcanzar el 100% de actividad enzimática (reacción control). La producción de TNB se monitorizó a  $\lambda = 412$  nm durante 3 min, y se determinó el  $\Delta$ Abs que se utilizó para el cálculo de la actividad enzimática con cada una de las concentraciones de compuesto en estudio. La inhibición de la

<sup>191</sup> Simon, S.; Massoulié, J. Cloning and Expression of Acetylcholinesterase from *Electrophorus*. Splicing pattern of the 3' exons in vivo and in transfected mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 33045.

<sup>192</sup> Bourne, Y.; Grassi, J.; Bougis, P. E.; Marchot, P. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30370.

<sup>193</sup> Kirschbauma, F.; Schwassmann, H. O. Ontogeny and evolution of electric organs in gymnotiform fish. *J. Physiol.* **2008**, *102*, 347.

actividad enzimática se expresó como porcentaje de la reacción control. Como control positivo se utilizó la galantamina,<sup>194</sup> inhibidor selectivo, competitivo y reversible de la acetilcolinesterasa que se utiliza en el tratamiento de la EA con deterioro cognitivo leve a moderado.

## 5.2. Determinación de la actividad $\beta$ -secretasa

$\beta$ -Secretasa ( $\beta$ -Site APP-Cleaving Enzyme, BACE) es una proteasa transmembrana responsable de la escisión de la proteína precursora del  $\beta$ A (APP) para dar lugar al propio péptido  $\beta$ A.<sup>195,196</sup>

El ensayo de actividad, que se utiliza para la detección de potenciales inhibidores de  $\beta$ -secretasa, se basa en la escisión en Leu-Asp de un péptido específico de  $\beta$ -secretasa para dar lugar finalmente a una señal fluorescente. La intensidad de la señal fluorimétrica es proporcional al grado de hidrólisis del sustrato peptídico, y por tanto, a la actividad enzimática  $\beta$ -secretasa.

El enzima que se utilizó para el ensayo es una  $\beta$ -Secretasa recombinante humana expresada en células HEK293 (aminoácidos 133-281, N-terminal FLAG tagged).

El sustrato es un péptido de transferencia de energía de resonancia fluorescente (*Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*) que contiene un grupo aceptor de fluorescencia en la posición N-terminal (ácido 4-(dimetilaminoazo)benceno-4-carboxílico, DABCYL), y un grupo donador de fluorescencia emparejado en la posición C-terminal (ácido 5-(2-aminoetilamino)naftaleno-1-sulfónico, EDANS). El grupo DABCYL actúa "quencheando" (apagando) la fluorescencia del fluoróforo EDANS ya que la banda de emisión de EDANS (400-600 nm) muestra una excelente superposición con la amplia banda de absorción en el visible de DABCYL. Este fenómeno se basa en la transferencia de energía eficaz entre los grupos donador y aceptor que flanquean la secuencia del péptido. La secuencia del sustrato peptídico es la siguiente:



---

<sup>194</sup> Ni, R.; Marutle, A.; Nordberg, A. J. Modulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid- $\beta$  interactions in Alzheimer's disease brain. *Alzheimers Dis.* 2013, 33, 841.

<sup>195</sup> Vassar, R.; Bennett, B.; Babu-Khan, S.; Rogers, G.; Citron, M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999, 286, 735.

<sup>196</sup> Yan, R.; Bienkowski, M. J.; Shuck, M. E.; Miao, H.; Tory, M. C.; Pauley, A. M.; Brashier, J. R.; Stratman, N. C.; Mathews, W. R.; Buhl, A. E.; Carter, D. B.; Tomasselli, A. G.; Parodi, L. A.; Heinrikson, R. L.; Gurney, M. E. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 1999, 402, 533.

*Procedimiento*

El ensayo se llevó a cabo a 25°C utilizando 0,24 U de  $\beta$ -secretasa humana recombinante (Sigma-Aldrich) y un sustrato fluorogénico (Calbiochem) a 10  $\mu$ M en tampón de acetato sódico (20 mM, pH 4,5), en un volumen final de 100  $\mu$ l. La fluorescencia se midió utilizando un lector de fluorescencia para placas multipocillo. Las  $\lambda$  de excitación y de emisión fueron 360 y 528 nm, respectivamente. El ensayo de actividad enzimática se lleva a cabo en ausencia (reacción de control), y en presencia del compuesto a ensayar, en un determinado rango de concentraciones. Para cada uno de los compuestos en estudio se determinó su valor de fluorescencia emitida en ausencia del enzima, valor que se sustrajo a la señal de fluorescencia emitida de la reacción en presencia de enzima. La inhibición de la actividad  $\beta$ -secretasa se calculó a partir del porcentaje de la reacción control (100 %) después de 1 hora de incubación a 37°C. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición con respecto a la actividad obtenida en la reacción control.

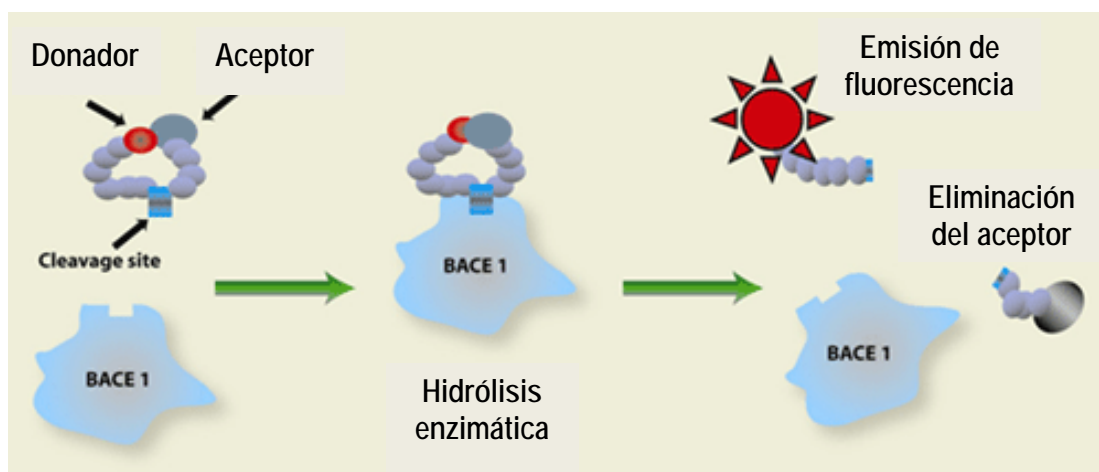


Fig. 5. Fluorescencia del sustrato  $\beta$ -secretasa (BACE1)

La fluorescencia del sustrato se reduce significativamente debido a la transferencia de energía intramolecular de resonancia al grupo de extinción (aceptor). Tras la escisión del sustrato por la  $\beta$ -secretasa (BACE1), se produce una alteración de la transferencia de energía que resulta en el incremento de la señal fluorescente.

### 5.3. Determinación de la actividad $\gamma$ -secretasa

Gamma-secretasa es un complejo aspartil proteasa intramembranal que contiene al menos cuatro proteínas transmembrana, con una presenilina como componente catalítico. Junto con la  $\beta$ -secretasa, da lugar al péptido  $\beta$ A a partir de la APP. Debido a su papel clave en la patogenia de la EA,  $\gamma$ -secretasa ha sido un objetivo prioritario para el descubrimiento de fármacos inhibidores de esta proteasa.

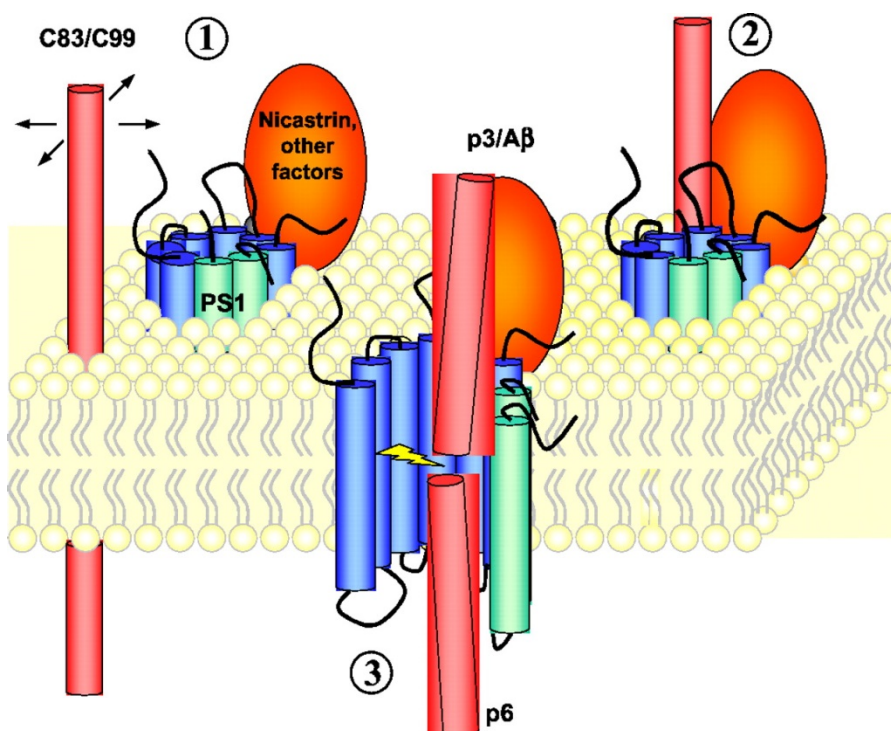


Fig. 6. Modelo de interacción de  $\gamma$ -secretasa con su sustrato C99.<sup>197</sup>

El complejo  $\gamma$ -secretasa está formado por presenilina NTF (*N-terminal fragment*, azul), presenilina 1. CTF (*C-terminal fragment*, verde), nicastrina y otros componentes (naranja). El centro activo de la presenilina se encuentra secuestrado en los lípidos de la membrana hidrófoba, mientras que el sustrato C83 ó C99 (*C-terminal fragment* procedente de la hidrólisis de APP, rojo) se puede movilizar solamente en dos direcciones, dentro de los confines de la bicapa lipídica (1). El sustrato interactúa primeramente con la parte externa de la proteasa (2) antes de acceder al centro activo (3).

<sup>197</sup> Esler, W. P.; Kimberly, W. T.; Ostaszewski, B. L.; Ye, W.; Diehl, T. S.; Selkoe, D. J.; Wolfe, M. S. Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma -secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 2720.

La determinación de la actividad  $\gamma$ -secretasa, que se utiliza para la detección de potenciales inhibidores de dicha actividad, se basa en la escisión de un péptido específico de  $\gamma$ -secretasa para dar lugar finalmente a una señal fluorescente. La intensidad de la señal fluorimétrica es proporcional al grado de hidrólisis en Val-Ile-Ala del sustrato peptídico, y por tanto, a la actividad enzimática  $\gamma$ -secretasa.

El sustrato es un péptido de transferencia de energía de resonancia fluorescente (*Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*) que contiene 2,4-dinitrofenil (DNP) como grupo aceptor de fluorescencia y 2-(N-metilamino)benzoil (NMA) como grupo donador de fluorescencia emparejado. La secuencia del sustrato peptídico es la siguiente:



### *Procedimiento*

#### *Aislamiento de membranas celulares*

El complejo aspartil proteasa de  $\gamma$ -secretase se preparó a partir del aislamiento de membranas de células APP<sup>swe</sup> (descripción en pág. 96). Con esta finalidad se sembraron células en placas petri de 100-mm, y cuando alcanzaron un 80% de confluencia se rascaron y se obtuvieron pellets de las mismas. Los pellets fueron lisados en 100-200  $\mu$ l de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl [pH 6,8], 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5  $\mu$ g/ml leupeptina, 0,2 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml pepstatina A, y 2  $\mu$ g/ml aprotinina) con un homogenizador. Los lisados se centrifugaron a 800 x g durante 10 min (4°C) con el fin de sedimentar los núcleos y restos celulares. A continuación se tomaron los sobrenadantes que se centrifugaron a 20 000 x g durante 1 h (4°C). Los pellets de membrana resultantes se resuspendieron en 100-200  $\mu$ l de tampón de lisis que contiene 2% CHAPS como detergente neutro (Fig. 7). La concentración de proteínas de los sobrenadantes finales se determinó mediante el método de Bradford.

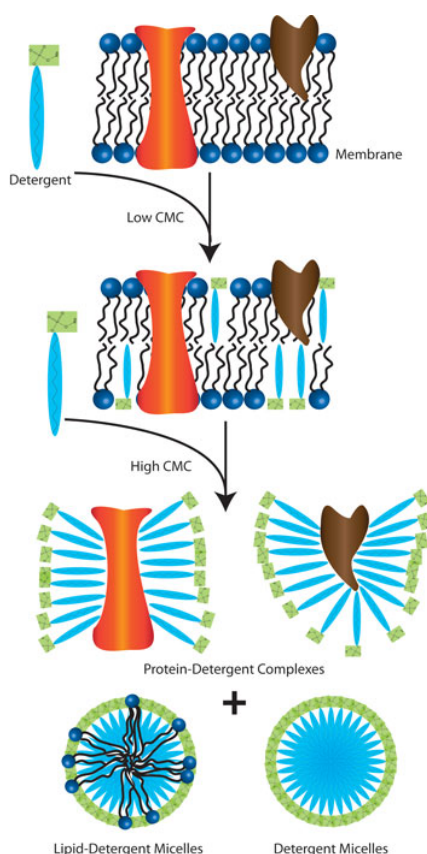


Fig. 7. Solubilización de proteínas de membrana por acción de un detergente.

Las proteínas se liberan de la bicapa lipídica por acción del detergente ya que las micelas de detergente poseen propiedades similares a los lípidos de la bicapa lipídica. Las proteínas integrales de membrana se engloban en micelas de detergente protegiendo sus dominios hidrófobos de la agregación.

#### Ensayo para la determinación de la actividad enzimática

El ensayo de actividad  $\gamma$ -secretasa<sup>198,199</sup> se llevó a cabo mediante la incubación de un volumen de pellet equivalente a 20-50  $\mu\text{g}$  de proteína con el sustrato fluorogénico (Calbiochem) a una concentración de 8  $\mu\text{M}$ , en un tampón compuesto por 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 mM EDTA, 150 mM KCl y 0,25% CHAPS, en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ , a 37°C y durante 2 horas. Como patrón se empleó el compuesto L-685,458. La fluorescencia se midió utilizando un lector de fluorescencia para placas multipocillo. Las  $\lambda$  de excitación y de emisión fueron 355 and 440 nm, respectivamente. El

<sup>198</sup> Kim, S. K.; Park, H. J.; Hong, H. S.; Baik, E. J.; Jung, M. W.; Mook-Jung, I. ERK1/2 is an endogenous negative regulator of the gamma-secretase activity. *FASEB J.* **2006**, *20*, 157

<sup>199</sup> Tamagno, E.; Guglielmotto, M.; Aragno, M.; Borghi, R.; Autelli, R.; Giliberto, L.; Muraca, G.; Danni, O.; Zhu, X.; Smith, M. A.; Perry, G.; Jo, D. G.; Mattson, M. P.; Tabaton, M. Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 683.

ensayo de actividad enzimática se llevó a cabo en ausencia (reacción de control), y en presencia del compuesto a ensayar, en un rango de concentración de 1-100  $\mu\text{M}$ . Para cada uno de los compuestos en estudio se determinó su valor de fluorescencia emitida en ausencia del enzima, valor que se sustrajo a la señal de fluorescencia emitida de la reacción en presencia de enzima. La inhibición de la actividad  $\gamma$ -secretasa se calculó a partir del porcentaje de la reacción control (100 %) después de 2 horas de incubación a 37°C. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición con respecto a la actividad obtenida en la reacción de control.

#### 5.4. Fibrillogénesis *in vitro* del péptido $\beta$ -amiloide

Se ha propuesto que el péptido  $\beta$ A (25-35) representa la región biológicamente activa del péptido 1-42 ya que es el fragmento más corto que muestra una transición conformacional de una forma soluble a una forma agregada fibrilar constituida por estructuras de láminas  $\beta$  y, al mismo tiempo, mantiene la toxicidad del péptido de longitud completa.<sup>200</sup> Por esta razón, en este estudio se ha utilizado el fragmento 25-35.

Se estableció un modelo simplificado de fibrillogénesis *in vitro* a partir de un péptido comercial (fragmento 25-35) en forma de monómero en solución que se incubó a 37°C en atmosfera húmeda durante un periodo de 96 horas y con agitación constante.

#### Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met

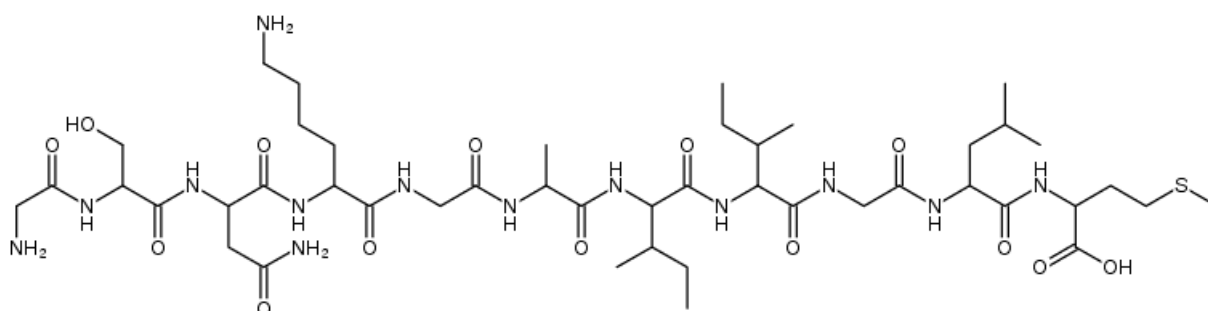


Fig. 8. Secuencia del péptido  $\beta$ A (25-35)

Para estudiar la inhibición de la agregación del péptido por parte de los compuestos en estudio, el monómero en solución se incubó conjuntamente con éstos durante 96 horas.

Para determinar la capacidad de interferencia de los compuestos con las interacciones peptídicas  $\beta$ A- $\beta$ A, desagregando como consecuencia, las fibrillas preformadas del péptido, los compuestos se añadieron al péptido ya agregado y dicha mezcla se incubó durante 72 horas adicionales.

<sup>200</sup> Pike, C. J.; Walencewicz-Wasserman, A. J.; Kosmoski, J.; Cribbs, D. H.; Glabe, C. G.; Cotman, C. W. Structure-activity analyses of  $\beta$ -amyloid peptides: contributions of the  $\beta$  25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* 1995, 64, 253.

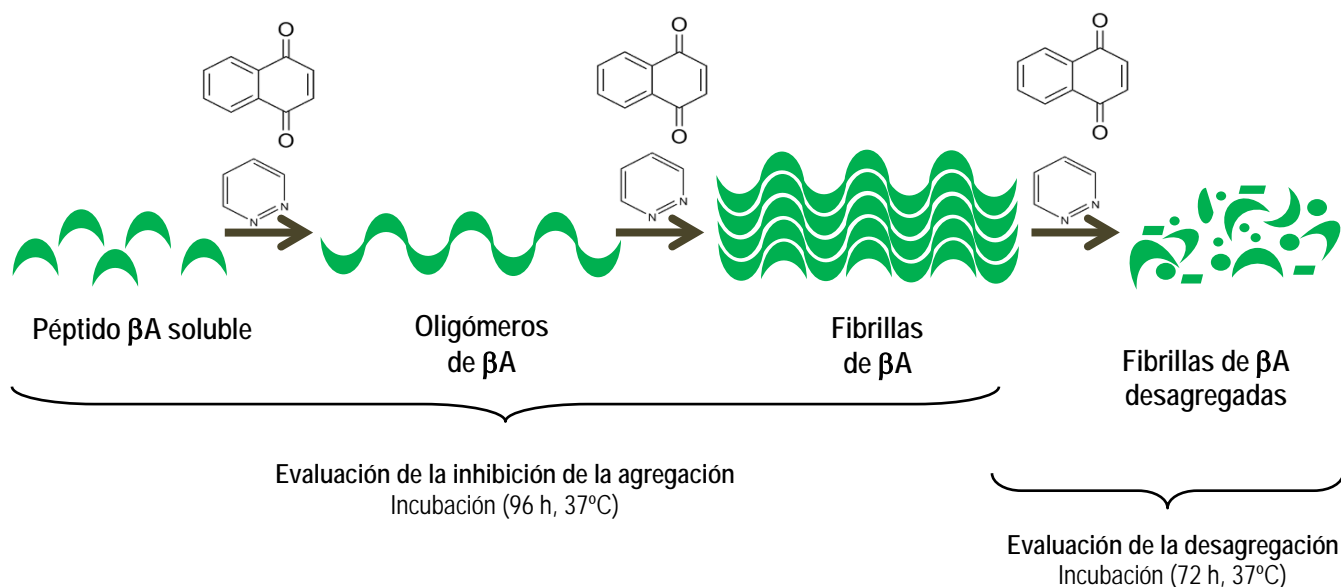


Fig. 9. Proceso de fibrilogénesis *in vitro* del péptido  $\beta$ A (25-35)  
Evaluación de la inhibición de la agregación y desagregación de compuestos en estudio

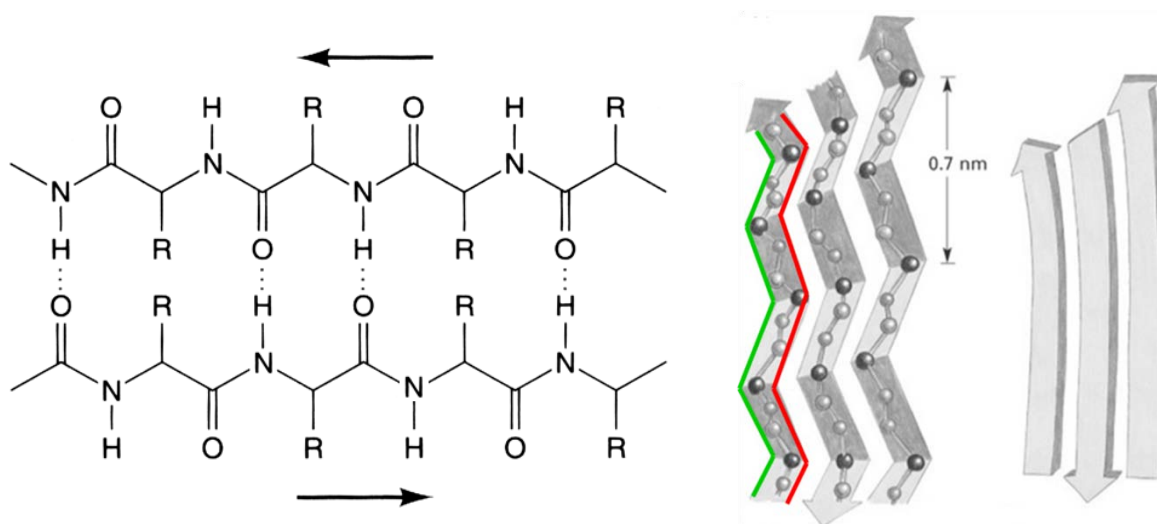


Fig. 10. Unión de hebras peptídicas mediante puentes de H. Láminas antiparalelas de péptido  $\beta$ A

El proceso de fibrilogénesis *in vitro* bajo la influencia de los compuestos en estudio se determinó tanto cualitativa como cuantitativamente.

- **Evaluación cualitativa.** Se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión.
- **Evaluación cuantitativa.** Se utilizó un ensayo fluorimétrico tanto de fase estacionaria como de fase resuelta.

### ***Preparación del péptido $\beta A$ <sup>201</sup> y proceso de fibrillogénesis *in vitro****

- ❖ El péptido comercial  $\beta A$  (GenScript) se disuelve en un volumen de hexafluoruro-2-isopropanol (Sigma-Aldrich) necesario para obtener una concentración de 1 mM.
- ❖ Se agita vigorosamente en Vórtex hasta que se observa una completa disolución a simple vista.
- ❖ Para asegurar la completa disolución del péptido, se somete a sonicación durante 1 hora.
- ❖ Se preparan alícuotas en tubos eppendorf y se exponen en campana durante toda la noche para la evaporación del disolvente. Al día siguiente, los tubos se someten a *speed vacuum* durante 1 hora para eliminar totalmente el disolvente (hexafluoruro-2-isopropanol), quedando una fina película en las paredes del tubo.
- ❖ Los tubos se conservan a -80°C hasta su uso.
- ❖ Cuando se va a llevar a cabo el ensayo de fibrillogénesis *in vitro*, se prepara una solución madre 5 mM de  $\beta A$  en DMSO, y a partir de ésta, una solución 100  $\mu M$  en PBS.
- ❖ El proceso de fibrillogénesis *in vitro* transcurre con la incubación a 37°C del péptido  $\beta A$  soluble durante un tiempo variable.
- ❖ Para el estudio de la inhibición de la agregación de  $\beta A$ , se incuba el péptido soluble a una concentración final de 10  $\mu M$  junto con el compuesto en estudio (en un rango de concentración) en un volumen total de 100  $\mu l$ , durante 96 horas. Para el estudio de la desagregación de  $\beta A$ , se incuba el péptido previamente agregado (incubación previa de 96 horas) junto con el compuesto en estudio, en un volumen total de 100  $\mu l$ , durante 72 horas.

#### **5.4.1. Evaluación cualitativa. Microscopía electrónica de transmisión**

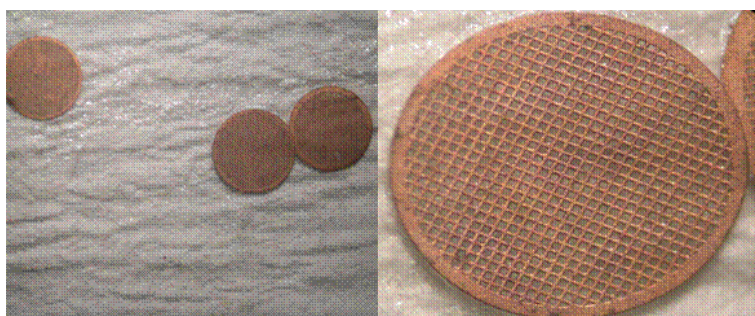
El producto obtenido tras la incubación a 37°C y en agitación continua (96 horas y 72 horas adicionales, respectivamente) del péptido  $\beta A$ , en forma de monómero en solución, se visualizó al microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-4000 EX, Centro de Apoyo a la Investigación,

---

<sup>201</sup> Stine, W. B. Jr.; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11612.

Universidad Complutense de Madrid) mediante tinción negativa con acetato de uranilo al 2%.<sup>202</sup> De esta forma se confirmaba morfológicamente la formación de las fibrillas  $\beta$ A.

Debido al bajo poder de penetración del haz de electrones que imposibilita el uso de láminas de vidrio como portaespecímenes, éstas se sustituyen por delgadas películas plásticas de aproximadamente 200 Å de espesor (película de formvar). Como estas películas son muy delgadas se colocan sobre rejillas metálicas de aluminio circulares, que en nuestro caso poseían 3 mm de diámetro y 200 celdillas. Además, la película está reforzada con una fina capa de carbono evaporado al vacío (película de formvar/carbón).



**Fig. 11.** Rejillas portaespecímenes para microscopía electrónica de transmisión

### *Procedimiento*

Se tomaron alícuotas de 3  $\mu$ l del producto obtenido de la solución del péptido, antes y después del período de incubación (0 horas, 96 horas y 72 horas adicionales, respectivamente), se transfirieron a la superficie de las rejillas (Feldeco) y se incubaron durante 30 segundos. A continuación, el producto aplicado sobre la rejilla se tiñó con 10  $\mu$ l de solución de acetato de uranilo (2%, P/V, en agua MilliQ). Tras la tinción, el exceso de solución se eliminó con papel de filtro. La rejilla se dejó secar al aire y a continuación se visualizó al microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-4000 EX) con un voltaje de excitación de 80 kV.

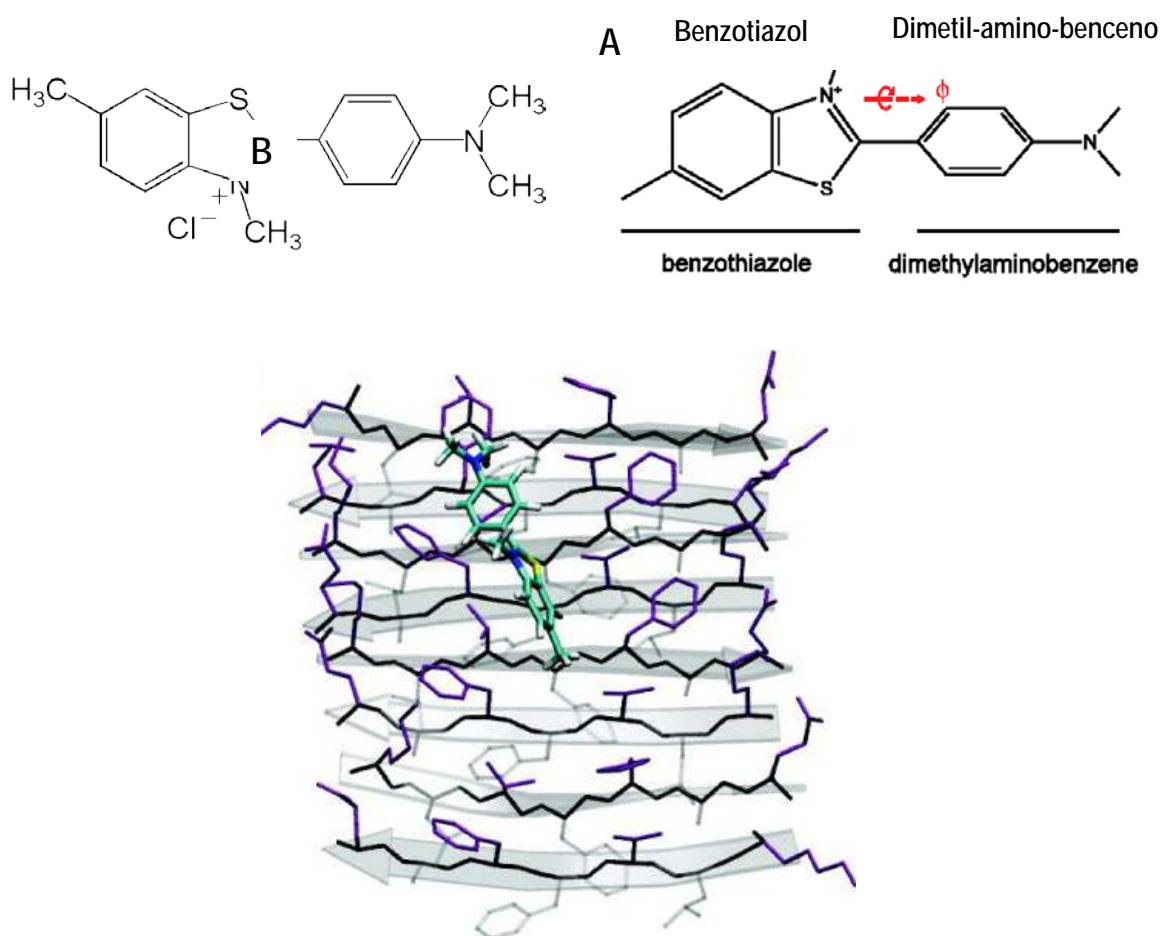
---

<sup>202</sup> Jiménez-Aliaga, K.; Bermejo-Bescós, P.; Benedí, J.; Martín-Aragón, S. Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APP<sup>swe</sup> cells. *Life Sci.* **2011**, *89*, 939.

### 5.4.2. Evaluación cuantitativa. Ensayo fluorimétrico

La cuantificación de la fibrillogénesis del péptido  $\beta$ A se llevó a cabo mediante un ensayo fluorimétrico basado en la emisión de fluorescencia de la tioflavina T.<sup>203</sup>

La tioflavina T es un colorante benzotiazol que en solución acuosa forma micelas que se unen a las fibrillas  $\beta$ A y esta unión provoca un cambio en el espectro de emisión y un aumento de la fluorescencia, proporcional al grado de agregación del péptido, debido a la obstrucción de la rotación del anillo benzotiazol respecto del benzamínico (dimetil-amino-benceno).<sup>12</sup>



**Fig. 12.** A) Estructura de la tioflavina T (Cloruro de 4-(3,6-dimetil-1,3-benzotiazol-3-ium-2-il)-N,N-dimetilanilina). La geometría conformacional del catión de tioflavina T muestra que el ángulo entre los planos de los anillos en el estado fundamental es  $\phi = 30^\circ$ . B) Unión del catión de tioflavina T (en azul) a una lámina  $\beta$ .<sup>204</sup>

<sup>203</sup> Voropai, E. S.; Samtsov, M. P.; Kaplevskii, K. N.; Maskevich, A. A.; Stepuro, V. I.; Povarova, O. I.; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K.; Fink, A. L.; Uverskii, V. N. Spectral Properties of Thioflavin T and Its Complexes with Amyloid Fibrils. *J. Appl. Spectr. (Rus)* **2003**, *70*, 868.

<sup>204</sup> Groenning, M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status. *Chem. Biol.* **2010**, *3*, 1.

La determinación de la intensidad de fluorescencia se realizó mediante dos métodos diferentes:

- ❖ **Fase resuelta.** Con resolución temporal. La muestra se excita con un pulso de luz de muy corta duración y la emisión de fluorescencia se detecta por medio de un sistema de alta velocidad. La vida media de la fluorescencia proporciona una medida absoluta (independiente de la concentración) y permite una imagen dinámica de la fluorescencia.
- ❖ **Fase estacionaria.** La excitación y la observación son constantes. La medida de la emisión de fluorescencia proporciona un promedio y una representación relativa. La muestra se excita a una  $\lambda_{exc} = 448 \text{ nm}$  y la intensidad de la fluorescencia se mide a una  $\lambda_{em} = 487 \text{ nm}$ .

### *Espectroscopía de fluorescencia de fase resuelta*

La cuantificación del grado de fibrillogénesis del péptido  $\beta A$  se basó en la emisión de fluorescencia de la tioflavina T, colorante benzotiazol que en solución acuosa forma micelas que se unen a las fibrillas de  $\beta A$ , conduciendo así a un incremento de la fluorescencia de emisión.

La emisión de un fotón de fluorescencia a partir de un fluoróforo no se produce en un momento fijo. En su lugar, se observa una distribución de momentos, que se pueden describir mediante una función de disminución exponencial. La constante de tiempo característica de esta disminución, el *tiempo de vida de fluorescencia*, está en el rango de unos pocos picosegundos hasta varias decenas de nanosegundos. El tiempo de vida de fluorescencia es una medida del tiempo en que el fluoróforo permanece de media en su estado excitado antes de regresar al estado estacionario emitiendo un fotón de fluorescencia. Este tiempo de vida es un parámetro característico de cada marcador de fluorescencia que puede cambiar con su microentorno o su estado conformacional. La información de tiempo de vida prueba el entorno molecular para comprobar su composición, como la concentración iónica, el pH, la lipofilicidad o la unión a otras moléculas.

El tiempo de vida es proporcional al grado de fibrilación del péptido pero no depende de la intensidad de la fluorescencia. La determinación de los tiempos de vida permite la identificación de potenciales inhibidores de la agregación de  $\beta A$  y/o compuestos desagregantes del mismo. La variación en el tiempo de vida media de fluorescencia por efecto de las 1,4-naftoquinonas nos permitió cuantificar tanto el grado de inhibición de la agregación del péptido como el grado de desagregación del mismo.

Las medidas de fluorescencia con resolución temporal fueron realizadas en el dominio de tiempos, utilizando la técnica de contaje de fotones únicos correlacionados temporalmente (Time-Correlated Single-Photon Counting, TCSPC).<sup>205,206</sup>

### *Procedimiento*

Se procedió del mismo modo en la preparación de las muestras bien destinadas para el estudio de fase resuelta, bien para el estudio de fase estacionaria. Alícuotas procedentes de cada una de las muestras de  $\beta$ A que se incubaron a 37°C (96 horas y 72 horas adicionales, respectivamente) se trataron con tioflavina T (Sigma-Aldrich) (concentración final, 25  $\mu$ M), y la mezcla se agitó durante 10 segundos.

Para la medida de la fluorescencia con resolución temporal se utilizó un espectroscopio FluoroMax-4<sup>®</sup> (Horiba-Jobin-Yvon) basado en la técnica de contaje de fotones únicos correlacionados temporalmente (TCSPC). Las muestras se excitaron con un láser de diodo de longitud de onda fija de excitación (463 nm), y el descenso en la intensidad de la fluorescencia se monitorizó a 482 nm. La detección del primer fotón provoca una señal de parada en el convertidor de tiempo-amplitud, que produce un pulso cuya amplitud es proporcional al tiempo transcurrido entre las señales de inicio y parada. Las condiciones del sistema permiten que sólo se detecte un único fotón por pulso de excitación. La repetición de este procedimiento para un gran número de pulsos de excitación sobre la muestra resulta en un histograma en el analizador multicanal, que representa el número de cuentas en cada canal, que a su vez se corresponde con el perfil de decaimiento de fluorescencia de la muestra. El tiempo de adquisición de la fluorescencia que se empleó con cada una de las muestras fue el necesario hasta alcanzar una señal predeterminada de 10 000 cuentas.

Ya que la medida del decaimiento de la fluorescencia puede verse distorsionada por factores instrumentales, se requiere una medición adicional de la respuesta instrumental mediante el uso de una solución dispersante de la luz de excitación (leche diluida). En ausencia de fluoróforo, la medida del decaimiento de la fluorescencia será exclusivamente el resultado de la electrónica (instrumental).

---

<sup>205</sup> Birch, D. J. S.; Imhof, R. E. "Time-domain fluorescence spectroscopy using time correlated single-photon counting". En *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol 1. Techniques*. Editado por Lakowicz J.R. Plenum Press, New York, **1991**, 1.

<sup>206</sup> Lakowicz, J. R. En: *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2ª Edición. Editado por Lakowicz, J. R. Kluwer Academic-Plenum Publishers, **1999**.

### 5.5. Línea celular SH-SY5Y

La línea celular original, SK-N-SH, se aisló por primera vez en 1973,<sup>207</sup> a partir de una biopsia de médula ósea de una niña con neuroblastoma, de cuatro años de edad. La línea celular SH-SY5Y se obtuvo a partir de la clonación de SK-N-SH en 1978.<sup>208</sup> Estas células se utilizan como modelo *in vitro* para el estudio de la diferenciación y la función neuronal. El proceso de clonación es esencialmente por selección artificial, lo que implica la expansión de células individuales o de un pequeño grupo de células que expresan un fenotipo particular de interés.

Esta línea de neuroblastoma se utilizó para establecer el rango de concentración no tóxico de 1,4-naftoquinonas.

ATCC Number: **CRL-2266**  
Designation: **SH-SY5Y**

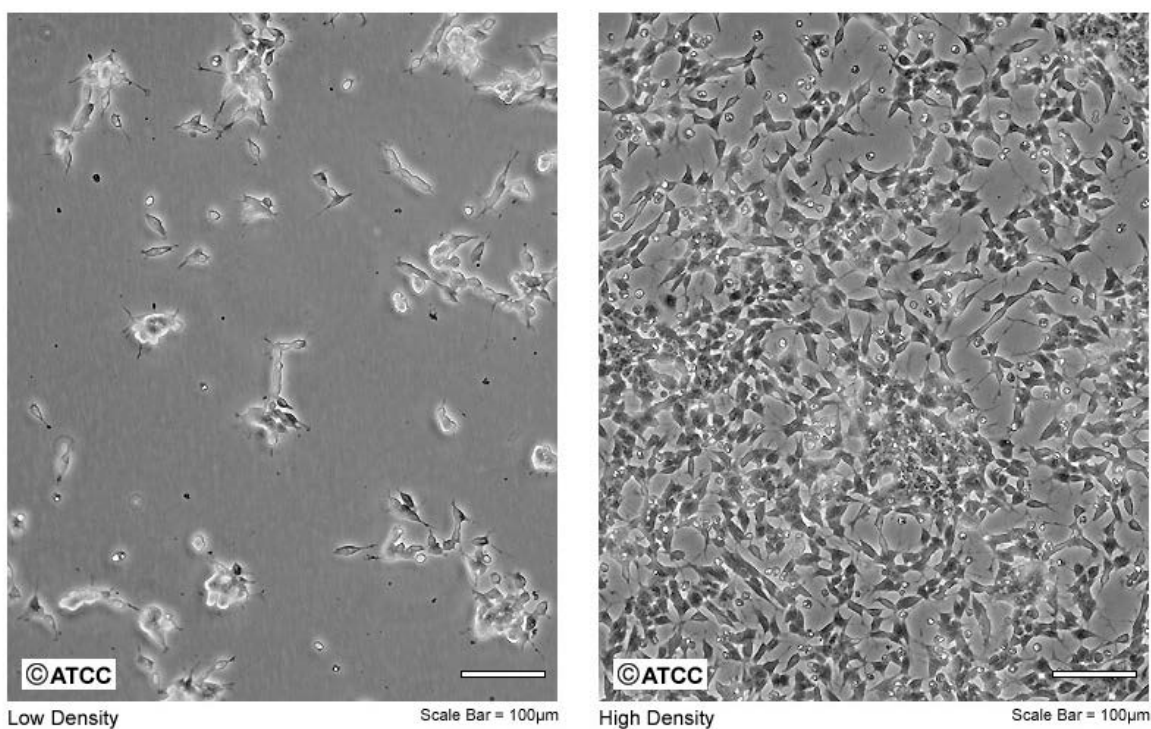


Fig. 13. Línea de neuroblastoma SH-SY5Y

<sup>207</sup> Biedler, J. L.; Helson, L.; Spengler, B. A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* **1973**, *33*, 2643.

<sup>208</sup> Biedler, J. L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M.; Freedman, L. S. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* **1978**, *38*, 3751.

### 5.6. Línea celular APPswe

La línea celular APPswe es una línea de neuroblastoma humano sobre-expresa la proteína precursora del  $\beta$ A (APP) humana, portadora de la mutación sueca (APPswe, KM670/671NL), que consiste en una doble mutación en el codon 670 y en el codon 671 del gen APP, que origina un cambio en la secuencia de aminoácidos. La transversión guanina-timina (codon 670) ocasiona la sustitución de lisina (K) por ácido aspártico (N). La transversión adenina-citosina (codon 671) se manifiesta en una sustitución de metionina (M) por leucina (L). Estos cambios ocurren inmediatamente antes del aminoácido N-terminal del  $\beta$ A. Este cambio secuencial de aminoácidos incrementa la eficacia proteolítica de  $\beta$ -secretasa, y como consecuencia, el rendimiento en la producción del péptido  $\beta$ A. Dicha mutación se asocia con la aparición temprana de la enfermedad familiar de Alzheimer, y puede promover estrés oxidativo en las células debido a la sobreproducción del péptido  $\beta$ A.

La línea celular SH-SY5Y-APPswe fue donada por el Profesor Weihong Song, de la Universidad British Columbia, Vancouver, BC, Canadá. Para su obtención la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y se cultivó en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, 2 mM de glutamina, 100 mg/ml de estreptomina, y 100 unidades/ml de penicilina. Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador con 5% de CO<sub>2</sub>. Para la transfección, las células se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a una confluencia del 70% aproximadamente, y cada frasco se transfectó con 8  $\mu$ g del plásmido pAPPswe (del Prof. Weihong Song, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canadá) utilizando 30  $\mu$ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

El ensayo de los compuestos en estudio en la línea celular APPswe nos ha permitido:

1. Seleccionar un intervalo de concentración no tóxica de los compuestos en estudio.
2. Examinar el potencial efecto neuroprotector de los compuestos en estudio mediante la determinación de la inhibición de radicales libres, generados por exposición de las células al peróxido de hidrógeno.

### 5.6.1. Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular tras el tratamiento de las células con los compuestos en estudio se determinó mediante la reducción del MTT ó bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a formazán, a partir de las deshidrogenasas mitocondriales.<sup>209</sup>

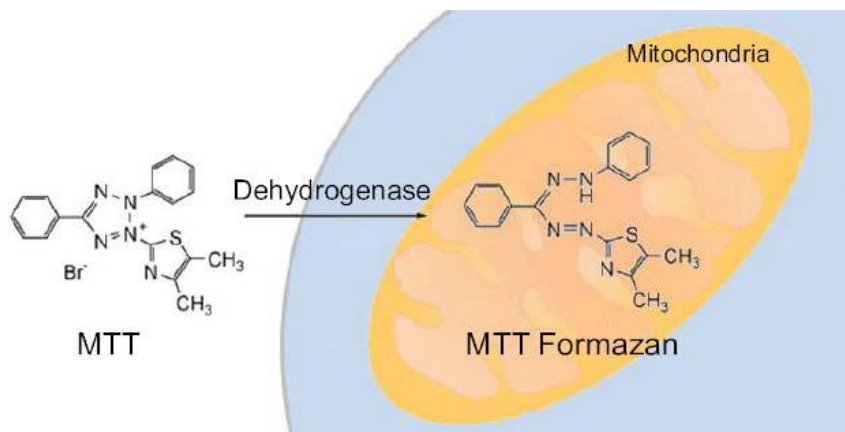


Fig. 14. Reducción del MTT

#### Procedimiento

Se procede con la siembra de 20 000 células/ pocillo en placas estériles de 96 pocillos. La placa se mantiene en incubador (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) durante 24 horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo se añaden a las células los compuestos en estudio, disueltos en el medio de cultivo (1% de suero bovino fetal), en un determinado rango de concentraciones, y se mantienen durante un periodo de 24 horas. A continuación, se determina la viabilidad celular para conocer el rango de concentración de cada compuesto carente de toxicidad, mediante la cuantificación de la respiración mitocondrial.

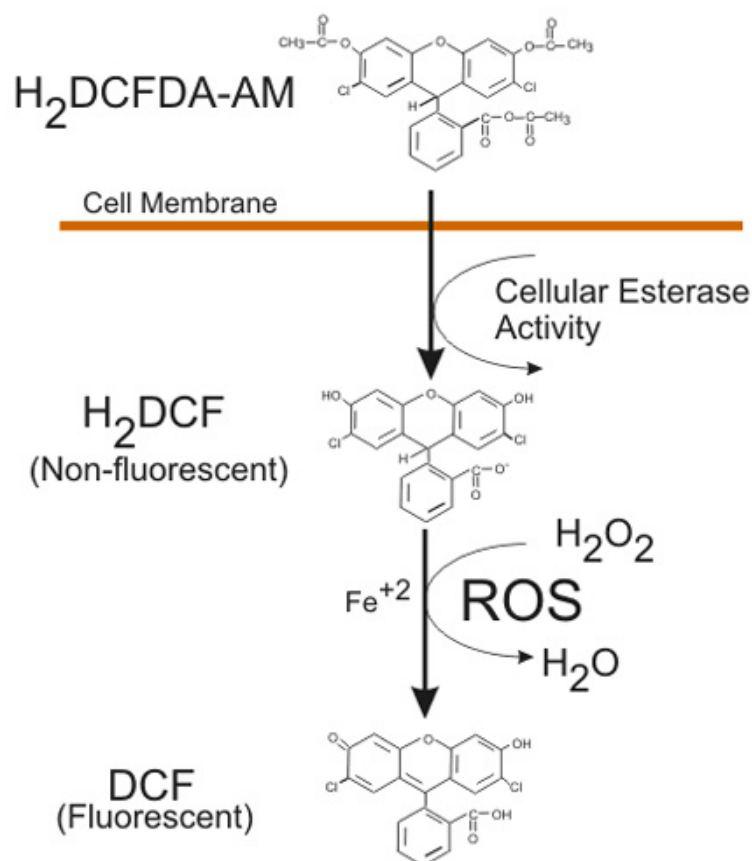
Tras las 24 horas de tratamiento se elimina el medio de cultivo y se adicionan 100 µl del medio de cultivo (1% de suero bovino fetal) más 20 µl de MTT (Sigma-Aldrich) estéril (2 mg/ml en tampón PBS) por pocillo. Se incuba la placa 1 hora a 37°C, posteriormente se elimina el medio y se añaden 100 µl de DMSO a cada pocillo para solubilizar los cristales de formazán. La producción de formazán se mide espectrofotométricamente con un lector de placas a  $\lambda = 550$  nm. Los resultados

<sup>209</sup> Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55.

se expresan en porcentaje de viabilidad, considerando el 100% de viabilidad la media aritmética de las absorbancias de los pocillos correspondientes a las células no tratadas.

### 5.6.2. Generación intracelular de radicales libres

Para la determinación de la generación intracelular de radicales libres utilizamos la técnica de la oxidación del diacetato de diclorofluorescina.<sup>210</sup> El diacetato de diclorofluorescina ( $H_2DCFDA$ ) es un compuesto no fluorescente con capacidad de atravesar la membrana celular. En el interior de la célula, por acción esterasas inespecíficas se hidroliza dando lugar a diclorofluorescina ( $H_2DCF$ , compuesto no fluorescente), que por acción de los radicales libres se oxida y se transforma en diclorofluoresceína (DCF, compuesto fluorescente). La emisión de fluorescencia se aprovecha para la cuantificación de la formación intracelular de radicales libres.



**Fig. 15.** Formación de DCF por acción de ROS.  
(Paul Held, Laboratory Manager, Applications Dept., BioTek Instruments, Inc.  
An Introduction to Reactive Oxygen Species. Measurement of ROS in Cells)

<sup>210</sup> LeBel, C.P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 227.

### *Procedimiento*

Se sembraron 20 000 células/pocillo en placa estéril de 96 pocillos. A las 24 h, se aspiró el medio de cultivo y se añadió a cada pocillo 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>DCFDA (Sigma-Aldrich) en medio de cultivo sin rojo fenol a una concentración de 20  $\mu$ M. Las células con la H<sub>2</sub>DCFDA se incubaron a 37°C durante 30 minutos en incubador para permitir que ésta atravesara las membranas y llegara al medio intracelular. A continuación se eliminó el medio que contenía H<sub>2</sub>DCFDA y se lavaron las células con PBS. Las células se trataron con los compuestos en estudio (medio sin rojo fenol) durante 30 min. Finalmente se añadió el generador de radicales libres (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100  $\mu$ M) sobre el medio anterior y se incubó la placa a 37°C durante 1 hora. Al cabo de este tiempo se midió la señal fluorimétrica ( $\lambda_{exc}$  = 485 nm;  $\lambda_{em}$  = 528 nm).

### **5.7. Línea celular BV2**

La línea celular BV2 deriva de microglia neonatal murina (ratón C57BL/6) inmortalizada mediante infección con el retrovirus J2 portador del oncogen v-raf/v-myc.<sup>211</sup> Estas células poseen actividad esterase no específica, capacidad fagocítica y carecen de actividad peroxidasa. Además, secretan lisozima y tras estimulación apropiada, interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (TNF). Tras el tratamiento con interferón gamma (INF $\gamma$ ) adquieren actividad tumoricida. Conservan la mayoría de las propiedades morfológicas, fenotípicas y funcionales descritas para células microgliales.

BV2 es la línea celular que frecuentemente se utiliza en sustitución a la microglia primaria ya que presenta determinadas ventajas frente a ésta. Por ejemplo, es muy difícil obtener cultivos absolutamente puros de microglia primaria ya que estas células se mantienen en un cultivo glial mixto primario durante aproximadamente dos semanas tras el aislamiento, hasta que son expandidas en nuevas placas para obtener cultivos secundarios. Durante el periodo inicial de las dos semanas, las células microgliales fagocitan los desechos neuronales remanentes del procedimiento de aislamiento y pueden, por tanto, sufrir modificaciones. Además, debe tenerse en cuenta que las células microgliales se aíslan normalmente de cerebros neonatales y, por tanto, no representan a la microglía adulta. Por último, la microglía está constituida por una población heterogénea de células debido a las diferencias regionales del cerebro. Por tanto, la microglía primaria puede no ser siempre representativa.

---

<sup>211</sup> Blasi, E.; Barluzzi, R.; Bocchini, V.; Mazzolla, R.; Bistoni, F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J. Neuroimmunol.* **1990**, *27*, 229.

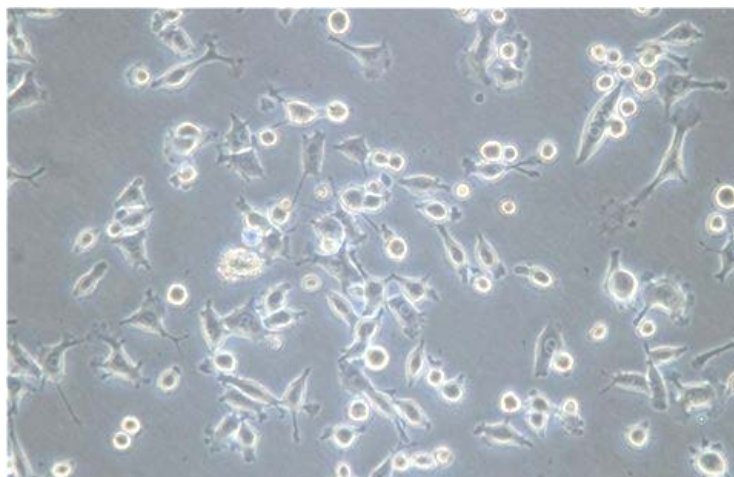


Fig. 16. Línea celular BV2

### ***Liberación de nitritos tras la activación con interferón $INF\gamma$***

La determinación de nitritos, como metabolitos estables del NO, se llevó a cabo en células BV2 activadas con interferón  $INF\gamma$ . La cuantificación de dichos metabolitos se realizó mediante el método colorimétrico basado en la reacción de Griess.<sup>212</sup> Dicha reacción se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento. El  $NO_2$  reacciona con la sulfanilamida en medio ácido produciéndose un diazocompuesto, que posteriormente, mediante una reacción de copulación con la N-1-(naftil) etilendiamina dará un compuesto azoico púrpura.<sup>213,214</sup>

Se distinguen dos etapas en la reacción:

- 1) Diazotación de la sulfanilamida, formándose un catión de diazonio incoloro.
- 2) Copulación del catión con el clorhidrato de NED, dando un colorante azoico de color púrpura.

El reactivo de Griess se prepara mezclando a partes iguales:

1. Solución de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro 0,2%.
2. Solución de sulfanilamida al 2% p/v en ácido fosfórico al 10%.

---

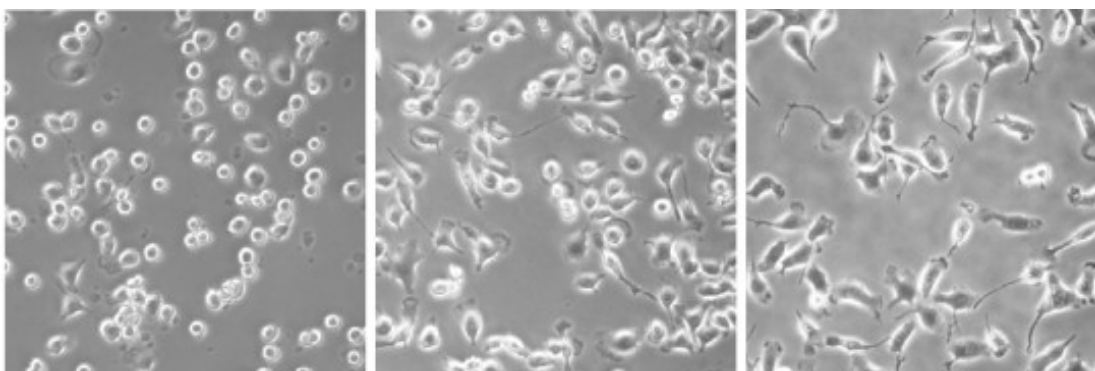
<sup>212</sup> Miranda, K. M.; Espey, M. G.; Wink, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, **2001**, *5*, 62.

<sup>213</sup> Herrera-Molina, R.; Flores, B.; Orellana, J. A.; von Bernhardt, R. Modulation of interferon-gamma-induced glial cell activation by transforming growth factor beta1: a role for STAT1 and MAPK pathways. *J. Neurochem.* **2012**, *123*, 113.

<sup>214</sup> Chow, Y. L.; Lee, K. H.; Vidyadaran, S.; Lajis, N. H.; Akhtar, M. N.; Israf, D. A.; Syahida, A. Cardamonin from *Alpinia rafflesiana* inhibits inflammatory responses in IFN-gamma/LPS-stimulated BV2 microglia via NF-kappaB signalling pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *12*, 657.

*Procedimiento*

Se tapiza previamente una placa de 24 pocillos con poli-L-lisina (0,2 mg/ml). Se deja 1 hora expuesta a la luz UV y durante 2 horas en incubador a 37°C. Se lava dos veces con agua y se seca en el incubador. Se siembran 150 000 células/pocillo en medio cultivo con suero bovino fetal al 10%, y al cabo de 24 horas de incubación a 37°C (atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%) las células son tratadas con los compuestos en estudio (en medio de cultivo carente de rojo fenol) durante 24 horas. Al cabo de 30 minutos de la adición de los compuestos, se añade interferón INF $\gamma$  (6-10 U) y se mantiene conjuntamente con el compuesto en estudio. Al final del tiempo de tratamiento se toma el medio de cultivo (sobrenadante) de cada uno de los pocillos para llevar a cabo la determinación de nitritos. La reacción colorimétrica se obtiene mezclando volúmenes iguales del sobrenadante y del reactivo de Griess. La densidad óptica se lee a  $\lambda = 550$  nm en lector de placas. Los resultados se expresan como porcentaje de liberación, considerando el 100% de liberación la media aritmética de las absorbancias de los pocillos correspondientes a las células tratadas con interferón  $\gamma$  (INF $\gamma$ ).



**Fig. 17.** Línea microglial BV2. A) Condiciones basales. B) y C) Activación microglial con INF $\gamma$

## 6. Resultados y Discusión. Naftoquinonas



## 6.1. Síntesis Química

Los compuestos **4**,<sup>215</sup> **9**,<sup>216</sup> **10**,<sup>217</sup> y **24**<sup>218</sup> fueron sintetizados siguiendo métodos convencionales previamente descritos en la bibliografía. Los compuestos **11**, **12**, **27** y **28** se sintetizaron a partir de la 1,4-naftoquinona (**1**), y los compuestos **13-17** a partir de la 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (yuglona, **3**), en ambos casos mediante arilación directa empleando ácidos borónicos y catálisis con complejos dicatiónicos de Pd(II), siguiendo la metodología original previamente desarrollada en el grupo de investigación<sup>219</sup> (fig. 18). Los compuestos **20** y **21** se sintetizaron mediante metilación y acetilación de **3**, respectivamente, siguiendo procedimientos de síntesis convencionales.<sup>5</sup> El resto de compuestos empleados en el presente estudio fueron obtenidos de proveedores comerciales (Tabla 1).

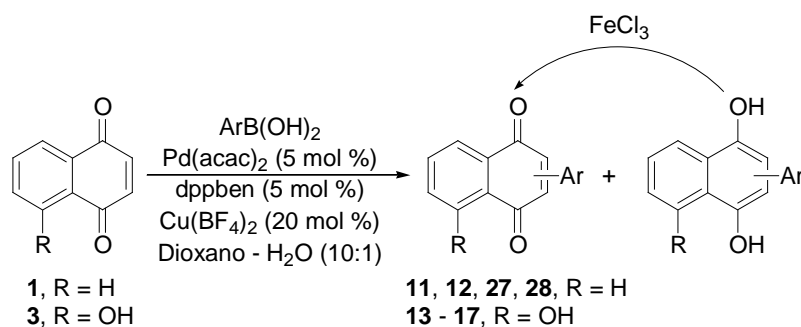


Fig. 18. Síntesis Química de naftoquinona

- <sup>215</sup> Kelly, T. R.; Parekh, N. D.; Trachtenberg, E. N. Regiochemical control in the Diels-Alder reaction of substituted naphthoquinones. The directing effects of C-6 oxygen substituents. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 5009.
- <sup>216</sup> Van, T. N.; De Kimpe, N. Synthesis of 6*H*-naphtho[2,3-*c*]chromene-7,12-diones via palladium-catalyzed intramolecular cyclization of 2-bromo-3-aryloxymethyl-1,4-naphthoquinones. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5941.
- <sup>217</sup> Tietze, L. F.; Singidi, R. R.; Gericke, K. M. Total synthesis of the proposed structure of the anthrapyran metabolite delta-indomycinone. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9939.
- <sup>218</sup> Mangel, N.; Snider, B. B. Efficient synthesis of the tetracyclic aminoquinone moiety of marmycin A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4926.
- <sup>219</sup> Molina, M. T.; Navarro, C.; Moreno, A.; Csaky, A. G. Arylation of benzo-fused 1,4-quinones by the addition of boronic acids under dicationic Pd(II)-catalysis. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4938.

Tabla 1. Numeración asignada a las 1,4-naftoquinonas

	1,4-naftoquinonas
1	1,4-naftoquinona
2	2-hidroxi-1,4-naftoquinona
3	5-hidroxi-1,4-naftoquinona
4	6-hidroxi-1,4-naftoquinona
5	5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona
6	2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona
7	2-metil-1,4-naftoquinona
8	2-bromo-1,4-naftoquinona
9	2-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona
10	3-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona
11	2-fenil-1,4-naftoquinona
12	2-( <i>p</i> -hidroxifenil)-1,4-naftoquinona
13	2-fenil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona
14	3-fenil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona
15	5-hidroxi-2-( <i>p</i> -hidroxifenil)-1,4-naftoquinona
16	5-hidroxi-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona
17	5-hidroxi-3-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona
18	5-metoxi-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona
19	3-( <i>p</i> -hidroxifenil)-5-metoxi-1,4-naftoquinona
20	5-metoxi-1,4-naftoquinona
21	5-acetoxi-1,4-naftoquinona
22	2,3-dibromo-1,4-naftoquinona
23	2,3-dicloro-1,4-naftoquinona
24	5-nitro-1,4-naftoquinona
25	2-( <i>p</i> -bromofenil)-1,4-naftoquinona
26	2-(3,4-diclorofenil)-1,4-naftoquinona

## 6.2. Viabilidad celular

La influencia de las 1,4-naftoquinonas del presente estudio en la viabilidad celular de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y fue la primera evaluación que se llevó a cabo, con el fin de determinar *in vitro*<sup>220</sup> el intervalo de concentración en el que estos compuestos no producen efecto neurotóxico. La capacidad de las células para reducir el bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a formazán<sup>221</sup> tras el tratamiento con las respectivas 1,4-naftoquinonas constituyó el indicador de integridad mitocondrial que interpretamos como una medida de la viabilidad celular.

En la Figura 19 se representa la viabilidad celular en la línea SHSY5Y (% del control) tras el tratamiento con las distintas 1,4-naftoquinonas a la concentración final de 10  $\mu$ M y durante 24 horas. Los nombres se detallan en la tabla 1. Cuando se comparó el grado de reducción del MTT a formazán por la succínico-deshidrogenasa mitocondrial celular no se encontraron diferencias significativas entre las células tratadas con las respectivas 1,4-naftoquinonas y las células control que no recibieron tratamiento.

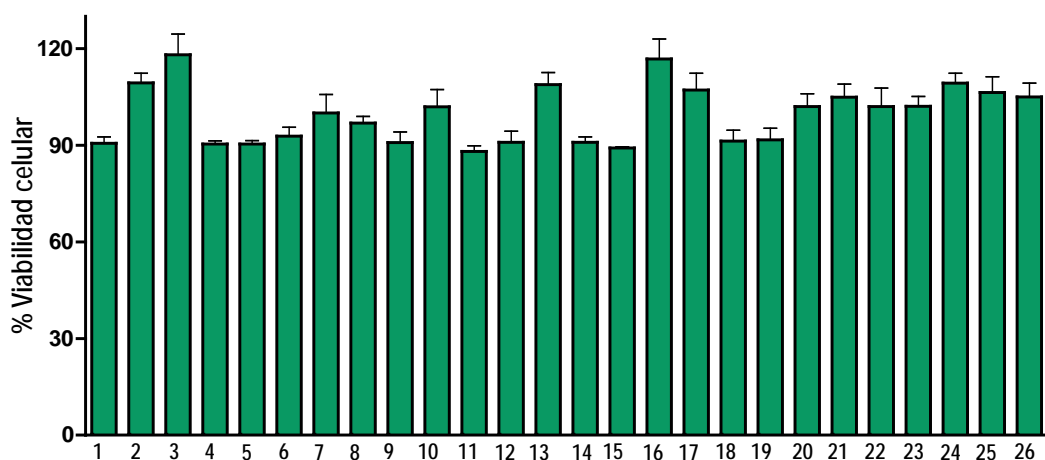


Fig. 19. Efecto tras la exposición a las respectivas 1,4-naftoquinonas

Concluimos que ninguno de los compuestos ejerció una variación significativa en el número de células viables tras 24 horas de exposición, con respecto a las células control que no recibieron tratamiento, por lo que se procedió con la evaluación de los mismos en los siguientes ensayos.

<sup>220</sup> Eisenbrand, G.; Pool-Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B. J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, S.; Lhuguenot, J. C.; Pieters, R.; Kleiner, J. Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 193.

<sup>221</sup> Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.

### 6.3. Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE)

En la Tabla 2 se recogen los porcentajes de inhibición *in vitro* de AChE a concentración 10  $\mu\text{M}$  de 1,4-naftoquinonas y la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) para los compuestos en estudio.

Las 1,4-naftoquinonas que mostraron una actividad inhibitoria significativa de AChE presentaron una  $\text{CI}_{50}$  menor de 32  $\mu\text{M}$ , concentración que no resultó ser citotóxica en el ensayo de viabilidad celular. De entre ellas, resultaron particularmente interesantes los compuestos **9** ( $\text{CI}_{50} = 3,24 \pm 0,102 \mu\text{M}$ ), **21** ( $\text{CI}_{50} = 5,07 \pm 0,994 \mu\text{M}$ ), y sobre todo el **24** ( $\text{CI}_{50} = 1,62 \pm 0,218 \mu\text{M}$ ).

Los compuestos **9** y **21** presentan como rasgo estructural común el esqueleto de 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (**3**), que sin embargo, mostró una  $\text{CI}_{50}$  considerablemente más elevada ( $\text{CI}_{50} = 32,07 \pm 0,299 \mu\text{M}$ ). El compuesto **9** presenta un átomo de bromo en la posición 2 del esqueleto de **3**. Cabe destacar que el cambio de posición del átomo de bromo de la posición 2 (**9**) a la posición 3 (**10**) se tradujo en una pérdida de actividad (**10**;  $\text{CI}_{50} = 15,30 \pm 0,149 \mu\text{M}$ ), y que la supresión del grupo hidroxilo (**8**) también se tradujo en una pérdida de actividad (**8**;  $\text{CI}_{50} = 17,10 \pm 0,627 \mu\text{M}$ ). Además, el reemplazamiento del resto acilo de **21** por metilo se tradujo en una pérdida de actividad (**20**;  $\text{CI}_{50} = 14,98 \pm 0,918 \mu\text{M}$ ).

Por su parte, en el compuesto **24** se reemplaza el grupo hidroxilo de **3** ( $\text{CI}_{50} = 32,07 \pm 0,299 \mu\text{M}$ ) por un grupo nitro, dando lugar al compuesto con mayor actividad de la serie ( $\text{CI}_{50} = 1,62 \pm 0,218 \mu\text{M}$ ).

Tabla 2. Actividad inhibitoria de AChE

	1,4-naftoquinonas	Inhibición de AChE (CI <sub>50</sub> , μM)
1	1,4-naftoquinona	24,11 ± 0,237
2	2-hidroxi-1,4-naftoquinona	-
3	5-hidroxi-1,4-naftoquinona	32,07 ± 0,299
4	6-hidroxi-1,4-naftoquinona	
5	5,8- dihidroxi-1,4-naftoquinona	26,16 ± 0,131
6	2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	-
7	2-metil-1,4-naftoquinona	-
8	2-bromo-1,4-naftoquinona	17,10 ± 0,627
9	2-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	3,24 ± 0,102
10	3-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	15,30 ± 0,149
11	2-fenil-1,4-naftoquinona	-
12	2-( <i>p</i> -hidroxifenil)-1,4-naftoquinona	-
13	2-fenil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	-
14	3-fenil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	-
15	5-hidroxi-2-( <i>p</i> -hidroxifenil)-1,4-naftoquinona	-
16	5-hidroxi-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	-
17	5-hidroxi-3-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	-
18	5-metoxi-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	-
19	3-( <i>p</i> -hidroxifenil)-5-metoxi-1,4-naftoquinona	-
20	5-metoxi-1,4-naftoquinona	14,98 ± 0,918
21	5-acetoxi-1,4-naftoquinona	5,07 ± 0,994
22	2,3-dibromo-1,4-naftoquinona	-
23	2,3-dicloro-1,4-naftoquinona	-
24	5-nitro-1,4-naftoquinona	1,62 ± 0,218
25	2-( <i>p</i> -bromofenil)-1,4-naftoquinona	-
26	2-(3,4-diclorofenil)-1,4-naftoquinona	-

#### 6.4. Actividad inhibitoria de $\beta$ -secretasa

La actividad  $\beta$ -secretasa (BACE-1,  *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme1*) representa el paso limitante de la velocidad en la generación de péptidos  $\beta$ A.<sup>222</sup> La determinación de la actividad inhibitoria de  $\beta$ -secretasa *in vitro* de las 1,4-naftoquinonas en estudio se justifica por el hecho de que la inhibición farmacológica parcial de  $\beta$ -secretasa *in vivo* puede reducir la amiloidosis y alcanzar una eficacia terapéutica.<sup>223</sup>

Los valores de  $CI_{50}$  de 1,4-naftoquinonas en la inhibición *in vitro* de  $\beta$ -secretasa se muestran en la Tabla 3.

Se observa que mientras 1,4-naftoquinona (1) no mostró ningún efecto inhibitor, la presencia de varios sustituyentes hizo aumentar significativamente la inhibición de  $\beta$ -secretasa.

Mientras la sustitución en el C-2 con metilo fue ineficaz (7), la presencia de un anillo de fenilo en el C-2 (11) aumentó la inhibición de  $\beta$ -secretasa, que fue aún mayor con la presencia de un sustituyente *p*-OH en el anillo de dicho fenilo (2). Sin embargo, otros patrones de sustitución del anillo fenilo como *p*-bromo (25) ó 3,4-dicloro (26) dieron lugar a una pérdida de la actividad inhibitoria. La sustitución en el C-2 por bromo (8) no promovió ningún tipo de inhibición de  $\beta$ -secretasa, así como la sustitución simultánea por halógeno en el C-2 y el C-3 (22 y 24).

La sustitución en el anillo 1,4-naftoquinona por grupos hidroxilo rindió compuestos interesantes y, así por ejemplo, la sustitución en el C-2 por OH (2) proporcionó un compuesto activo. También se encontró actividad inhibitoria en la 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (3). La presencia simultánea de un grupo hidroxilo adicional en el C-8 (5) dio lugar a una ligera pérdida de actividad. La ubicación del grupo OH en el C-6 (4) no mostró ninguna inhibición enzimática.

Estudiando la modificación de la estructura 5-hidroxi-1,4-naftoquinona por la inclusión de sustituyentes en el C-2, se observó que la presencia de bromo en el C-2 (9) dio lugar a una ligera disminución de la inhibición enzimática en comparación con el compuesto original (3). Por otro lado, la presencia de un grupo metilo dio lugar a una fuerte disminución de la actividad (6). Esto también ocurrió con la presencia en el C-2 de un grupo fenilo (13). La modificación del anillo fenilo por la

---

<sup>222</sup> Ashton Acton, Q. Secretory Proteinase Inhibitory Proteins—Advances in Research and Application. Scholarly Editions. Atlanta, Georgia, 2013.

<sup>223</sup> McConlogue, L.; Buttini, M.; Anderson, J. P.; Brigham, E. F.; Chen, K. S.; Freedman, S. B.; Games, D.; Johnson-Wood, K.; Lee, M.; Zeller, M.; Liu, W.; Motter, R.; Sinha, S. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 26326.

presencia de un grupo *p*-OH (**15**) redujo aún más la inhibición de  $\beta$ -secretasa, y la presencia de un grupo *p*-metoxi (**16**) generó un compuesto completamente inactivo. Por otro lado, la sustitución con un grupo fenilo en el C-3 (**14**) condujo a un compuesto más activo que el compuesto con sustitución fenilo en el C-2 (**13**). Una vez más, la modificación del anillo fenilo por un grupo *p*-metoxi (**17**) condujo a una pérdida de la actividad inhibitoria de  $\beta$ -secretasa. No se encontró actividad en el compuesto a que dio lugar la sustitución de bromo en el C-3 (**10**).

También se ensayó el efecto de la protección del grupo OH de la 5-hidroxi-1,4-naftoquinona. Tanto la 5-metoxi-1,4-naftoquinona (**20**) como la 5-acetoxi-1,4-naftoquinona (**21**) no mostraron ninguna inhibición de  $\beta$ -secretasa. Este fue también el caso con la introducción de sustituyentes arilo en el C-2 o en el C-3 de la estructura de 5-metoxi-1,4-naftoquinona (**18** y **19**). La sustitución del grupo OH en el C-5 por un grupo nitro (**24**) dio lugar a un compuesto inactivo.

La mayoría de las 1,4-naftoquinonas con actividad inhibidora de  $\beta$ -secretasa presentó una  $CI_{50}$  menor de 10  $\mu$ M (aunque en algunas fue ligeramente superior), concentración que no resultó ser citotóxica en el ensayo de viabilidad celular.

Tabla 3. Actividad inhibitoria del enzima  $\beta$ -secretasa

	1,4-naftoquinonas	Inhibición de $\beta$ -secretasa (CI <sub>50</sub> , $\mu$ M)
1	1,4-naftoquinona	-
2	2-hidroxi-1,4-naftoquinona	5,96
3	5-hidroxi-1,4-naftoquinona	6,51
4	6-hidroxi-1,4-naftoquinona	-
5	5,8- dihidroxi-1,4-naftoquinona	9,08
6	2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	12,92
7	2-metil-1,4-naftoquinona	-
8	2-bromo-1,4-naftoquinona	-
9	2-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	7,86
10	2-bromo-8-hidroxi-1,4-naftoquinona	-
11	2-fenil-1,4-naftoquinona	9,33
12	2-( <i>p</i> -hidroxifenil)-1,4-naftoquinona	8,22
13	2-fenil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	12,56
14	3-fenil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	8,98
15	5-hidroxi-2-( <i>p</i> -hidroxifenil)-1,4-naftoquinona	16,09
16	5-hidroxi-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	-
17	5-hidroxi-3-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	-
18	5-metoxi-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	11,21
19	3-( <i>p</i> -hidroxifenil)-5-metoxi-1,4-naftoquinona	10,31
20	5-metoxi-1,4-naftoquinona	-
21	5-acetoxi-1,4-naftoquinona	-
22	2,3-dibromo-1,4-naftoquinona	-
23	2,3-dicloro-1,4-naftoquinona	-
24	5-nitro-1,4-naftoquinona	-
25	2-( <i>p</i> -bromofenil)-1,4-naftoquinona	-
26	2-(3,4-diclorofenil)-1,4-naftoquinona	-

## 6.5. Fibrilogénesis del péptido $\beta$ -amiloide

Llevamos a cabo una evaluación, tanto cualitativa como cuantitativa, de la influencia de las 1,4-naftoquinonas en el proceso de fibrilogénesis del péptido  $\beta$ A. En definitiva, pretendimos determinar tanto la capacidad de los compuestos para inhibir el proceso de agregación del péptido como la capacidad de los mismos para interferir con las interacciones peptídicas  $\beta$ A- $\beta$ A desagregando, como consecuencia, las fibrillas preformadas del péptido. En ambos casos, utilizamos un modelo simplificado de fibrilogénesis *in vitro*, a partir de la incubación a 37°C y durante 96 horas de un péptido  $\beta$ A (25-35) comercial en forma de monómero en solución.

### 6.5.1. Evaluación cualitativa. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica nos permitió hacer una evaluación cualitativa de la capacidad de interacción que ejercen los compuestos en estudio sobre la fibrilogénesis *in vitro*. Las fibras obtenidas tras la incubación a 37°C se visualizaron al microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-4000 EX, Centro de Apoyo a la Investigación, Universidad Complutense de Madrid) mediante tinción negativa con acetato de uranilo al 2%.

En la Figura 20, que aparece a continuación, se muestran seis micrografías representativas (A-F) de los productos obtenidos de la incubación del péptido  $\beta$ A (25-35) (10  $\mu$ M) a 37°C y durante 96 horas. Se muestra el efecto de algunas 1,4-naftoquinonas (10  $\mu$ M) que mostraron efecto inhibitorio en el proceso de fibrilogénesis *in vitro*.

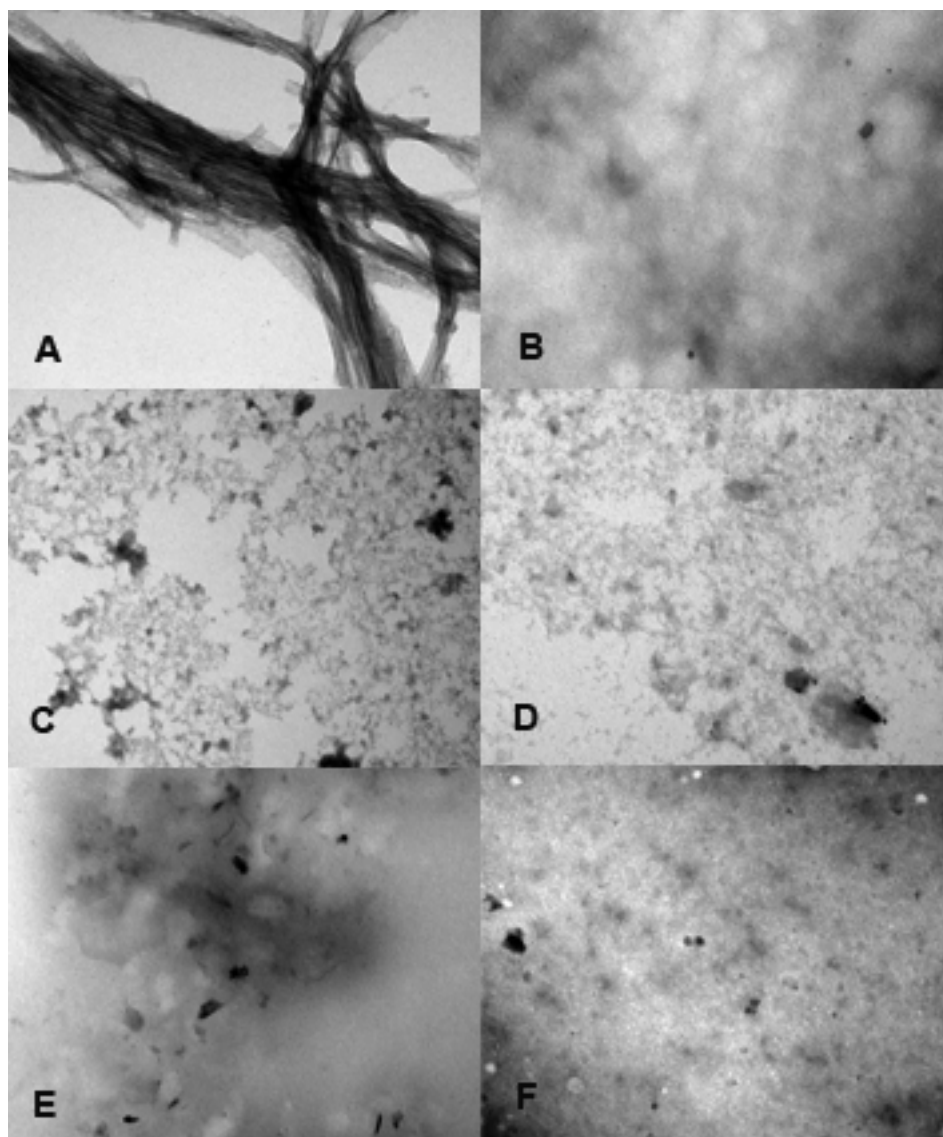


Fig. 20. Micrografía de los productos de la fibrillogénesis *in vitro* del péptido  $\beta$ A (25-35)  
A)  $\beta$ A (Control). B)  $\beta$ A + (1). C)  $\beta$ A + (4)  
D)  $\beta$ A + (8). E)  $\beta$ A + (19). F)  $\beta$ A + (24). Barra de escala, 200 nm

En la Figura 20A, procedente de la incubación del péptido en ausencia de 1,4-naftoquinonas (reacción control), se pueden observar los depósitos de  $\beta$ A como manojos de fibras no ramificadas, de aspecto recto y rígido, de longitud variable, y de diámetro del orden de 75-120 Å.

En las Figuras 20B-20F se muestra el producto de la incubación del péptido  $\beta$ A en presencia de las 1,4-naftoquinonas 1, 4, 8, 19 y 24, respectivamente. En todos los casos se observan microagregados de partículas de amiloide insoluble, de tamaño variable, no filamentosos, indicando diferentes grados de inhibición del proceso de fibrillogénesis *in vitro*.

### 6.5.2. Evaluación cuantitativa. Espectroscopía de fluorescencia

La evaluación cuantitativa del proceso de fibrillogénesis se llevó a cabo mediante espectroscopía de fluorescencia de fase resuelta, basada en la emisión de fluorescencia de un colorante benzotiazol, la tioflavina T. El *tiempo de vida media de fluorescencia* (emitida por el fluoróforo, tioflavina T) es proporcional al grado de fibrilación del péptido. La variación en el tiempo de vida media de fluorescencia por efecto de las 1,4-naftoquinonas nos permitió cuantificar tanto el grado de inhibición de la agregación del péptido como el grado de desagregación del mismo.

Las medidas de fluorescencia con resolución temporal fueron realizadas en el dominio de tiempos, utilizando la técnica de conteo de fotones únicos correlacionados temporalmente (Time-Correlated Single-Photon Counting, TCSPC).<sup>224,225</sup> La muestra se excitó mediante un corto pulso de luz láser y la respuesta fluorescente se detectó en función del tiempo. En definitiva, los pulsos de excitación láser de la muestra dieron lugar a un histograma en el analizador multicanal que representa el número de cuentas en cada canal, y se corresponde con el perfil de decaimiento de la fluorescencia de la muestra. El tiempo de adquisición de la fluorescencia que se empleó con cada una de las muestras fue el necesario hasta alcanzar una señal predeterminada de 10 000 cuentas.

#### ***1,4-Naftoquinonas en la inhibición de la agregación del péptido $\beta$ A***

En la figura 21 se representa el histograma de probabilidad de cuentas de las muestras analizadas, es decir, tioflavina T- $\beta$ A (10  $\mu$ M) frente a tioflavina T- $\beta$ A-1,4-naftoquinona, para el compuesto 4. Junto a la figura aparece una tabla con los valores de los tiempos de vida media de fluorescencia ( $\tau$ ) de tioflavina T- $\beta$ A en comparación con los de tioflavina T- $\beta$ A-1,4-naftoquinona, a diferentes concentraciones de 1,4-naftoquinona.

Se puede observar cómo el mayor tiempo de vida media de fluorescencia corresponde al producto de la incubación del péptido  $\beta$ A en ausencia de compuestos potencialmente inhibidores, y representa el 100% de agregación fibrilar (gráfico de dispersión en color rojo). La incubación del péptido en presencia de concentraciones crecientes de diversas 1,4-naftoquinonas provocó un descenso en el tiempo de vida media de la fluorescencia de la tioflavina T, aproximándose a la

---

<sup>224</sup> Birch, D. J. S.; Imhof, R. E. "Time-domain fluorescence spectroscopy using time correlated single-photon counting". En Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol 1. Techniques. Editado por Lakowicz J.R. Plenum Press, New York, 1991, 1.

<sup>225</sup> Lakowicz, J. R. En: Principles of fluorescence spectroscopy, 2ª Edición. Editado por Lakowicz, J. R. Kluwer Academic-Plenum Publishers, 1999.

respuesta instrumental (*Prompt*, gráfico de dispersión en color negro) a la concentración más elevada (10  $\mu\text{M}$ ) de 1,4-naftoquinona ensayada.

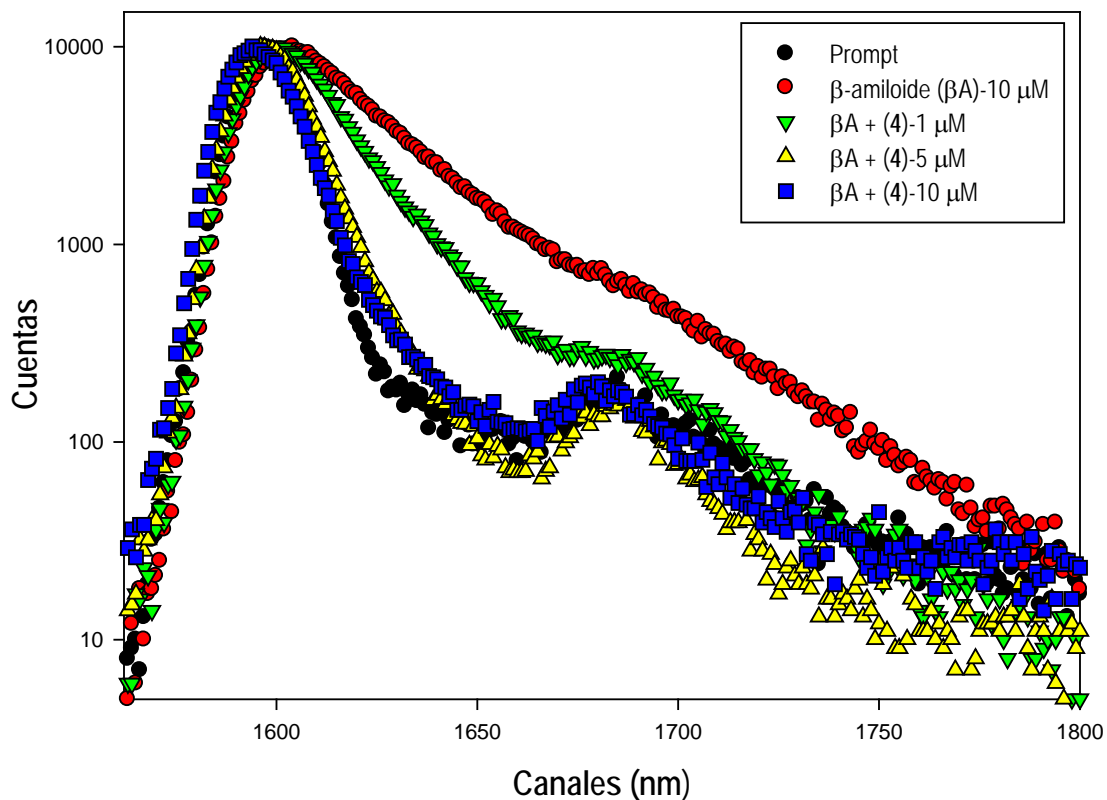


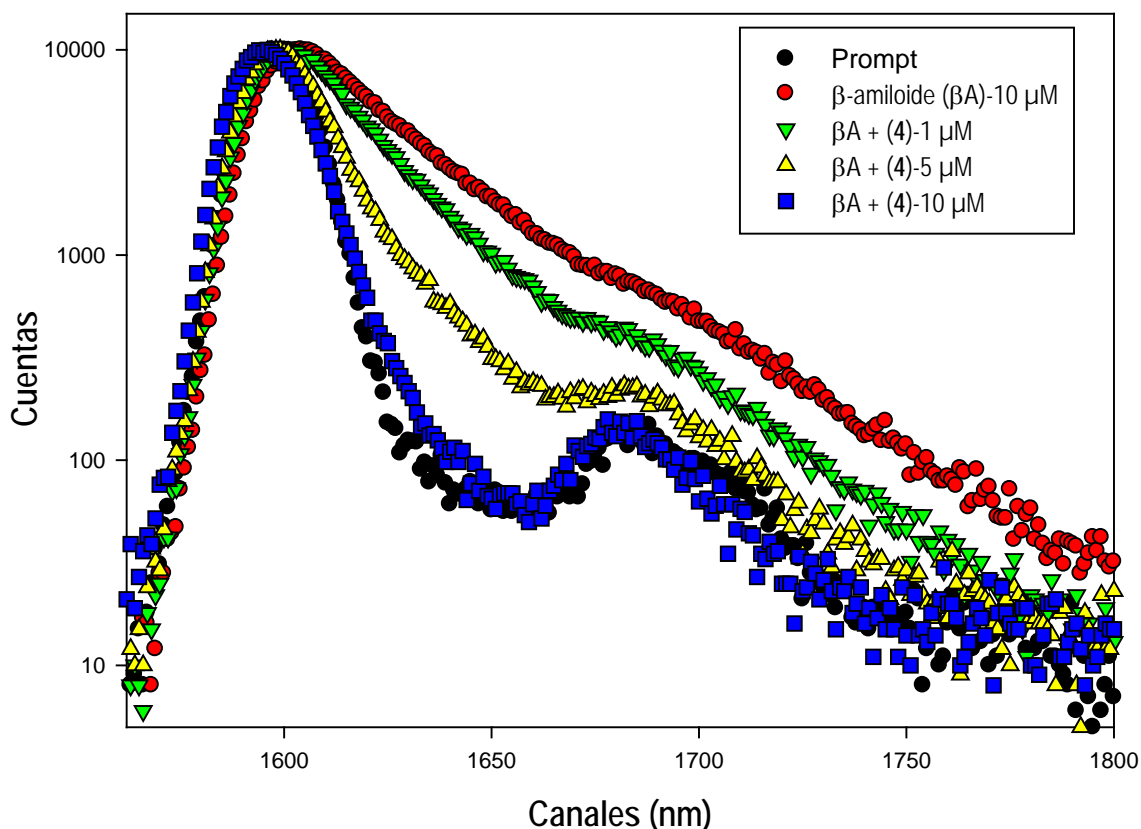
Fig. 21. Decaimiento de la fluorescencia de tioflavina T- $\beta\text{A}$  (10  $\mu\text{M}$ ).  
Efecto de 6-hidroxi-1,4-naftoquinona (4)

$\beta\text{A} \pm (4)$	Tiempo de vida media $\tau_f$ (ns)
$\beta\text{A}$ 10 $\mu\text{M}$	2,050
$\beta\text{A}$ + 6-hidroxi-1,4-naftoquinona (4)-1 $\mu\text{M}$	1,210
$\beta\text{A}$ + 6-hidroxi-1,4-naftoquinona (4)-5 $\mu\text{M}$	0,531
$\beta\text{A}$ + 6-hidroxi-1,4-naftoquinona (4)-10 $\mu\text{M}$	0,022

### ***1,4-Naftoquinonas en la desagregación del péptido $\beta$ A***

En la figura 22 se representa el histograma de probabilidad de cuentas de las muestras analizadas, es decir, tioflavina T- $\beta$ A y tioflavina T- $\beta$ A-1,4-naftoquinona, para el compuesto 4. Junto a la figura aparece una tabla con los valores de los tiempos de vida media de fluorescencia ( $\tau_f$ ) de tioflavina T- $\beta$ A en comparación con los de tioflavina T- $\beta$ A-1,4-naftoquinona a diferentes concentraciones de 1,4-naftoquinona.

Se puede observar cómo el mayor tiempo de vida media de fluorescencia corresponde al producto de la incubación del péptido amiloide previamente agregado en ausencia de potenciales desagregantes, y representa el 100% de agregación fibrilar (gráfico de dispersión en color rojo). La incubación del péptido, previamente agregado, junto a concentraciones crecientes de diversas 1-4 naftoquinonas durante 96 horas provoca un descenso en los tiempos de vida media, acercándose al valor instrumental a la mayor concentración (*Prompt*, gráfico de dispersión en color en negro).

Fig. 22. Decaimiento de la fluorescencia de tioflavina T- $\beta$ A (10  $\mu$ M).

Efecto de 6-hidroxi-1,4-naftoquinona (4)

$\beta$ A $\pm$ (4)	Tiempo de vida media $\tau_f$ (ns)
$\beta$ A 10 $\mu$ M	1,990
$\beta$ A + 6-hidroxi-1,4-naftoquinona (4)-1 $\mu$ M	1,090
$\beta$ A + 6-hidroxi-1,4-naftoquinona (4)-5 $\mu$ M	0,149
$\beta$ A + 6-hidroxi-1,4-naftoquinona (4)-10 $\mu$ M	0,022

Los *tiempos de vida media de fluorescencia* obtenidos nos permitieron cuantificar la actividad de 1,4-naftoquinonas en términos de porcentaje de inhibición de la agregación del péptido  $\beta$ A y de porcentaje de desagregación del mismo, respectivamente. A partir de estos valores se calculó la  $CI_{50}$  de cada una de las 1,4-naftoquinonas en ambos procesos (Tabla 4).

Tabla 4.  $CI_{50}$  de 1,4-naftoquinonas en la fibrillogénesis del péptido  $\beta A$ 

	1,4-naftoquinonas	Inhibición agregación $\beta A$ ( $CI_{50}$ , $\mu M$ )	Desagregación fibrillas $\beta A$ ( $CI_{50}$ , $\mu M$ )
1	1,4-naftoquinona	12,43	11,32
2	2-hidroxi-1,4-naftoquinona	-	-
3	5-hidroxi-1,4-naftoquinona	11,10	15,49
4	6-hidroxi-1,4-naftoquinona	2,75	6,70
5	5,8- dihidroxi-1,4-naftoquinona	-	-
6	2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	-	-
7	2-metil-1,4-naftoquinona	-	-
8	2-bromo-1,4-naftoquinona	6,44	-
9	2-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	17,25	-
10	2-bromo-8-hidroxi-1,4-naftoquinona	18,65	-
11	2-fenil-1,4-naftoquinona	-	-
12	2-( <i>p</i> -hidroxifenil)-1,4-naftoquinona	-	-
13	2-fenil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	-	-
14	3-fenil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	-	-
15	5-hidroxi-2-( <i>p</i> -hidroxifenil)-1,4-naftoquinona	-	-
16	5-hidroxi-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	-	-
17	5-hidroxi-3-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	-	-
18	5-metoxi-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	22,25	-
19	3-( <i>p</i> -hidroxifenil)-5-metoxi-1,4-naftoquinona	16,59	5,05
20	5-metoxi-1,4-naftoquinona	-	-
21	5-acetoxi-1,4-naftoquinona	-	-
22	2,3-dibromo-1,4-naftoquinona	-	-
23	2,3-dicloro-1,4-naftoquinona	-	-
24	5-nitro-1,4-naftoquinona	4,36	6,28
25	2-( <i>p</i> -bromofenil)-1,4-naftoquinona	-	-
26	2-(3,4-diclorofenil)-1,4-naftoquinona	-	-

Los compuestos **4** y **8** presentaron los valores más bajos de  $CI_{50}$  (Tabla 4) en la inhibición de la agregación. Como desagregantes de las fibrillas  $\beta A$  destacaron los compuestos **4** y **19** por presentar los valores de  $CI_{50}$  más bajos (Tabla 4).

Se observó que algunas de las 1,4-naftoquinonas que habían demostrado inhibición de  $\beta$ -secretasa también podían inhibir la agregación del péptido  $\beta$ A y/o desagregar las fibrillas preformadas de dicho péptido (3 y 19) (Tablas 3 y 4). Entre las 1,4-naftoquinonas con C-2 sustituido, el derivado 2-bromo (8) inhibió la agregación de  $\beta$ A pero no tuvo efecto en la desagregación. Sin embargo, 2-metil-1,4-naftoquinona (7), los derivados con un grupo arilo en C-2 (11, 12, 25, 26), así como los derivados dihalogenados (22 y 23) no presentaron actividad ni en agregación ni en desagregación del péptido  $\beta$ A. Por otro lado, se observó que 1,4-naftoquinona (1), que no había mostrado ninguna inhibición significativa de  $\beta$ -secretasa, era capaz de inhibir la agregación de  $\beta$ A y también de desagregar las fibrillas.

Entre los derivados hidroxilados de 1,4-naftoquinona que mostraron actividad inhibidora de la actividad  $\beta$ -secretasa (2, 3, 5, 6 y 9), 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (2) fue inactiva tanto en la agregación como en la desagregación de  $\beta$ A. Sin embargo, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (3) fue ligeramente activa en ambos procesos de la fibrillogénesis, y el 2-bromo derivado (9) inhibió la agregación de  $\beta$ A pero no tuvo el mismo efecto en la desagregación.

Por otro lado, se encontró que la 2-bromo-8-hidroxi-1,4-naftoquinona (10) y la 6-hidroxi-1,4-naftoquinona (4), que no habían mostrado ninguna inhibición de  $\beta$ -secretasa, podían inhibir la agregación de  $\beta$ A y, además, se encontró que también este último (4) era capaz de desagregar las fibrillas de  $\beta$ A. De una manera similar, la 5-nitro-1,4-naftoquinona (24) fue activa tanto inhibiendo la agregación como en la promoción de la desagregación de las fibrillas de  $\beta$ A.

El 5-metoxi derivado (18), que había demostrado actividad inhibitoria de  $\beta$ -secretasa, fue activo sólo en la inhibición de la agregación de  $\beta$ A, a diferencia del derivado 19 que fue activo en ambos procesos de la fibrillogénesis.

### 6.6. Actividad inhibitoria de la liberación de óxido nítrico

En la puesta a punto del modelo de generación de NO en células microgliales BV2 como modelo de inflamación, se ensayó un rango de concentraciones de INF $\gamma$  (6-10 U/ml) durante un tiempo de exposición de 24 horas. Se seleccionó la concentración de 10 U/ml, ya que ésta podría permitir detectar un incremento significativo de la concentración de nitritos respecto de las células control (Fig. 23), a la vez que no producía variación significativa de la viabilidad celular (Fig. 24).

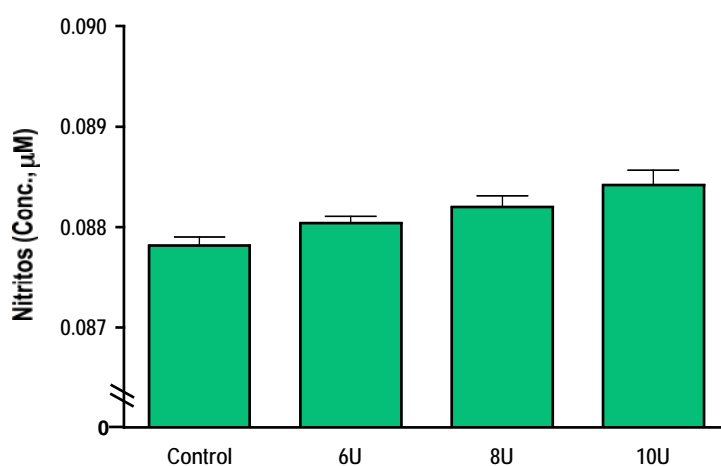


Fig. 23. Efecto de la concentración de INF $\gamma$  en la generación de nitritos en la línea microglial BV2

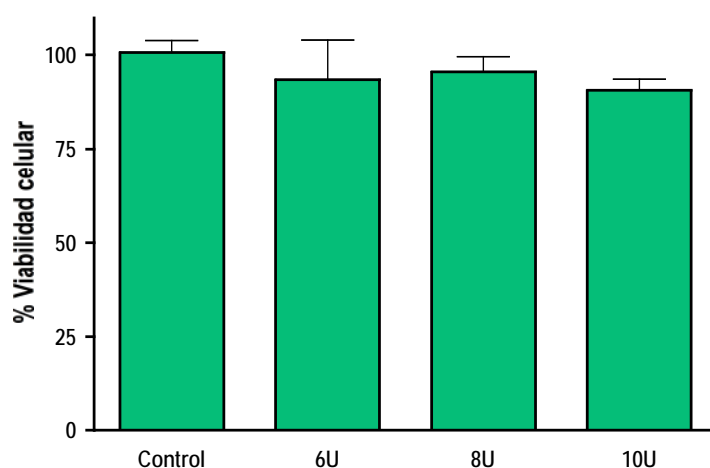


Fig. 24. Efecto de la concentración de INF $\gamma$  en la viabilidad de la línea microglial BV2

Previamente a la evaluación de la inhibición de la liberación de NO por los compuestos en estudio, mediante la determinación de la concentración de nitritos (metabolito estable del NO) en el medio de cultivo, se evaluó la viabilidad de la línea celular BV2 tras el tratamiento con los mismos

(10  $\mu$ M, 24 h), con el fin de determinar su posible toxicidad. De esta forma se descarta que la posible inhibición de la formación de nitritos no sea debida a la disminución de la viabilidad celular por el tratamiento con el compuesto en estudio a una concentración tóxica. Los porcentajes de viabilidad celular en células BV2 se muestran en la figura 25.

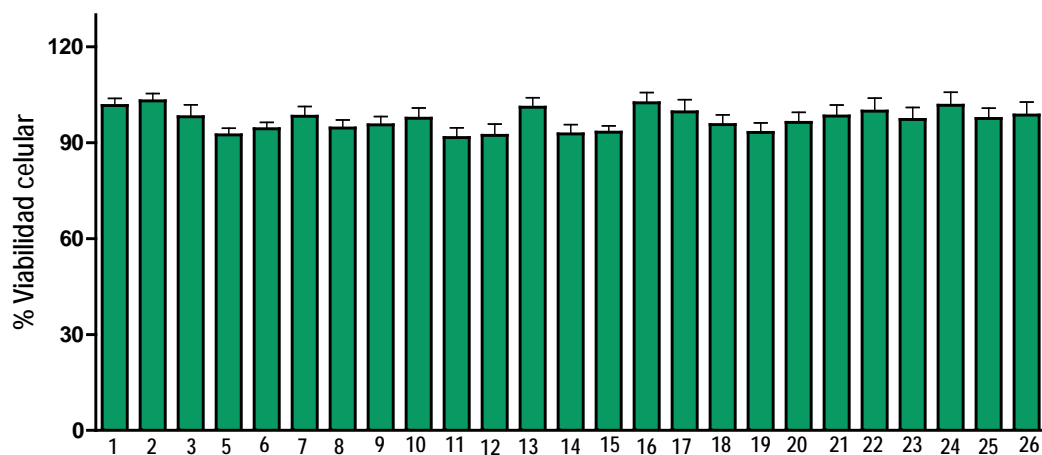


Fig 25. Viabilidad de células BV2 tras el tratamiento con 1,4-naftoquinonas

Los porcentajes de viabilidad celular resultaron superiores al 90% del control para todos los compuestos. No se observaron diferencias significativas en los valores de viabilidad celular para ninguna de los compuestos respecto de las células control que no recibieron tratamiento. El compuesto 4 (6-hidroxi-1,4-naftoquinona) no ha sido ensayado.

Los valores de los porcentajes de inhibición de 1,4-naftoquinonas en la liberación de NO se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Inhibición de 1,4-naftoquinonas en la liberación de óxido nítrico

	1,4-naftoquinonas	% Inhibición
1	1,4-naftoquinona	25,42 ± 1,352
2	2-hidroxi-1,4-naftoquinona	47,25 ± 2,361
3	5-hidroxi-1,4-naftoquinona	43,01 ± 2,584
5	5,8- dihidroxi-1,4-naftoquinona	47,88 ± 2,211
6	2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	46,22 ± 2,693
7	2-metil-1,4-naftoquinona	35,85 ± 1,684
8	2-bromo-1,4-naftoquinona	25,8 ± 1,122
9	2-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	40,41 ± 2,046
10	3-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	44,46 ± 2,579
11	2-fenil-1,4-naftoquinona	10,26 ± 0,683
12	2-( <i>p</i> -hidroxifenil)-1,4-naftoquinona	33,24 ± 1,955
13	2-fenil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	37,39 ± 1,764
14	3-fenil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona	33,66 ± 1,812
15	5-hidroxi-2-( <i>p</i> -hidroxifenil)-1,4-naftoquinona	52,42 ± 3,050
16	5-hidroxi-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	42,16 ± 2,273
17	5-hidroxi-3-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	22,85 ± 1,731
18	5-metoxi-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-1,4-naftoquinona	27,74 ± 2,146
19	3-( <i>p</i> -hidroxifenil)-5-metoxi-1,4-naftoquinona	17,64 ± 2,688
20	5-metoxi-1,4-naftoquinona	17,42 ± 1,594
21	5-acetoxi-1,4-naftoquinona	38,79 ± 2,170
22	2,3-dibromo-1,4-naftoquinona	26,75 ± 1,731
23	2,3-dicloro-1,4-naftoquinona	17,95 ± 2,556
24	5-nitro-1,4-naftoquinona	14,18 ± 1,975
25	2-( <i>p</i> -bromofenil)-1,4-naftoquinona	13,76 ± 1,523
26	2-(3,4-diclorofenil)-1,4-naftoquinona	15,03 ± 2,114

A la concentración de 10  $\mu$ M todos los compuestos estudiados mostraron porcentajes de inhibición de la liberación de NO. El compuesto **15** resultó ser el más activo de la serie. Dicho compuesto presenta como rasgos estructurales un esqueleto de 5-hidroxi-1,4-naftoquinona sustituido en su posición 2 por un resto *p*-hidroxifenilo. En comparación, la 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (**3**) y el compuesto **16** en el que el grupo OH presente del resto fenilo de **15** se ha

reemplazado por un grupo OMe, mostraron porcentajes de inhibición tan solo ligeramente inferiores, mientras que la actividad fue menor para el compuesto **13**, desprovisto el sustituyente hidroxilo del resto fenilo, y en el compuesto **17**, en el que el grupo *p*-metoxifenilo ocupa la posición 3 del anillo de 1,4-naftoquinona. La metilación adicional del grupo OH de la posición 5 del anillo de 1,4-naftoquinona de **15** (**18**) también se tradujo en una disminución considerable de la actividad. También se observó una notable disminución de la actividad en ausencia del grupo OH de la posición 5 del anillo de 1,4-naftoquinona (**12**).

Finalmente, las 1,4-naftoquinonas más activas en el proceso de fibrillogénesis, con valores de  $CI_{50}$  inferiores a 10  $\mu$ M, podrían ajustarse a los siguientes criterios: (1) Ser suficientemente hidrófobas para interferir con las interacciones hidrofóbicas en las fibrillas del péptido  $\beta$ A; (2) Ser suficientemente hidrosolubles para llevar a cabo su ensayo *in vitro*; (3) Poseer un bajo peso molecular que les permita atravesar la barrera hematoencefálica; y (4) Carecer de neurotoxicidad a las concentraciones necesarias para ejercer una inhibición eficaz de la agregación del péptido  $\beta$ A.

Actualmente, los inhibidores de  $\beta$ -secretasa son objeto de intenso estudio y se han desarrollado un gran número de inhibidores peptidomiméticos.<sup>226,227</sup> Sin embargo, ya que los compuestos con potencial uso clínico en la terapia de la EA deben cruzar la barrera hematoencefálica, la inhibición de  $\beta$ -secretasa por este tipo de compuestos peptidomiméticos supone un reto.<sup>228</sup> La glicoproteína-P (P-gp), que se encuentra en la barrera hematoencefálica y en otras barreras biológicas, constituye un factor limitante en el desarrollo de inhibidores de  $\beta$ -secretasa. P-gp es una proteína transportadora de membrana asociada al fenómeno de resistencia a múltiples fármacos (*Multi-drug resistance*, MDR), que actúa secretando una gran variedad de sustancias endógenas y xenobióticos desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular a través de un mecanismo dependiente de ATP. Entre las propiedades fisicoquímicas que se barajan como requisitos para que un compuesto atraviese la barrera hematoencefálica y alcance

---

<sup>226</sup> Maillard, M. C.; Hom, R. K.; Benson, T. E.; Moon, J. B.; Mamo, S.; Bienkowski, M.; Tomasselli, A. G.; Woods, D. D.; Prince, D. B.; Paddock, D. J.; Emmons, T. L.; Tucker, J. A.; Dappen, M. S.; Brogley, L.; Thorsett, E. D.; Jewett, N.; Sinha, S.; John, V. Design, synthesis, and crystal structure of hydroxyethyl secondary amine-based peptidomimetic inhibitors of human beta-secretase. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 776.

<sup>227</sup> Hom, R. K.; Gailunas, A. F.; Mamo, S.; Fang, L. Y.; Tung, J. S.; Walker, D. E.; Davis, D.; Thorsett, E. D.; Jewett, N. E.; Moon, J. B.; John, V. Design and synthesis of hydroxyethylene-based peptidomimetic inhibitors of human beta-secretase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 158.

<sup>228</sup> Butini, S.; Brogi, S.; Novellino, E.; Campiani, G.; Ghosh, A. K.; Brindisi, M.; Gemma, S. Source. The structural evolution of  $\beta$ -secretase inhibitors: a focus on the development of small-molecule inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1787.

probablemente la diana  $\beta$ -secretasa, destacan: peso molecular menor de 450 Da; número de enlaces de hidrógeno menor de ocho; y superficie de área polar menor de 100 Å.<sup>229</sup>

Las 1,4-naftoquinonas de nuestro estudio son compuestos cuyo peso molecular constituye una ventaja para su paso a través de la barrera hematoencefálica. De hecho, estudios recientes han puesto de manifiesto que quinonas, como plumbagina,<sup>230</sup> timoquinona<sup>231</sup> y coenzima Q10<sup>232</sup> son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica *in vivo*.

La potencial inhibición de la actividad  $\beta$ -secretasa por 1,4-naftoquinonas podría provocar el predominio del procesamiento de APP por la vía  $\alpha$ -secretasa, lo que aumentaría la liberación del péptido soluble sAPP $\alpha$ , con carácter neuroprotector. En este contexto, se ha descrito que la criptotansiniona, diterpeno quinónico aislado de la planta medicinal *Salvia miltiorrhiza* y que mejora el aprendizaje y la memoria en diversos modelos experimentales de EA, modula el metabolismo de APP mediante el aumento de la actividad  $\alpha$ -secretasa.<sup>233</sup> En la clínica se ha comprobado que las concentraciones del péptido soluble sAPP $\alpha$  en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA se encuentran reducidas,<sup>234</sup> lo que sugiere indirectamente que el procesamiento anti-amiloidogénico de APP mediante  $\alpha$ -secretasa se encuentra alterado en esta patología. La activación de  $\alpha$ -secretasa supondría tanto la inhibición de la amiloidogénesis como el efecto neuroprotector derivado de la liberación del péptido soluble sAPP $\alpha$ .<sup>235</sup>

Se ha puesto de manifiesto que los lípidos de la membrana celular pueden modular la actividad de  $\beta$ -secretasa y alterar su función. La escisión de APP depende en gran medida de las propiedades de la membrana. Por tanto, la membrana celular puede ser el lugar donde se inicie la cascada neurotóxica de  $\beta$ A. Y así, se ha comprobado que el oligómero  $\beta$ A (1-40) estimula el

<sup>229</sup> Chiriano, G.; Sartini, A.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Bolognesi, M. L.; Roberti, M.; Recanatini, M.; Carloni, P.; Cavalli, A. Sequential virtual screening approach to the identification of small organic molecules as potential BACE-1 inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *77*, 268.

<sup>230</sup> Son, T. G.; Camandola, S.; Arumugam, T.V.; Cutler, R.G.; Telljohann, R.S.; Mughal, M.R.; Moore, T.A.; Luo, W.; Yu, Q.S.; Johnson, D.A.; Johnson, J.A.; Greig, N.H.; Mattson, M.P. Plumbagin, a novel Nrf2/ARE activator, protects against cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **2010**, *112*, 1316.

<sup>231</sup> Al-Majed, A. A.; Al-Omar, F. A.; Nagi, M. N. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *543*, 40.

<sup>232</sup> Yang, X.; Dai, G.; Li, G.; Yang, E. S. Coenzyme Q10 reduces beta-amyloid plaque in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* **2010**, *41*, 110.

<sup>233</sup> Mei, Z.; Situ, B.; Tan, X.; Zheng, S.; Zhang, F.; Yan, P.; Liu, P. Cryptotanshinione upregulates alpha-secretase by activation PI3K pathway in cortical neurons. *Brain Res.* **2010**, *1348*, 165.

<sup>234</sup> Sennvik, K.; Fastbom, J.; Blomberg, M.; Wahlund, L. O.; Winblad, B.; Benedikz, E. Levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* **2000**, *278*, 169.

<sup>235</sup> Han, X. Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, *2*, 65.

procesamiento amiloidogénico de APP mediante la reducción de la fluidez de la membrana.<sup>236</sup> Esta acción dinámica de  $\beta$ A puede iniciar un círculo vicioso, en el que el péptido endógeno estimule su propia producción. Por tanto, la inhibición de  $\beta$ -secretasa por 1,4-naftoquinonas podría prevenir o retrasar la pérdida de fluidez de la membrana celular, y facilitar por tanto sus funciones de transporte y de comunicación celular.

A partir de la quinona menaquinona se han sintetizado derivados con la intención de desarrollar compuestos multidiana. Se ha puesto de manifiesto que poseen buena biodisponibilidad y capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y, aunque más bajas que el compuesto de partida, mantienen las actividades inhibitorias de AChE y  $\beta$ -secretasa, y mejoran la inhibición de la agregación de  $\beta$ A.<sup>237</sup> Cabe señalar, por tanto, que el perfil multidiana de quinonas las convierte en compuestos *leader* en el desarrollo de nuevas moléculas potencialmente activas en la EA.

Hay que señalar que con nuestro estudio hemos puesto de manifiesto nuevos mecanismos de neuroprotección a los ya descritos para algunas naftoquinonas, como es el caso de la plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona). Este compuesto proporciona protección frente al daño oxidativo y frente al daño producido como consecuencia de los metabolitos generados en el metabolismo celular, mediante la activación de la vía Nrf2/ARE<sup>238</sup> que actúa regulando genes diana responsables del aumento de la resistencia neuronal a las agresiones. Por tanto, a su capacidad de activación de las vías de respuesta adaptativas al estrés celular, habría que añadir su actividad anti-amiloidogénica en el procesamiento de APP mediante la inhibición de  $\beta$ -secretasa, constatada en el presente trabajo.

La acción neuroprotectora de moléculas con estructura de naftoquinona también se ha puesto de manifiesto, por ejemplo, con la vitamina K1 y la menaquinona MK-4, demostrando una gran potencia inhibitoria de la generación de radicales libres y previniendo la muerte celular oxidativa inducida por la reducción de la depleción de glutatión en oligodendrocitos y neuronas corticales primarias.<sup>239</sup> Y así, los derivados de la vitamina K2 son capaces de prevenir la disfunción mitocondrial inducida por la generación de anión superóxido al actuar como portadores alternativos

<sup>236</sup> Peters, I.; Igbavboa, U.; Schütt, T.; Haidari, S.; Hartig, U.; Rosello, X.; Böttner, S.; Copanaki, E.; Deller, T.; Kögel, D.; Wood, W. G.; Müller, W. E.; Eckert, G. P. The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 964.

<sup>237</sup> Viayna, E.; Sabate, R.; Muñoz-Torrero, D. Dual inhibitors of  $\beta$ -amyloid aggregation and acetylcholinesterase as multi-target anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1820.

<sup>238</sup> Son, T. G.; Camandola, S.; Arumugam, T. V.; Cutler, R. G.; Telljohann, R. S.; Mughal, M. R.; Moore, T. A.; Luo, W.; Yu, Q. S.; Johnson, D. A.; Johnson, J. A.; Greig, N. H.; Mattson, M. P. Plumbagin, a novel Nrf2/ARE activator, protects against cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **2010**, *112*, 1316.

<sup>239</sup> Li, J.; Lin, J. C.; Wang, H.; Peterson, J. W.; Furie, B. C.; Furie, B.; Booth, S. L.; Volpe, J. J.; Rosenberg, P. A. Novel role of vitamin K in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 5816.

de electrones. El núcleo naftoquinona parece ser un requisito imprescindible para la actividad neuroprotectora<sup>240</sup> y la sustitución en el C2 de la amina mejora en gran medida dicha actividad. La posterior adición de un grupo bencilo en C2 de la amina mejora el perfil de neurotoxicidad *in vitro* del compuesto, y la sustitución de cloro en la posición *meta* del anillo aromático mejora aún más la potencia neuroprotectora del compuesto resultante.

Algunos análogos de la vitamina K3 inhiben eficazmente la agregación del péptido  $\beta$ A y protegen a las células frente a la toxicidad inducida por el mismo. Estos análogos de vitamina K podrían desarrollarse como eficaces fármacos antiamiloidogénicos para el tratamiento de la EA.<sup>241</sup>

Respecto a una quinona endógena, la coenzima Q<sub>10</sub> o ubiquinona, que es producida prácticamente por todos los organismos con metabolismo respiratorio y que se encuentra distribuida en todas las membranas celulares, se ha demostrado últimamente que inhibe de forma dosis dependiente la formación y extensión de las fibrillas de  $\beta$ A generadas *in vitro*. Además se ha comprobado que contribuye a la desestabilización de dichas fibrillas  $\beta$ A preformadas.<sup>242</sup>

Diferentes compuestos con estructura de naftoquinona han demostrado que inhiben la formación de  $\beta$ A o desagregan las fibrillas de  $\beta$ A pre-formadas. Así por ejemplo, la yuglona, 1,2-naftoquinona y 5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona protegen las células ejerciendo un efecto inhibitor en la formación de fibrillas de  $\beta$ A *in vitro*.<sup>243</sup> La 1,2-naftoquinona y la yuglona, además pueden inhibir la formación de oligómeros de  $\beta$ A *in vitro*.<sup>244</sup>

Fármacos con estructura de nafto-hidroquinona, como rifampicina, tetraciclina, doxiciclina y diversos derivados, han demostrado que inhiben la agregación y la neurotoxicidad provocada por el péptido  $\beta$ A (1-40) en la línea celular de feocromocitoma de rata PC12. Las tetraciclinas y la doxiciclina, no sólo inhiben la formación de fibrillas de  $\beta$ A (1-42) sino que también desagregan las fibrillas preformadas en un modelo de fibrillogénesis *in vitro*.<sup>245,246</sup>

---

<sup>240</sup> Josey, B. J.; Inks, E. S.; Wen, X.; Chou, C. J. Structure-activity relationship study of vitamin k derivatives yields highly potent neuroprotective agents. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1007.

<sup>241</sup> Huy, P. D.; Yu, Y. C.; Ngo, S. T.; Thao, T. V.; Chen, C. P.; Li, M. S.; Chen, Y. C. In silico and in vitro characterization of anti-amyloidogenic activity of vitamin K3 analogues for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1830*, 2960.

<sup>242</sup> Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. Preformed beta-amyloid fibrils are destabilized by coenzyme Q10 in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 111.

<sup>243</sup> Kim, H.; Park, B. S.; Lee, K. G.; Choi, C. Y.; Jang, S. S.; Kim, Y. H.; Lee, S. E. Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8537.

<sup>244</sup> Necula, M.; Kaye, R.; Milton, S.; Glabe, C. G. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10311.

<sup>245</sup> Kim, H.; Park, B. S.; Lee, K. G.; Choi, C. Y.; Jang, S. S.; Kim, Y. H.; Lee, S. E. Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8537.

Otros derivados con estructura 1,4-naftoquinona y que merecen ser considerados en esta discusión son los 1,4-naftoquinon-2-L-triptófano-il (NQTrp). Se ha descrito su capacidad para reducir la agregación y oligomerización de  $\beta$ A *in vitro* e *in vivo*. Ciertos grupos funcionales de NQTrp parecen estar involucrados en la unión al péptido  $\beta$ A,<sup>247</sup> como los enlaces de hidrógeno de la anilina (es decir, el enlazador NH entre la quinona y los restos de triptófano), los carbonilos quinónicos y el ácido carboxílico. Concretamente, se ha observado que el derivado N-(3-cloro-1,4-dihidro-1,4-dioxo-2-naftalenil)-L-triptófano (Cl-NQTrp) reduce el nivel de especies dodecaméricas de  $\beta$ A de 56 kDa en el cerebro y revierte los defectos cognitivos de ratones con Alzheimer agresivo (ratones que expresan un total de cinco mutaciones familiares de EA, "5XFAD," obtenido por Robert Vassar, Northwestern University, Chicago).<sup>248</sup>

---

<sup>246</sup> Forloni, G.; Colombo, L.; Girola, L.; Tagliavini, F.; Salmona, M. Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett.* **2001**, *487*, 404.

<sup>247</sup> Scherzer-Attali, R.; Convertino, M.; Pellarin, R.; Gazit, E.; Segal, D.; Caffisch, A. Methylations of tryptophan-modified naphthoquinone affect its inhibitory potential toward A $\beta$  aggregation. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 1780.

<sup>248</sup> Scherzer-Attali, R.; Farfara, D.; Cooper, I.; Levin, A.; Ben-Romano, T.; Trudler, D.; Vientrov, M.; Shaltiel-Karyo, R.; Shalev, D. E.; Segev-Amzaleg, N.; Gazit, E.; Segal, D.; Frenkel, D. Naphthoquinone-tyrptophan reduces neurotoxic A $\beta$ \*56 levels and improves cognition in Alzheimer's disease animal model. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *46*, 663.

## 7. Resultados y Discusión. Piridazinonas y piridazinas



## 7.1. Síntesis Química

La preparación de las series de compuestos **1** y **2** se llevó a cabo siguiendo la metodología original puesta a punto por el grupo de investigación,<sup>249</sup> de la manera que se recoge en la figura 26. La adición conjugada de ácidos borónicos ( $R^1B(OH)_2$ ) al (*E*)-4-oxopent-2-enedioato de diisopropilo, empleando un catalizador dicatiónico de Pd(II) generado a partir de  $Pd(OCOCF_3)_2$ , 1,2-difenilfosfanilbenceno (dppben) y  $HBF_4$ , condujo a los 4-aril-2-oxopentanodioatos (**serie 1**). La reacción de estos últimos con hidracinas dio lugar a las dihidropiridazinonas intermedias (**serie 2**). La aromatización ( $Br_2 / AcOH$ ) del compuesto **2a** condujo la piridazinona **3a**, mientras que el resto de piridazinonas (**serie 3**) se obtuvieron en una única etapa de reacción sin aislamiento de las dihidropiridazinonas intermedias. El tratamiento de los compuestos **3a** y **3c** con oxiclورو de fósforo dio lugar a los 6-cloro-5-aril-3-piridazincarboxilatos **4a** y **4b**, mientras que el compuesto **4c** se obtuvo a partir del éster dimetílico del ácido 2-oxopentanodioico mediante ciclación con hidracina seguida de tratamiento con oxiclورو de fósforo, siguiendo procedimientos previamente descritos en la bibliografía.<sup>250</sup> Los compuestos **4a** y **4b** se transformaron en los 5,6-diaril-3-piridazincarboxilatos **5a-c** y **5d,e** respectivamente mediante reacción de Suzuki con ácidos arilborónicos ( $R^2B(OH)_2$ ) empleando catálisis de Pd(0).

---

<sup>249</sup> (a) Roscales, S.; Ortega, A.; Martín-Aragón, S.; Bermejo-Bescós, P.; Csáky, A. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 5398. (b) Roscales, S. Tesis Doctoral. Nuevos aspectos de las reacciones de los ácidos borónicos: de la catálisis metálica a la catálisis orgánica. Enero 2015, UCM.

<sup>250</sup> Watterson, S. H.; Xiao, Z.; Dodd, D. S.; Tortolani, D. R.; Vaccaro, W.; Potin, D.; Launay, M.; Stetsko, D. K.; Skala, S.; Davis, P. M.; Lee, D.; Yang, X.; McIntyre, K. W.; Balimane, P.; Patel, K.; Yang, Z.; Marathe, P.; Kadiyala, P.; Tebben, A. J.; Sheriff, S.; Chang, C. Y. Y.; Ziemba, T.; Zhang, H.; Chen, B. -C.; DelMonte, A. J.; Aranibar, N.; McKinnon, M.; Barrish, J. C.; Suchard, S. J.; G. Dhar, T. G. M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3814.

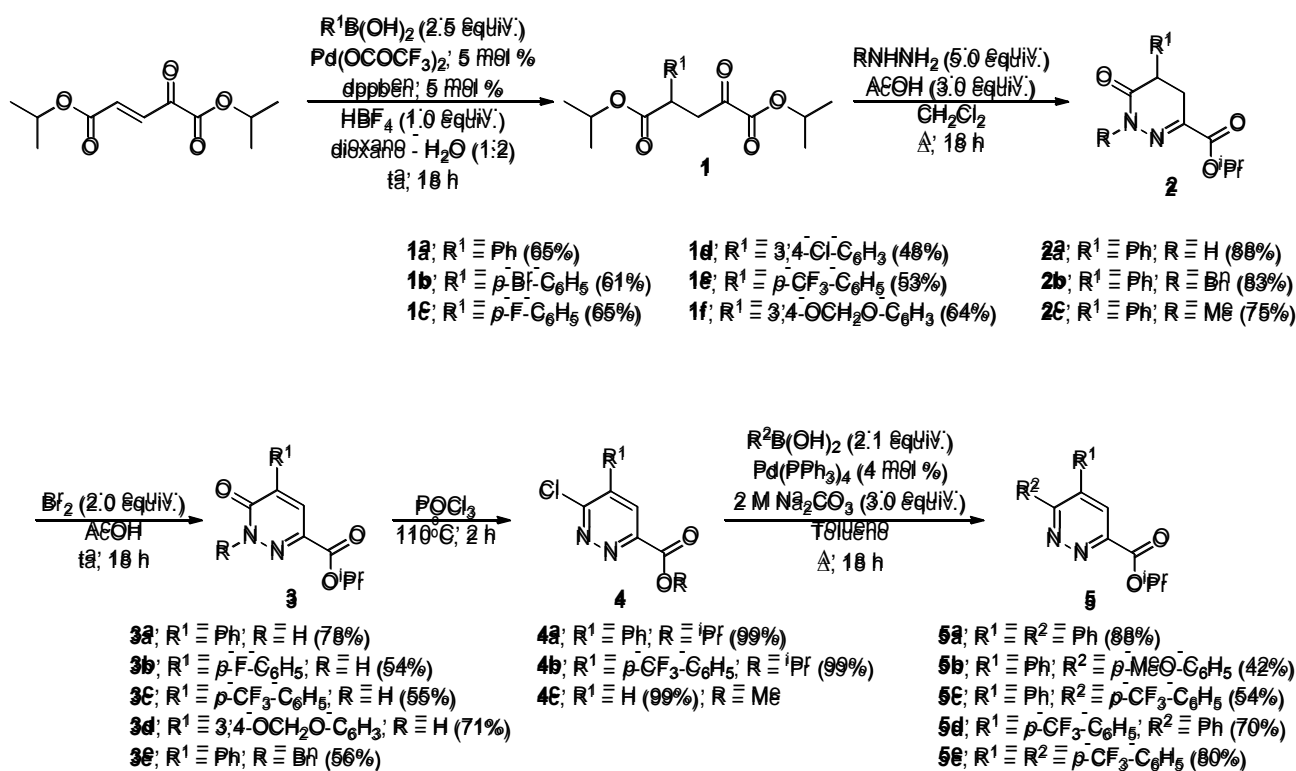


Fig. 26. Síntesis química de piridazinonas y piridazinas

## 7.2. Viabilidad celular

La primera evaluación de los compuestos que se llevó a cabo fue el estudio de los mismos en la viabilidad celular de la línea transgénica de neuroblastoma APPswe, con el fin de garantizar la ausencia de toxicidad de las moléculas finalmente seleccionados.

En la Figura 27 se representa la viabilidad celular en la línea APPswe (% del control) tras el tratamiento con los 3-ariloxoglutaratos (serie 1) a la concentración final de 10  $\mu$ M y durante 24 horas.

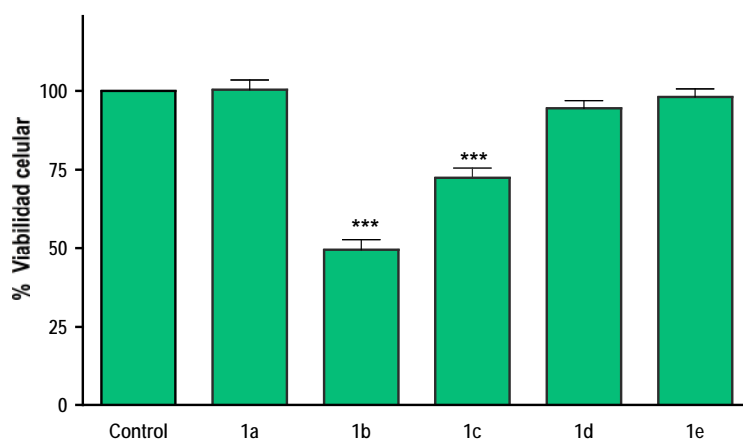


Fig. 27. Efecto de 3-ariloxoglutaratos (1) en la viabilidad celular (línea APPswe)  
(\*\*\*  $p < 0,001$  vs control, test de Newman-Keuls)

Se observó que únicamente los compuestos **1b** ( $R^1 = p\text{-Br-C}_6\text{H}_4$ ,  $R = \text{H}$ ) y **1c** ( $R^1 = p\text{-F-C}_6\text{H}_4$ ,  $R = \text{H}$ ) disminuyeron la viabilidad celular en un 51 y 38%, respectivamente, por lo que fueron descartados para los siguientes ensayos farmacológicos (\*\* $p < 0,001$ , test de Newman-Keuls).

En la Figura 28 se representa la viabilidad celular en la línea APPswe (% del control) tras el tratamiento con las diferentes dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** a la concentración final de 10  $\mu$ M y durante un periodo de 24 horas.

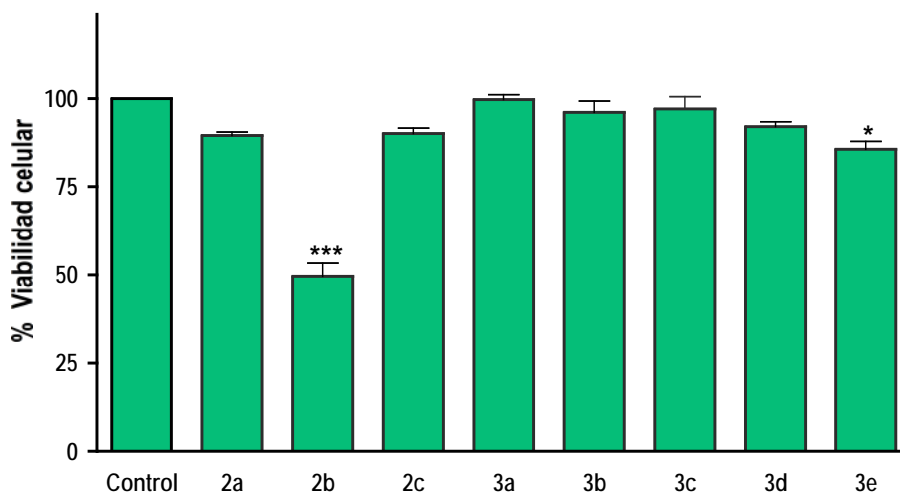


Fig. 28. Efecto de dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** en la viabilidad celular (línea APPswe)  
(\* $p < 0,05$  vs control; \*\*\* $p < 0,001$  vs control, test de Newman-Keuls)

La mayoría los compuestos **2** y **3** no ejercieron una variación significativa de la viabilidad celular con respecto a las células control que no recibieron tratamiento. Sólo los compuestos **2b** y **3e**, ambos con igual patrón de sustitución ( $R^1 = \text{Ph}$ ,  $R = \text{Bn}$ ), disminuyeron la viabilidad celular en un 51 y 15%, respectivamente. Dada también la presencia de  $R^1 = \text{Ph}$  en los compuestos **2a**, **2c** y **3a**, que no produjeron variación de la viabilidad celular, se puede concluir que la presencia de un grupo bencilo como sustituyente del átomo de nitrógeno N1 del anillo ( $R = \text{Bn}$ ) es responsable de la disminución de la viabilidad celular. Por consiguiente, los compuestos **2b** y **3e** fueron descartados para los siguientes ensayos farmacológicos (\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ ; test de Newman-Keuls).

En la Figura 29 se representa la viabilidad celular en la línea APPswe (% del control) tras el tratamiento con las distintas piridazinas 4 y 5 a la concentración final de 10  $\mu$ M y durante 24 horas.

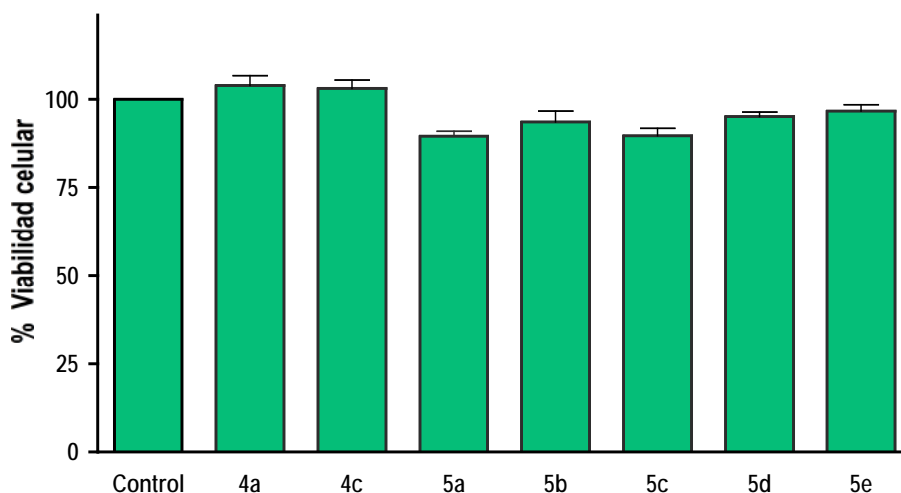


Fig. 29. Efecto de piridazinas 4 y 5 en la viabilidad celular (línea APPswe)

Ninguno de estos compuestos ejerció una variación significativa de la viabilidad celular con respecto a las células control que no recibieron tratamiento.

### 7.3. Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE)

La AChE es la primera diana farmacológica cuya inhibición ha demostrado eficacia terapéutica mejorando la transmisión colinérgica y la función cognitiva en los enfermos de Alzheimer.<sup>251</sup> La determinación de la capacidad anticolinesterásica *in vitro* de los compuestos en estudio es la primera de las actividades farmacológicas que se han ensayado.

En la Figura 30 se representa la inhibición *in vitro* del enzima AChE que ejercen los 3-ariloxoglutaratos 1a, 1d y 1e en la línea celular APPswe.

<sup>251</sup> Villarroya, M.; García, A. G.; Marco, J. L. New classes of AChE inhibitors with additional pharmacological effects of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 2004, 10, 3177.

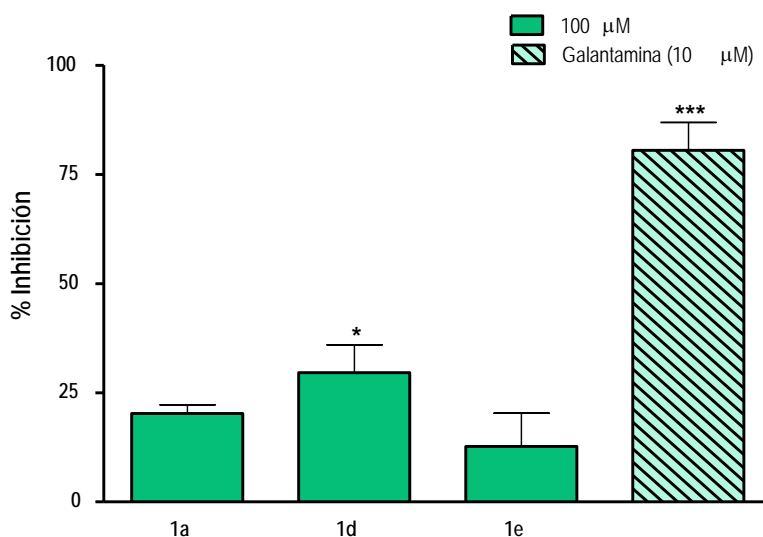


Fig. 30. Efecto de 3-ariloxoglutaratos **1** en la inhibición *in vitro* de AChE  
 (\* $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs control; test de Newman-Keuls)

Si bien el efecto inhibitorio del compuesto **1d** fue significativo ( $p < 0,05$ ) respecto de la reacción control de AChE, el porcentaje de inhibición no superó el 30% a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Por el contrario, los compuestos **1a** y **1e** no ejercieron efectos significativos en la inhibición de AChE.

En la Figura 31 se representa la inhibición *in vitro* del enzima AChE que ejercieron las dihidropiridazinonas **2a** y **2c**, así como las piridazinonas **3a-d** a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

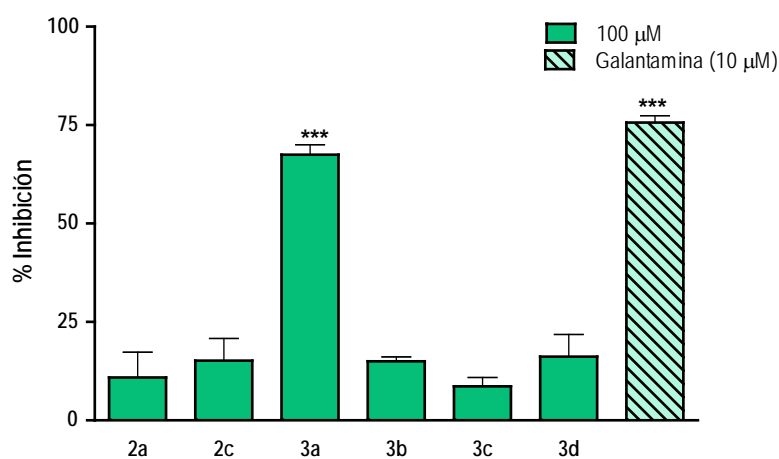


Fig. 31. Efecto de dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** en la inhibición *in vitro* de AChE  
 (\*\*\*)  $p < 0,001$  versus reacción control de AChE, test de Newman-Keuls)

Únicamente el compuesto **3a** mostró una actividad inhibitoria significativa del enzima AChE, con un valor de  $Cl_{50}$  de  $7,68 \pm 0,135 \mu\text{M}$ , ligeramente inferior a la mostrada por el compuesto control (galantamina,  $Cl_{50} = 1,12 \pm 0,082 \mu\text{M}$ ). A este respecto, cabe destacar la importancia de la planaridad y conjugación del sistema, ya que la dihidropiridazinona **2a** no mostró actividad significativa. Sin embargo, la presencia en el sistema de sustituyentes electroceptores (**3b**, **3c**) o electrodonadores (**3d**), así como la alquilación del átomo de nitrógeno endocíclico (**3e**) no permitieron mejorar la actividad mostrada por **3a**.

En la Figura 32 se representa la inhibición *in vitro* del enzima AChE que ejercieron las piridazinas **4** y **5** a la concentración de  $100 \mu\text{M}$ .

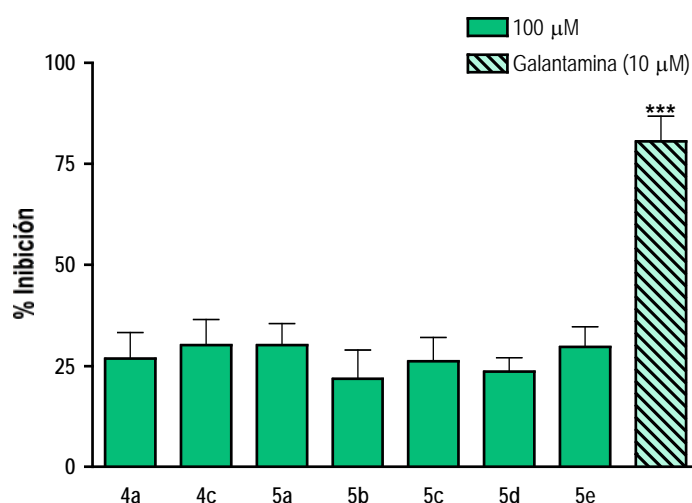


Fig. 32. Efecto de piridazinas **4** y **5** en la inhibición *in vitro* de AChE (\*\*\*)  $p < 0,001$  versus reacción control de AChE, test de Newman-Keuls)

Si bien el efecto inhibitorio de la mayoría de estos compuestos, respecto de la reacción control de AChE, fue significativo (**4a**, **4c** y **5a** y **5b**,  $p < 0,01$ ; **5c**, **5d** y **5e**,  $p < 0,001$ ), ninguno de ellos presentó una inhibición de la reacción enzimática superior al 30%, a la concentración de  $100 \mu\text{M}$ .

A la vista de los resultados, pueden descartarse los compuestos **1**, **2-3**, **4-5** como inhibidores de la diana AChE ya que no presentan una actividad relevante, aunque se han descrito diversas piridazinas y piridazinonas con actividad anticolinesterásica, como la 3-[2-(1-bencilpiperidin-4-il)etilamino]-6-fenilpiridazina, con actividad comparable a la tacrina y cuya selectividad por AChE frente a BuChE es aproximadamente 10 veces más favorable, en comparación a donepezilo.<sup>252</sup>

<sup>252</sup> Contreras J. M.; Rival, Y. M.; Chayer, S.; Bourguignon, J. J.; Wermuth, C. G. Aminopyridazines as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 730.

7.4. Actividad inhibitoria de  $\beta$ -secretasa

En la Figura 33 se representa la inhibición *in vitro* del enzima  $\beta$ -secretasa que ejercen los 3-ariloxoglutaratos **1a**, **1d** y **1e**. Estos compuestos mostraron una inhibición significativa de la actividad enzimática respecto de la reacción control en el rango de concentración 10-100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ , test de Newman-Keuls).

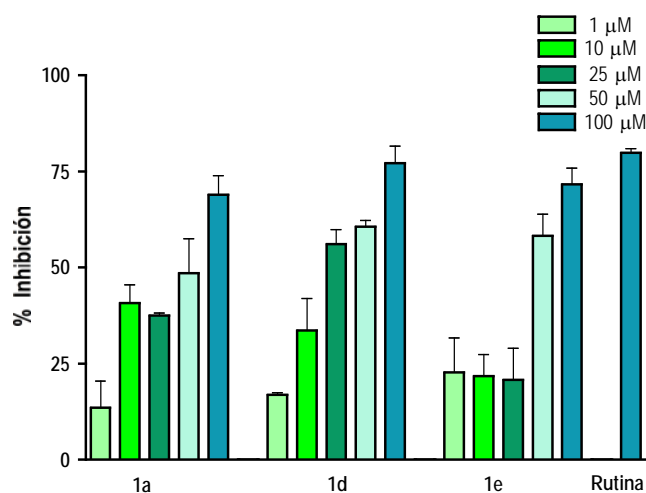


Fig. 33. Efecto de 3-ariloxoglutaratos **1** en la inhibición *in vitro* del enzima  $\beta$ -secretasa

Los valores de  $\text{CI}_{50}$  de estos compuestos en la inhibición *in vitro* de  $\beta$ -secretasa se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.  $\text{CI}_{50}$  de 3-ariloxoglutaratos **1** en la inhibición del enzima  $\beta$ -secretasa

3-ariloxoglutaratos	Inhibición de $\beta$ -secretasa ( $\text{CI}_{50}$ , $\mu\text{M}$ )
<b>1a</b>	$20,93 \pm 2,305$
<b>1d</b>	$14,06 \pm 2,542$
<b>1e</b>	$27,55 \pm 4,933$

De los resultados obtenidos, destaca la actividad del compuesto **1d** ( $\text{R}^1 = 3,4\text{-diCl-C}_6\text{H}_3$ ), con un valor de  $\text{CI}_{50}$  del orden de 14  $\mu\text{M}$ .

En la Figura 34 se representa la inhibición *in vitro* del enzima  $\beta$ -secretasa que ejercen las dihidropiridazinonas **2a** y **2c**, así como las piridazinonas **3a-d** a diferentes concentraciones.

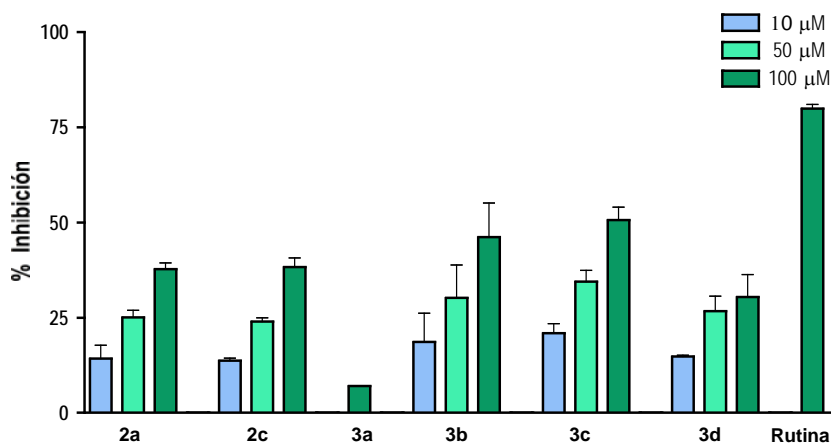


Fig. 34. Efecto de dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** en la actividad inhibitoria de  $\beta$ -secretasa

A excepción del compuesto **3a**, todos ellos ejercieron efectos significativos en la actividad enzimática a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) respecto de la reacción control. El compuesto **3c** ( $R^1 = p\text{-CF}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R = \text{H}$ ) es el que mostró mayor actividad, superando el 50% de inhibición.

Los valores de  $\text{CI}_{50}$  de los diferentes compuestos **2** y **3** en la inhibición *in vitro* de  $\beta$ -secretasa se muestran en la Tabla 7, destacando la actividad de la piridazinona **3b** ( $R^1 = p\text{-F-C}_6\text{H}_4$ ,  $R = \text{H}$ ), con un valor de  $\text{CI}_{50}$  del orden de 20  $\mu\text{M}$ .

Tabla 7.  $\text{CI}_{50}$  de dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** en la inhibición *in vitro* de  $\beta$ -secretasa

Compuestos	Inhibición de $\beta$ -secretasa ( $\text{CI}_{50}$ , $\mu\text{M}$ )
<b>2a</b>	$25,83 \pm 1,952$
<b>2c</b>	$38,89 \pm 1,704$
<b>3a</b>	-
<b>3b</b>	$20,49 \pm 0,816$
<b>3c</b>	$22,81 \pm 2,638$
<b>3d</b>	$27,62 \pm 0,831$

En la Figura 35 se representa la inhibición *in vitro* del enzima  $\beta$ -secretasa que ejercen las distintas piridazinas **4** y **5** a diferentes concentraciones.

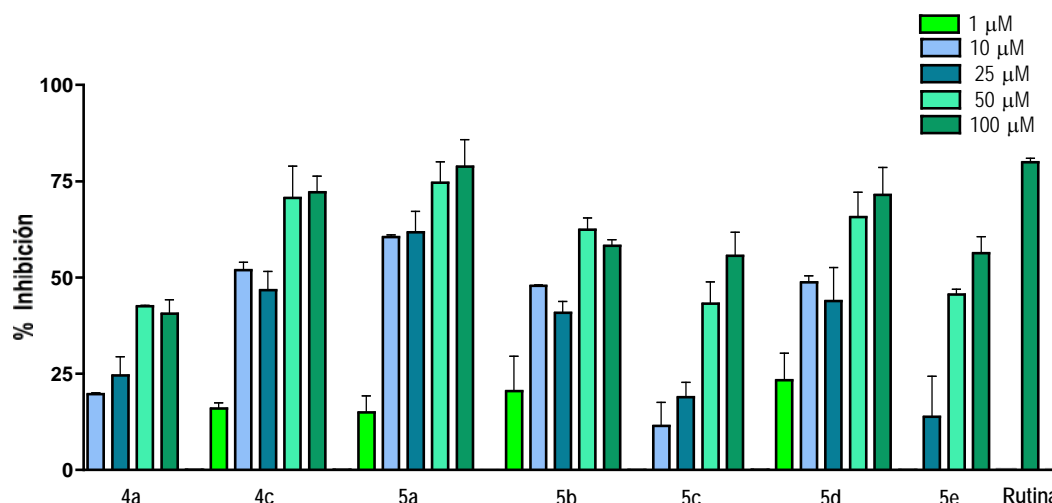


Fig. 35. Efecto de piridazinas 4 y 5 en la actividad inhibitoria *in vitro* de  $\beta$ -secretasa

Los compuestos **4c**, **5a**, **5b** y **5d** mostraron una inhibición significativa de la actividad enzimática respecto de la reacción control en el rango de concentración 1-100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ , test de Newman-Keuls). Los valores de  $\text{CI}_{50}$  de estos compuestos en la inhibición *in vitro* de  $\beta$ -secretasa se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8.  $\text{CI}_{50}$  de las piridazinas 4 y 5 en la inhibición *in vitro* de  $\beta$ -secretasa

Piridazinas	Inhibición de $\beta$ -secretasa ( $\text{CI}_{50}$ , $\mu\text{M}$ )
4a	-
4c	$4,04 \pm 1,380$
5a	$17,65 \pm 9,723$
5b	$13,01 \pm 3,726$
5c	$35,77 \pm 4,512$
5d	$19,07 \pm 0,504$
5e	$30,88 \pm 7,058$

La inhibición de  $\beta$ -secretasa puede representar un potencial terapéutico en el tratamiento y prevención de la EA.<sup>253</sup> Hasta la fecha, no se han descrito aún piridazinonas ni piridazinas con

<sup>253</sup> Mandal, M.; Zhu, Z.; Cumming, J. N.; Liu, X.; Strickland, C.; Mazzola, R. D.; Caldwell, J. P.; Leach, P.; Grzelak, M.; Hyde, L.; Zhang, Q.; Terracina, G.; Zhang, L.; Chen, X.; Kuvelkar, R.; Kennedy, M. E.; Favreau, L.; Cox, K.; Orth, P.; Buevich, A.; Voigt, J.; Wang, H.; Kazakevich, I.; McKittrick, B. A.; Greenlee, W.; Parker, E. M.; Stamford, A. W. Design and validation of

actividad inhibidora de  $\beta$ -secretasa. A la vista de nuestros resultados y buscando mejorar la actividad demostrada con los compuestos en estudio, podríamos llegar al diseño de una molécula de bajo peso molecular (< 300 Da), a partir del núcleo de oxoglutarato, piridazinona o piridazina, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y con determinadas restricciones conformacionales que facilitaran el acceso al sitio activo de  $\beta$ -secretasa.

### 7.5. Actividad inhibitoria de $\gamma$ -secretasa

El complejo enzimático  $\gamma$ -secretasa cataliza la proteólisis definitiva de APP (*Amyloid precursor protein*) para dar lugar a péptidos  $\beta$ A de diferente peso molecular. Por tanto, la inhibición de la actividad  $\gamma$ -secretasa *in vivo* constituye otro de los enfoques eficaces para la reducción de los niveles del péptido A $\beta$ <sup>254</sup> que justifica la determinación *in vitro* de la capacidad inhibitoria enzimática de nuestros compuestos.

En la Figura 36 se representa la inhibición *in vitro* del enzima  $\gamma$ -secretasa que ejercen los 3-ariloxoglutaratos **1a**, **1d** y **1e**. Estos compuestos mostraron una inhibición de la actividad enzimática superior al 75% a la concentración de 100  $\mu$ M. De entre ellos, el compuesto **1d** fue el que mostró mayor capacidad inhibitoria, con una  $CI_{50}$  de 22  $\mu$ M (Tabla 10). Como control positivo se utilizó el compuesto L- 685,458,<sup>255</sup> potente inhibidor de la actividad  $\gamma$ -secretasa.

---

bicyclic iminopyrimidinones as beta amyloid cleaving enzyme-1 (BACE1) inhibitors: conformational constraint to favor a bioactive conformation. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9331.

<sup>254</sup> Jurisch-Yaksi, N.; Sannerud, R.; Annaert, W. A fast growing spectrum of biological functions of  $\gamma$ -secretase in development and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 2815.

<sup>255</sup> Shearman, M. S.; Beher, D.; Clarke, E. E.; Lewis, H. D.; Harrison, T.; Hunt, P.; Nadin, A.; Smith, A. L.; Stevenson, G.; Castro, J. L. L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8698.

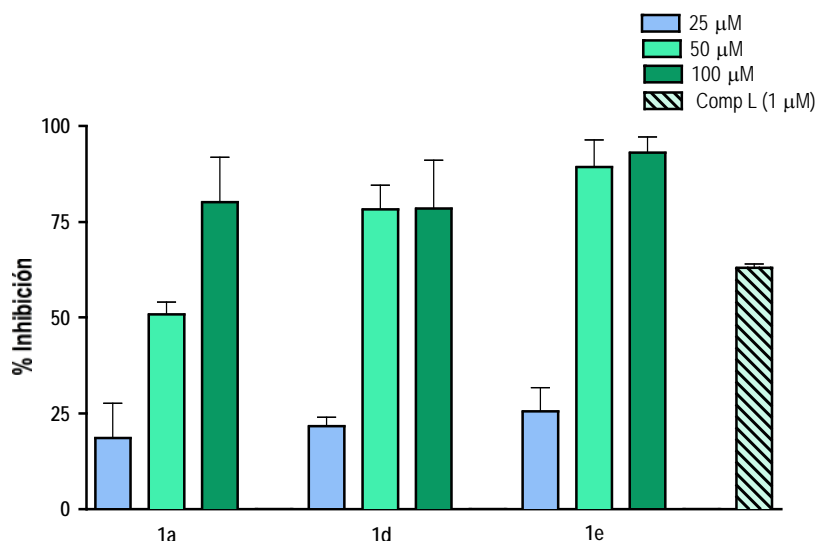


Fig. 36. Efecto de 3-ariloxoglutaratos **1** en la inhibición *in vitro* de  $\gamma$ -secretasa

En la Tabla 9 se muestran los valores de  $CI_{50}$  de 3-ariloxoglutaratos **1** en la inhibición del enzima  $\gamma$ -secretasa.

Tabla 9.  $CI_{50}$  de piridazinas en la inhibición del enzima  $\gamma$ -secretasa

3-ariloxoglutaratos	Inhibición de $\gamma$ -secretasa ( $CI_{50}$ , $\mu$ M)
<b>1a</b>	42,28 $\pm$ 8,214
<b>1d</b>	21,79 $\pm$ 0,381
<b>1e</b>	30,42 $\pm$ 6,549

En la Figura 37 se representa la inhibición *in vitro* del enzima  $\gamma$ -secretasa que ejercen las distintas dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3**.

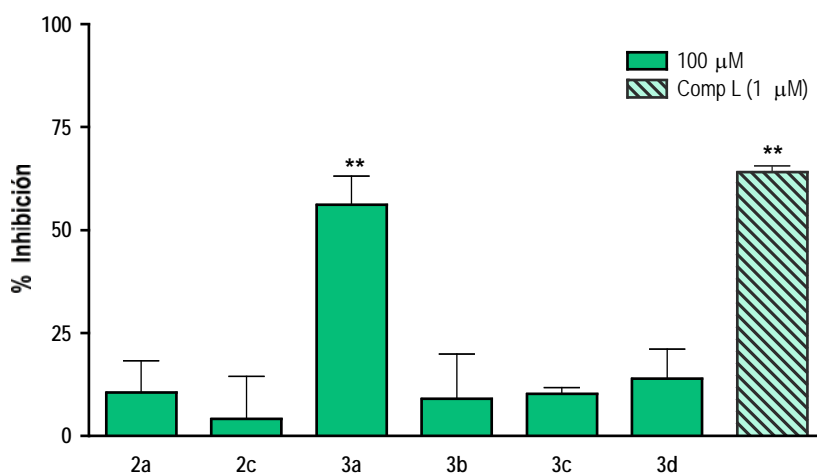


Fig. 37. Efecto de dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** en la inhibición de  $\gamma$ -secretasa

(\*\*  $p < 0,01$  vs reacción control de  $\gamma$ -secretasa, test de Newman-Keuls)

A excepción del compuesto **3a** que superó el 50% de inhibición de la actividad  $\gamma$ -secretasa a 100  $\mu$ M, ninguno de los compuestos mostró una inhibición significativa del enzima. La piridazinona **3a** se ensayó a concentraciones inferiores, mostrando una inhibición del 39% a 50  $\mu$ M y prácticamente nula a 25  $\mu$ M.

En la Figura 38 se representa la inhibición *in vitro* del enzima  $\gamma$ -secretasa que ejercen las distintas piridazinas **4** y **5**.

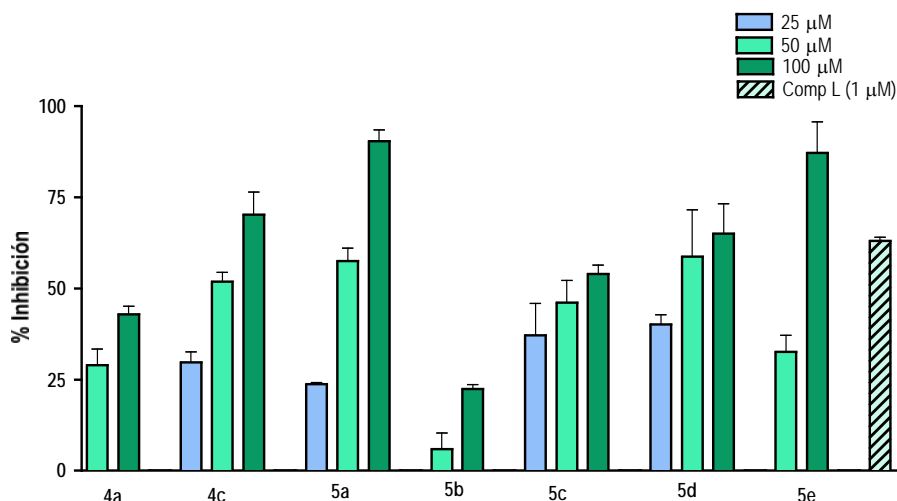


Fig. 38. Efecto de las piridazinas **4** y **5** en la inhibición de  $\gamma$ -secretasa.

Los compuestos **4c**, **5a** y **5e** mostraron una inhibición de la actividad enzimática superior al 75% a la concentración de 100  $\mu$ M, siendo el más activo el **4c** con un valor de  $CI_{50}$  26,76  $\mu$ M (Tabla 10).

Tabla 10.  $CI_{50}$  de las piridazinas **4** y **5** en la inhibición del enzima  $\gamma$ -secretasa

Piridazinas	Inhibición de $\gamma$ -secretasa ( $CI_{50}$ , $\mu$ M)
4a	-
4c	26,76 $\pm$ 7,019
5a	44,33 $\pm$ 0,357
5b	-
5c	-
5d	-
5e	59,82 $\pm$ 2,772

El enorme progreso realizado desde el descubrimiento de  $\gamma$ -secretasa, hace más de quince años, ha aumentado el interés de la industria farmacéutica por explotar al máximo el complejo enzimático  $\gamma$ -secretasa como una diana terapéutica relevante de la EA. La proteólisis heterogénea de APP mediada por  $\gamma$ -secretasa da lugar a la producción de péptidos  $\beta$ A de diferentes longitudes, que varían desde 37 hasta 43 aminoácidos. Mientras los inhibidores disminuyen la producción de todas las especies de péptidos  $\beta$ A, los moduladores modifican el punto de corte en la APP para dar lugar a la producción de péptidos de menor longitud y no amiloidogénicos. Además, los moduladores inhiben selectivamente la actividad  $\gamma$ -secretasa, manteniendo intacto el procesamiento fisiológico de *Notch* así como su función de señalización en la regulación de la diferenciación celular. Por tanto, la búsqueda de moléculas potencialmente eficaces debe estar dirigida hacia la inhibición parcial o la modulación de la actividad enzimática.

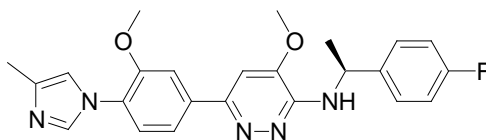
En el presente estudio, la magnitud de la inhibición de la actividad  $\gamma$ -secretasa alcanzada con los tres grupos de moléculas (1, 2-3, 4-5) ha sido moderada, con respecto al compuesto estándar utilizado, el cual posee una reconocida y elevada potencia inhibitoria. En esta línea, se ha descrito la actividad moduladora de  $\gamma$ -secretasa para diferentes piridazinonas fusionadas con anillos heterocíclicos de cinco eslabones, como 5*H*-furo[2,3-*d*]piridazin-4-onas, dihidropirrol[2,3-*d*]piridazin-4-onas, 5*H*-tiazolo[4,5-*d*]piridazin-4-onas y 1,5-dihidroimidazo[4,5-*d*]piridazin-4-onas.<sup>256</sup> En cuanto a estructuras de piridazina, se ha demostrado que, por ejemplo, la *N*-[(1*S*)-1-(4-fluorofenil)-etil-6-[3-metoxi-4-(4-metil-1*H*-imidazol-1-il)-fenil]-4-metoxipiridazin-3-amina, presenta una potente actividad moduladora *in vitro* de  $\gamma$ -secretasa, con una selectividad por APP cien veces superior con respecto al procesamiento de *Notch*, lo que supone una disminución de  $\beta$ A (1-42) y  $\beta$ A (1-40), carente de toxicidad y, además, con una excelente farmacocinética.<sup>257,258</sup> Por tanto, nuestros compuestos en estudio presentan estructuras prometedoras cuya optimización química podría probablemente conducir a nuevos moduladores de baja toxicidad y capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.

---

<sup>256</sup> Oehlich, D.; Berthelot, D. J.; Gijssen, H. J.  $\gamma$ -Secretase modulators as potential disease modifying anti-Alzheimer's drugs. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 669.

<sup>257</sup> Wan, Z.; Hall, A.; Jin, Y.; Xiang, J. N.; Yang, E.; Eatherton, A.; Smith, B.; Yang, G.; Yu, H.; Wang, J.; Ye, L.; Lau, L. F.; Yang, T.; Mitchell, W.; Cai, W.; Zhang, X.; Sang, Y.; Wang, Y.; Tong, Z.; Cheng, Z.; Hussain, I.; Elliott, J. D.; Matsuoka, Y. Pyridazine-derived  $\gamma$ -secretase modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4016.

<sup>258</sup> Huang, Y.; Li, T.; Eatherton, A.; Mitchell, W. L.; Rong, N.; Ye, L.; Yang, X. J.; Jin, S.; Ding, Y.; Zhang, J.; Li, Y.; Wu, Y.; Jin, Y.; Sang, Y.; Cheng, Z.; Browne, E. R.; Harrison, D. C.; Hussain, I.; Wan, Z.; Hall, A.; Lau, L. F.; Matsuoka, Y. Orally bioavailable and brain-penetrant pyridazine and pyridine-derived  $\gamma$ -secretase modulators reduced amyloidogenic A $\beta$  peptides in vivo. *Neuropharmacology* **2013**, *70*, 278.

Piridazinonas con actividad moduladora *in vitro* de  $\gamma$ -secretasa

### 7.6. Fibrilogénesis del péptido $\beta$ -amiloide

Llevamos a cabo una evaluación cuantitativa de la influencia de los compuestos en estudio en el proceso de fibrilogénesis *in vitro* del péptido  $\beta$ A a la concentración de 10  $\mu$ M. En la Figura 39 se representan conjuntamente los efectos inhibitorios y desagregantes de los 3-ariloxoglutaratos **1a**, **1d** y **1e** en el proceso de fibrilogénesis del péptido  $\beta$ A.

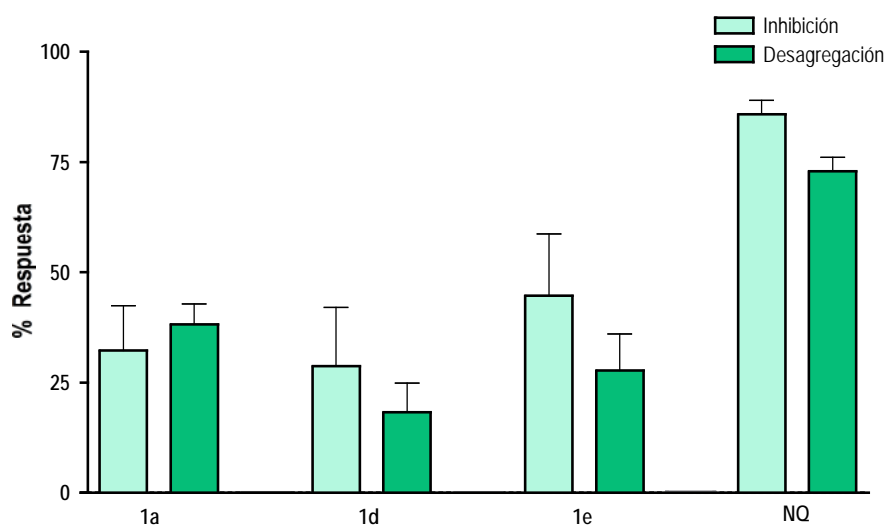


Fig. 39. Efecto de 3-ariloxoglutaratos **1** en el proceso de fibrilogénesis del péptido  $\beta$ A

Se puede observar que los 3-ariloxoglutaratos interfieren en el proceso de la fibrilogénesis, aunque ninguno de ellos alcanzó un efecto comparable con el del control positivo (NQ, 6-hidroxi-1,4-naftoquinona).

En la Figura 40 se representa el efecto de las dihidropiridazinonas **2** y las piridazinonas **3** en la inhibición de la agregación del péptido  $\beta$ A.

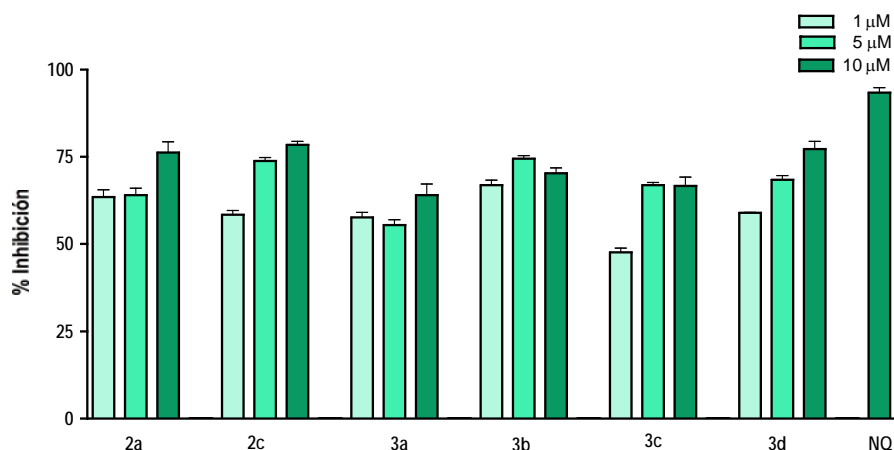


Fig. 40. Efecto de dihidropiridazinonas 2 y piridazinonas 3 en la inhibición de la agregación del  $\beta$ A.

Todos los compuestos inhibieron significativamente la agregación del péptido  $\beta$ A en el rango de concentración 1-10  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ). Los mayores porcentajes de inhibición se observaron para los compuestos 2a, 2c, y 3d. En la Figura 41 se representa el efecto de las dihidropiridazinonas 2 y las piridazinonas 3 en la desagregación de las fibrillas preformadas del péptido  $\beta$ A.

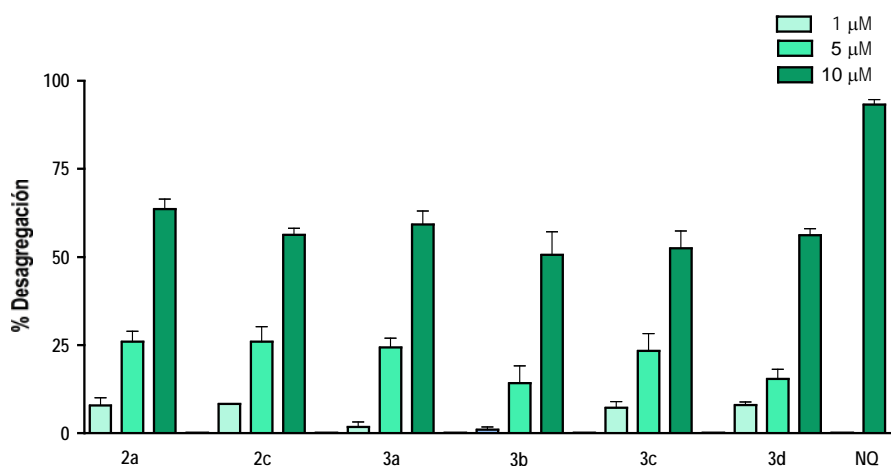


Fig. 41. Efecto de dihidropiridazinonas 2 y piridazinonas 3 en la desagregación del péptido  $\beta$ A

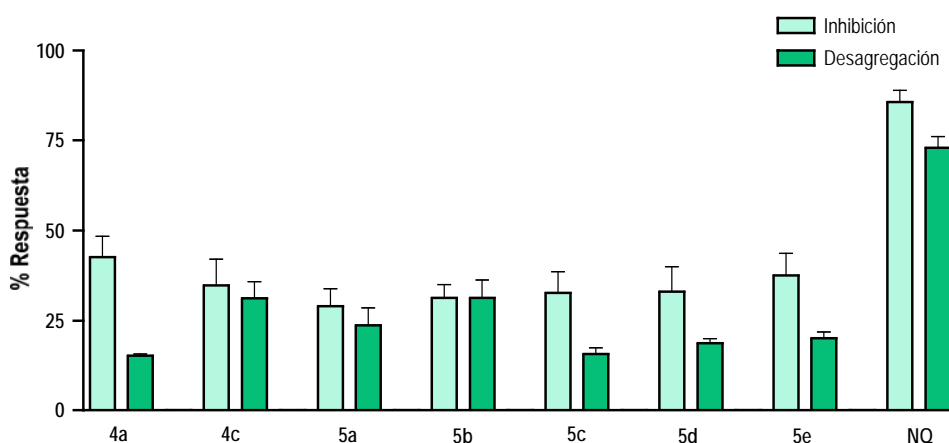
Todos los compuestos mostraron capacidad desagregante de las fibrillas preformadas del péptido  $\beta$ A a 10  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ). De manera similar a lo que ocurre con los 3-ariloxoglutaratos, se puede observar que el efecto en la inhibición de la agregación es mayor que el efecto en la desagregación del péptido  $\beta$ A para todos los compuestos 2 y 3. En la Tabla 11 se muestran los valores de  $CI_{50}$  de dihidropiridazinonas 2 y piridazinonas 3 en el proceso de fibrillogénesis del péptido  $\beta$ A.

Tabla 11.  $CI_{50}$  de dihidropiridazinonas 2 y piridazinonas 3 en la fibrilogénesis del  $\beta A$ .

Piridazinonas	Inhibición de la agregación de $\beta A$ ( $CI_{50}$ , $\mu M$ )	Desagregación de las fibrillas de $\beta A$ ( $CI_{50}$ , $\mu M$ )
2a	$6,22 \pm 0,155$	$7,89 \pm 0,777$
2c	$8,30 \pm 0,422$	$8,35 \pm 0,593$
3a	$6,91 \pm 0,239$	$7,48 \pm 0,141$
3b	$6,31 \pm 0,388$	$7,76 \pm 0,569$
3c	$7,13 \pm 0,390$	$7,15 \pm 0,505$
3d	$6,89 \pm 0,197$	$8,20 \pm 0,255$

Los valores de  $CI_{50}$  encontrados van entre 6 y 8  $\mu M$  para el proceso de agregación, y alrededor de 8  $\mu M$  en el caso del proceso de desagregación. Todos los compuestos mostraron un comportamiento muy similar.

En la Figura 42 se compara el efecto inhibitorio y desagregante de las piridazinas 4 y 5 en la fibrilogénesis del péptido  $\beta A$ .

Fig. 42. Efecto de piridazinas 4 y 5 en la fibrilogénesis del péptido  $\beta A$ 

Ninguno de los compuestos superó el 50% de inhibición de la agregación a la concentración de 10  $\mu M$  ( $p < 0,05$ ), a diferencia del control positivo (NQ, 6-hidroxi-1,4-naftoquinona) que alcanzó el 80% de inhibición ( $p < 0,001$ ). De igual forma, ninguno de los compuestos ensayados alcanzó una desagregación de fibrillas preformadas del péptido  $\beta A$  mayor del 30% ( $p < 0,05$ ), a diferencia del control positivo (NQ, 6-hidroxi-1,4-naftoquinona) que superó el 70% ( $p < 0,0001$ ). Los mejores resultados se observaron para los compuestos 4c y 5b.

La capacidad inhibitoria de la fibrilogénesis del péptido  $\beta A$ , así como la capacidad desagregante de las fibrillas  $A\beta$  *in vitro* se ha demostrado con estructuras de piridazina, como la

N,N'-bis(3-hidroxifenil)piridazina-3,6-diamina (RS-0406).<sup>259</sup> Es más, el tratamiento de cultivos primarios hipocámpales de rata Wistar pretratados con A $\beta$  mejora la viabilidad celular, así como la LTP del cultivo de microcortes hipocámpales,<sup>260</sup> lo que en condiciones *in vivo* se podría traducir en una mejora de la función cognitiva.<sup>261</sup>

En este estudio, hemos demostrado por primera vez que los oxoglutaratos 1 y las piridazinonas 2 y 3 poseen capacidad inhibitoria de la agregación del péptido A $\beta$  y de la desagregación de las fibrillas preformadas.

### 7.7. Actividad de los compuestos en modelos celulares de toxicidad celular

La influencia de los compuestos objeto de esta Memoria en la regulación de la respuesta inflamatoria se estudió en dos modelos celulares de toxicidad:

- Generación intracelular de radicales libres (*Reactive oxygen species*, ROS) en la línea celular de neuroblastoma APPswe, tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Liberación de NO por las células microgliales BV2, como consecuencia de la activación de las mismas con interferón  $\gamma$  (INF $\gamma$ ).

---

<sup>259</sup> O'Hare, E.; Scopes, D. I.; Treherne, J. M.; Norwood, K.; Spanswick, D.; Kim, E. M. RS-0406 arrests amyloid-beta oligomer-induced behavioural deterioration in vivo. *Behav. Brain Res.* **2010**, *210*, 32.

<sup>260</sup> Nakagami, Y.; Nishimura, S.; Murasugi, T.; Kaneko, I.; Meguro, M.; Marumoto, S.; Kogen, H.; Koyama, K.; Oda, T. A novel beta-sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid beta-induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *137*, 676.

<sup>261</sup> Scopes, D. I.; O'Hare, E.; Jeggo, R.; Whyment, A. D.; Spanswick, D.; Kim, E. M.; Gannon, J.; Amijee, H.; Treherne, J. M. A $\beta$  oligomer toxicity inhibitor protects memory in models of synaptic toxicity. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 383.

### 7.7.1. Inhibición de la generación intracelular de radicales libres

La generación intracelular de radicales libres por las células APPswe, como consecuencia del tratamiento con peróxido de hidrógeno, se ha evaluado mediante el incremento en la intensidad de la fluorescencia debido a la oxidación del acetato de DFC. La actividad antioxidante de los compuestos se determinó por el efecto en el descenso del DFC.

En la Figura 43 se representa la inhibición de la generación intracelular de radicales libres que ejercen los 3-ariloxoglutaratos **1a**, **1d** y **1e** en la línea celular APPswe.

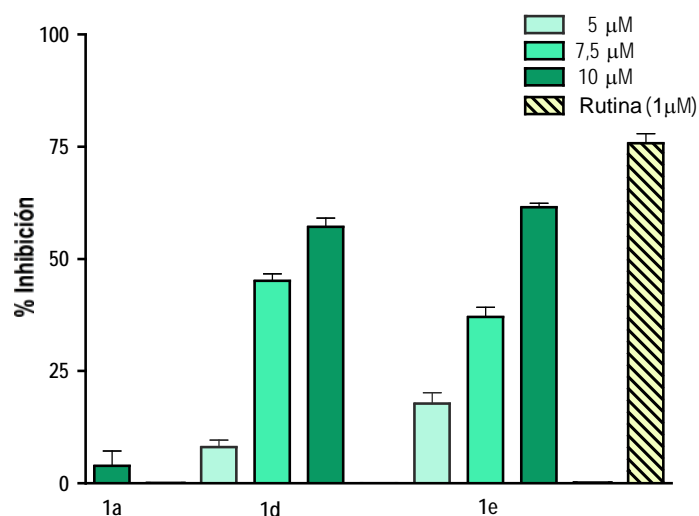


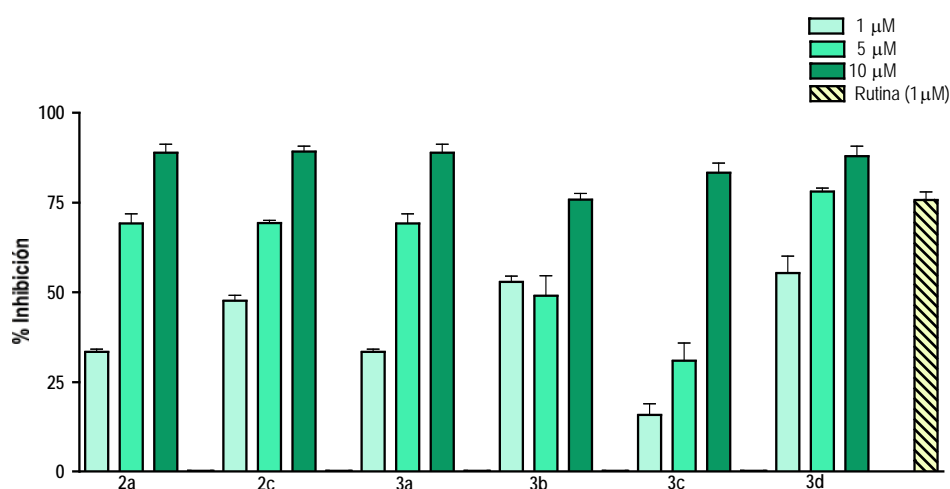
Fig. 43. Efecto de 3-ariloxoglutaratos **1** en la inhibición de la generación de radicales libres

El tratamiento de las células con los compuestos **1d** y **1e**, respectivamente, disminuyó de forma significativa la generación intracelular de radicales libres respecto de las células tratadas exclusivamente con peróxido de hidrógeno ( $p < 0,001$ ), y se observó que este efecto era concentración dependiente. Por el contrario, el compuesto **1a**, a la máxima concentración ensayada de 10 μM, no produjo variación significativa alguna en el incremento de la fluorescencia de las células tratadas con peróxido de hidrógeno. Los valores de  $CI_{50}$  de los 3-ariloxoglutaratos **1** en este ensayo se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12.  $CI_{50}$  de 3-ariloxoglutaratos **1** en la inhibición de la generación de radicales libres

3-ariloxoglutaratos	Inhibición de radicales libres ( $CI_{50}$ , $\mu M$ )
<b>1a</b>	-
<b>1d</b>	$6,45 \pm 0,301$
<b>1e</b>	$6,70 \pm 0,107$

En la Figura 44 se representa la inhibición de la generación intracelular de radicales libres que ejercen las distintas dihidropiridazinonas **2a** y **2c**, así como las piridazinonas **3a-d**, en la línea celular APPswe a distintas concentraciones.

Fig. 44. Efecto de dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** en la inhibición de radicales libres

Se puede observar que el efecto inhibitorio de la generación intracelular de radicales libres, respecto de las células tratadas exclusivamente con peróxido de hidrógeno es, en general, concentración dependiente para todos los compuestos **2** y **3**. La capacidad inhibitoria de estos compuestos se mantuvo incluso a la concentración de  $1 \mu M$  ( $p < 0,001$ , test de Newman-Keuls). De todos ellos, la piridazinona **3c** ( $R^1 = p\text{-CF}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R = H$ ) mostró la menor capacidad inhibitoria a la concentración más baja ( $1 \mu M$ ), mientras que las piridazinonas **3b** ( $R^1 = p\text{-F-C}_6\text{H}_4$ ,  $R = H$ ) y **3d** ( $R^1 = 3,4\text{-OCH}_2\text{O-C}_6\text{H}_3$ ,  $R = H$ ) fueron los compuestos que mostraron mayores capacidades de inhibición.

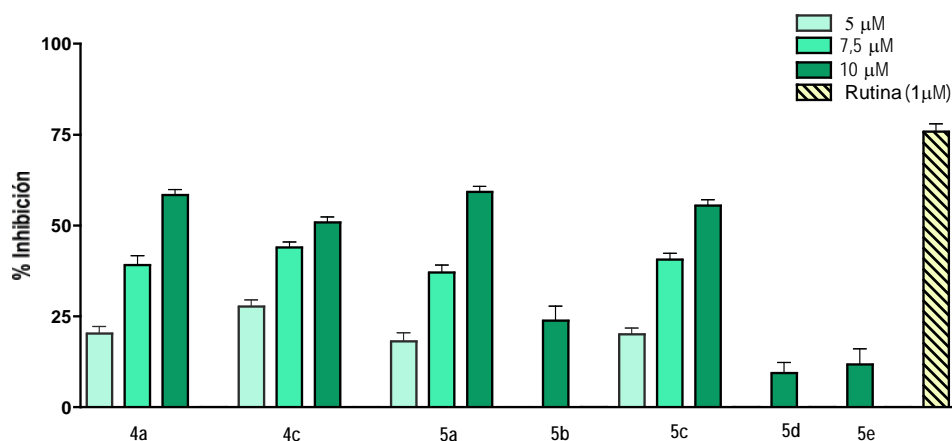
Los valores de  $CI_{50}$  de las diferentes dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** evaluadas en este ensayo se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13.**  $Cl_{50}$  de los compuestos 2 y 3 en la inhibición de la generación de radicales libres

Piridazinonas	Inhibición de radicales libres ( $Cl_{50}$ , $\mu M$ )
2a	$1,88 \pm 0,508$
2c	$1,51 \pm 0,326$
3a	$3,04 \pm 0,190$
3b	$2,42 \pm 0,391$
3c	$6,12 \pm 0,161$
3d	$0,44 \pm 0,135$

Dichos valores se encontraron entre 0,4 y 6  $\mu M$ , destacando el comportamiento de la piridazina 3d ( $R^1 = 3,4-OCH_2O-C_6H_3$ ,  $R = H$ ), con un valor de  $Cl_{50}$  del orden de 0,4  $\mu M$ .

En la Figura 45 se representa la inhibición de la generación intracelular de radicales libres que ejercen las respectivas piridazinas 4 y 5 en la línea celular APPswe a distintas concentraciones.

**Fig. 45.** Efecto de piridazinas 4 y 5 en la inhibición de la generación de radicales libres

El tratamiento de las células con los compuestos 4a, 4c, 5a y 5c disminuyó significativamente la generación intracelular de radicales libres, en términos de intensidad de fluorescencia, respecto de las células tratadas exclusivamente con peróxido de hidrógeno ( $p < 0,001$ ), y se observó que este efecto es concentración dependiente. La Tabla 14 muestra los valores de  $Cl_{50}$  de las diferentes piridazinas evaluadas en este ensayo.

**Tabla 14.**  $CI_{50}$  de los compuestos **4** y **5** en la inhibición de la generación de ROS.

Piridazinas	Inhibición de radicales libres ( $CI_{50}$ , $\mu M$ )
<b>4a</b>	4,14 $\pm$ 0,381
<b>4c</b>	6,23 $\pm$ 0,182
<b>5a</b>	6,46 $\pm$ 0,048
<b>5b</b>	-
<b>5c</b>	5,95 $\pm$ 0,101
<b>5d</b>	-
<b>5e</b>	-

Los valores de  $CI_{50}$  fluctuaron entre 4,1 y 6,5  $\mu M$ , destacando el comportamiento de la piridazina **4a** ( $R^1 = Ph$ ,  $R = H$ ), con un valor de  $CI_{50}$  del orden de 4  $\mu M$ . Por consiguiente, el compuesto **4a** fue el que mostró mayor actividad en la inhibición de la generación de ROS.

La actividad antioxidante de piridazinonas y piridazinas se ha descrito previamente por otros grupos de investigación. Y así, se ha demostrado la actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica *in vitro* de pirrolo[1,2-b]piridazinas.<sup>262</sup> Derivados de 2H-piridazin-3-ona y análogos de 6-cloropiridazina actúan en general como potentes captadores de radical superóxido *in vitro*, mostrando una actividad similar al tocoferol.<sup>263</sup> En nuestro estudio, la actividad inhibitoria de la producción intracelular de radicales libres ha sido bastante más notable para las piridazinonas **3** y **4**.

Estudios en modelos celulares de neurotoxicidad por especies activas de oxígeno han demostrado el efecto neuroprotector de ciertos  $\alpha$ -ceto ácidos,<sup>264</sup> como el 2-oxoglutarato ( $\alpha$ -cetoglutarato),<sup>265</sup> metabolito intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que se produce durante la degradación del glutamato como vía de detoxificación astroglial de este neurotransmisor y como una fuente eficiente de energía para las neuronas. Además, la alteración de la descarboxilación oxidativa del 2-oxoglutarato por medio del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa

<sup>262</sup> Østby, O. B.; Gundersen, L. L.; Rise, F.; Antonsen, O.; Fosnes, K.; Larsen, V.; Bast, A.; Custers, I.; Haenen, G. R. Synthesis of 5-substituted pyrrolo[1,2-b]pyridazines with antioxidant properties. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2001**, *334*, 21.

<sup>263</sup> Caliskan-Ergün, B.; Süküroğlu, M.; Coban, T.; Banoğlu, E.; Suzen, S. Screening and evaluation of antioxidant activity of some pyridazine derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 225.

<sup>264</sup> Shyamala, R.; Vijayashree, R.; Rao, K. R.; Ruckmani, A.; Vijayaraghavan, R.; Bhattacharya, R.; Mathangi, D. C. Effect of alpha-ketoglutarate on neurobehavioral, neurochemical and oxidative changes caused by sub-chronic cyanide poisoning in rats. *Neurochem. Res.* **2011**, *36*, 540.

<sup>265</sup> Kovalenko, T. N.; Ushakova, G. A.; Osadchenko, I.; Skibo, G. G.; Pierzynowski, S. G. The neuroprotective effect of 2-oxoglutarate in the experimental ischemia of hippocampus. *J. Physiol. Pharmacol.* **2011**, *62*, 239.

(OGDH) se encuentra asociada con el incremento en los niveles de glutamato y en la producción de radicales libres. Incluso se ha encontrado una correlación entre la actividad 2-oxoglutarato deshidrogenasa mitocondrial (OGDH) cerebral (OGDHC) y un aumento de la actividad exploratoria y disminución de la ansiedad en animales de experimentación.<sup>266</sup> En el estudio del efecto neuroprotector de análogos del 2-oxoglutarato, se ha sugerido que la inhibición reversible que ejercen estos compuestos sobre la OGDHC en condiciones de estrés metabólico podría normalizar tanto el comportamiento animal como la actividad cerebral de OGDHC.<sup>267</sup>

Con nuestro estudio, hemos demostrado que otros análogos del 2-oxoglutarato, como los 3-ariloxoglutaratos, también presentan una actividad *captadora* significativa de especies activas de oxígeno, y que por tanto, podría explicar una potencial actividad neuroprotectora de los mismos.

---

<sup>266</sup> Trofimova, L.; Lovat, M.; Groznaya, A.; Efimova, E.; Dunaeva, T.; Maslova, M.; Graf, A.; Bunik, V. Behavioral impact of the regulation of the brain 2-oxoglutarate dehydrogenase complex by synthetic phosphonate analog of 2-oxoglutarate: implications into the role of the complex in neurodegenerative diseases. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2010**, *2010*, 749061.

<sup>267</sup> Kabysheva, M. S.; Storozhevykh, T. P.; Pinelis, V. G.; Bunik, V. I. Synthetic regulators of the 2-oxoglutarate oxidative decarboxylation alleviate the glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 1531.

### 7.8. Actividad inhibitoria de la liberación de óxido nítrico

La microglía activada está estrechamente asociada con placas seniles, y muchos factores neurotóxicos y proinflamatorios (citocinas, prostaglandinas, proteasas, y radicales libres como el anión superóxido y el NO, etc.) se encuentran regulados al alta en las zonas afectadas del cerebro con EA.<sup>268</sup> En base a este fenómeno, se ha evaluado la inhibición que ejercen nuestros compuestos en estudio sobre la liberación de NO por células microgliales BV2 activadas (con interferón INF $\gamma$ ).

Previamente a la evaluación de la inhibición de la liberación de NO por los compuestos en estudio, se evaluó la viabilidad de la línea celular BV2 tras el tratamiento con los mismos, con el fin de determinar su posible toxicidad. De esta forma se descarta que la posible inhibición de la formación de nitritos no sea debida a la disminución de la viabilidad celular por el tratamiento con el compuesto en estudio a una concentración tóxica.

En la Figura 46 se representa la viabilidad de la línea microglial BV2 tras el tratamiento con los 3-ariloxoglutaratos **1** a la concentración de 10  $\mu$ M y durante un periodo de 24 horas.

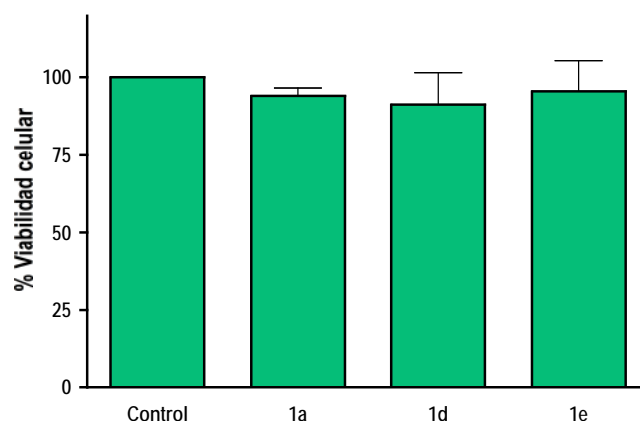


Fig. 46. Efecto de 3-ariloxoglutaratos **1** en la viabilidad celular (línea microglial BV2)

Los porcentajes de viabilidad celular resultaron superiores al 90% del control para todos los compuestos. No se observaron diferencias significativas en los valores de viabilidad celular para ninguna de los compuestos respecto de las células control que no recibieron tratamiento.

<sup>268</sup> McGeer, E. G.; McGeer, P. L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J. Alzheimers Dis.* 2010, 19, 355.

En la Figura 47 se representa la viabilidad de la línea microglial BV2 tras el tratamiento con las dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** a la concentración de 10  $\mu$ M y durante un periodo de 24 horas.

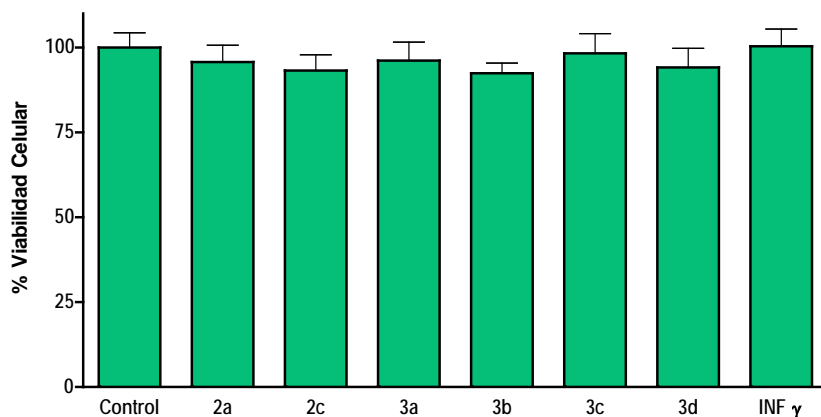


Fig. 47. dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** en la viabilidad celular (línea microglial BV2)

Los porcentajes de viabilidad celular resultaron superiores al 90% del control para todos los compuestos. No se observaron diferencias significativas en los valores de viabilidad celular para ninguna de los compuestos respecto de las células control que no recibieron tratamiento.

En la Figura 48 se representa la viabilidad de la línea microglial BV2 tras el tratamiento con las piridazinas **4** y **5** a la concentración de 10  $\mu$ M y durante un periodo de 24 horas.

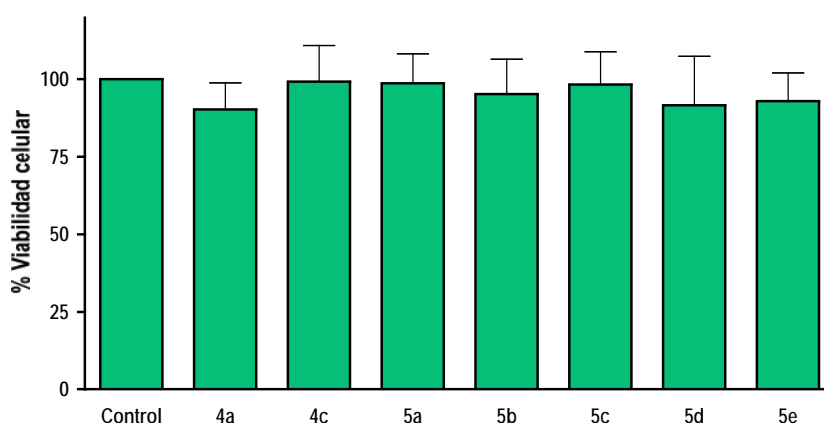


Fig. 48. Efecto de piridazinas **4** y **5** en la viabilidad celular (línea microglial BV2)

Los porcentajes de viabilidad celular resultaron superiores al 90% del control para todos los compuestos. No se observaron diferencias significativas en los valores de viabilidad celular para ninguna de los compuestos respecto de las células control que no recibieron tratamiento.

La Tabla 15 recoge los valores de  $CI_{50}$  en la inhibición de la formación de nitritos en el medio de cultivo de células BV2 tratadas con  $INF\gamma$  y 3-ariloxoglutaratos **1a**, **1d** y **1e**, respectivamente.

**Tabla 15.** Efecto de 3-ariloxoglutaratos 1 en la inhibición de la formación de nitritos en células BV2

3-ariloxoglutaratos	$CI_{50}$ , $\mu M$
<b>1a</b>	$0,36 \pm 0,102$
<b>1d</b>	$0,32 \pm 0,094$
<b>1e</b>	$0,48 \pm 0,195$
<b>Flurbiprofeno</b>	$12,30 \pm 0,591$

Se observó que los tres 3-ariloxoglutaratos estudiados presentaban menor  $CI_{50}$  que el compuesto utilizado como control positivo (flurbiprofeno). Los compuestos **1a** y **1d** mostraron valores similares de  $CI_{50}$  del orden de 300 nM, mientras que el compuesto **1e** presentaba un valor ligeramente superior (400 nM).

La Tabla 16 recoge los valores de  $CI_{50}$  en la inhibición de la formación de nitritos en el medio de cultivo de células BV2 tratadas con  $INF\gamma$  y las distintas dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3**.

**Tabla 16.** Efecto de dihidropiridazinonas **2** y piridazinonas **3** en la inhibición de la formación de nitritos en células BV2

Compuestos	$CI_{50}$ , $\mu M$
<b>2a</b>	$9,43 \pm 0,327$
<b>2c</b>	$5,76 \pm 0,668$
<b>3a</b>	$0,68 \pm 0,173$
<b>3b</b>	$7,31 \pm 0,486$
<b>3c</b>	$9,49 \pm 0,366$
<b>3d</b>	$16,13 \pm 0,707$
<b>Flurbiprofeno</b>	$12,30 \pm 0,591$

Las dihidropiridazinonas **2** y las piridazinonas **3** también mostraron actividad inhibitoria de la formación de nitritos con menor  $CI_{50}$  que el compuesto utilizado como control positivo (flurbiprofeno), si bien los valores de  $CI_{50}$  encontrados fueron superiores a los mostrados por los compuestos **1**. El

mejor resultado se obtuvo para el compuesto **3a**. Sin embargo, la presencia en el sistema de sustituyentes electroaceptores (**3b**, **3c**) o electrodonadores (**3d**), así como la alquilación del átomo de nitrógeno endocíclico (**3e**) no permitieron mejorar la actividad mostrada por **3a**. La dihidropirididazinona análoga a **3a** (compuesto **2a**) también mostró una actividad menor.

La Tabla 17 recoge los valores de  $CI_{50}$  en la inhibición de la formación de nitritos en el medio de cultivo de células BV2 tratadas con  $INF\gamma$  y las distintas piridazinas **4** y **5**.

**Tabla 17.** Efecto de piridazinas **4** y **5** en la inhibición de la formación de nitritos en células BV2

Piridazinas	$CI_{50}$ , $\mu M$
<b>4a</b>	$0,42 \pm 0,112$
<b>4c</b>	$5,18 \pm 0,465$
<b>5a</b>	$0,94 \pm 0,115$
<b>5b</b>	$10,96 \pm 0,597$
<b>5c</b>	$5,85 \pm 0,288$
<b>5d</b>	$5,73 \pm 0,301$
<b>5e</b>	$5,33 \pm 0,243$
<b>Flurbiprofeno</b>	$12,30 \pm 0,591$

Los compuestos **4a**, **4c** y **5a**, **5c**, **5d**, **5e** inhibieron significativamente la formación de nitritos en la línea celular BV2, con valores de  $CI_{50}$  inferiores a la mostrada por el compuesto utilizado como control positivo (flurbiprofeno). Los mejores resultados se obtuvieron con **4a** y **5a**, ambos con sustitución de grupo fenilo no funcionalizado.

La inhibición en la formación de nitritos que ejercen las piridazinas no es debida ni a toxicidad por  $INF\gamma$  ni a toxicidad por la asociación  $INF\gamma$  + piridazina en la línea celular BV2, como lo demuestran los valores de viabilidad (Fig. 64). Los mejores resultados se obtuvieron con los compuestos **4a** y **5a**, que redujeron la concentración de nitritos hasta valores próximos a los de las células control que no recibieron ningún tratamiento.

Los porcentajes de viabilidad celular resultaron ser superiores al 90% del control para todos los compuestos. No se observaron diferencias significativas en los valores de viabilidad celular para

ninguna de los tratamientos (piridazinas +  $\text{INF}\gamma$  e  $\text{INF}\gamma$ , respectivamente) respecto de las células control.

La patogénesis de la respuesta inflamatoria implica la activación secuencial de moléculas de señalización, entre las que se encuentra el NO, mediador inflamatorio clave generado mediante la isoforma inducible del enzima óxido nítrico sintasa (NOS-2). La inhibición de la formación de nitritos (metabolito estable del NO) por las mencionadas piridazinas apunta a una potencial actividad antiinflamatoria de las mismas.

Diversos estudios han demostrado actividad antiinflamatoria de derivados 3-amino-6-fenilpiridazinas, entre ellos MW01-070C relativamente más selectivo para la inhibición de la proteína quinasa por su capacidad para inhibir la óxido iNOS y así la producción y la acumulación de NO y (IL-1 $\beta$ ) medida con células BV-2 microgliales activadas de ratón.<sup>269</sup>

Muchas piridazinas presentan esta misma actividad, entre ellas 3,4-bis(4-metoxifenil)piridazinas sustituidas en la posición 6, y los compuestos **9** y **10** (fig 49) disminuyen las citoquinas liberadas de microglia activada.<sup>270,271,272</sup> Incluso se ha descrito que en extractos solubles hipocámpales de ratón adulto C57BL/6 disminuyen los niveles de citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y S100B, inducidas con infusión de  $\beta\text{A}$  (1-42), por el tratamiento con **11** y **10** (i.p.), respectivamente, tres semanas después de iniciar el tratamiento con  $\beta\text{A}$ .<sup>273,274</sup>

---

<sup>269</sup> Watterson, D. M.; Velentza, A. V.; Zasadzki, M.; Craft, J. M.; Haiech, J.; Van Eldik, L. J. Discovery of a new class of synthetic protein kinase inhibitors that suppress selective aspects of glial activation and protect against beta-amyloid induced injury: a foundation for future medicinal chemistry efforts focused on targeting Alzheimer's disease progression. *J. Mol. Neurosci.* **2003**, *20*, 411.

<sup>270</sup> Matsuda, T.; Aoki, T.; Ohgiya, T.; Koshi, T.; Ohkuchi, M.; Shigyo, H. Synthesis and bioactivities of novel pyridazine derivatives: inhibitors of interleukin-1 beta (IL-1beta) production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2369.

<sup>271</sup> Matsuda, T.; Aoki, T.; Koshi, T.; Ohkuchi, M.; Shigyo, H. Synthesis and bioactivities of novel 5,6-bis(4-methoxyphenyl)-2H-pyridazin-3-one derivatives: inhibitors of interleukin-1 beta (IL-1beta) production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2373.

<sup>272</sup> Hu, W.; Ralay Ranaivo, H.; Craft, J. M.; Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M. Validation of the neuroinflammation cycle as a drug discovery target using integrative chemical biology and lead compound development with an Alzheimer's disease-related mouse model. *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, *2*, 197.

<sup>273</sup> Craft, J. M.; Van Eldik, L. J.; Zasadzki, M.; Hu, W.; Watterson, D. M. Aminopyridazines attenuate hippocampus-dependent behavioral deficits induced by human beta-amyloid in a murine model of neuroinflammation. *J. Mol. Neurosci.* **2004**, *24*, 115.

<sup>274</sup> Ralay Ranaivo, H.; Craft, J. M.; Hu, W.; Guo, L.; Wing, L. K.; Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M. Glia as a therapeutic target: selective suppression of human amyloid-beta-induced upregulation of brain proinflammatory cytokine production attenuates neurodegeneration. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 662.

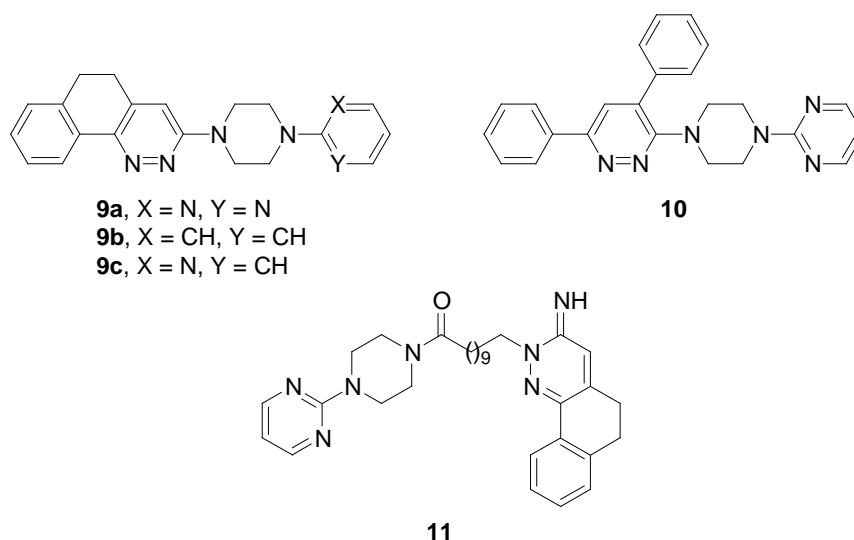


Fig. 49. Piridazinas que disminuyen la liberación de citoquinas de microglía activada

### 7.9. Evaluación conjunta de la actividad farmacológica por familia de compuesto

En las Tablas 18, 19 y 20 se recogen las actividades farmacológicas encontradas para los compuestos objeto de estudio que no mostraron toxicidad en los estudios de viabilidad celular.

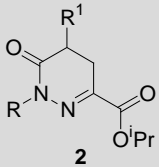
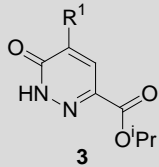
Tabla 18. Actividad farmacológica de los compuestos 1 en los distintos estudios realizados

3-ariloxoglutaratos			
Actividad	1a R <sup>1</sup> = Ph	1d R <sup>1</sup> = <i>p</i> -Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1e R <sup>1</sup> = <i>p</i> -F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
β-secretasa (Cl <sub>50</sub> )	20,93 ± 2,305	14,06 ± 2,542	27,55 ± 4,933
γ-secretasa (Cl <sub>50</sub> )	42,28 ± 8,214	21,79 ± 0,381	30,42 ± 6,549
% Inhibición AChE (100 μM)	20,27 ± 1,990	29,58 ± 6,390	12,73 ± 7,500
% Inhibición agregación βA (10 μM)	32,30 ± 7,862	28,76 ± 5,421	44,77 ± 5,684
% Desagregación βA (10 μM)	38,25 ± 2,646	18,25 ± 3,832	27,79 ± 4,769
Generación de ROS (Cl <sub>50</sub> )	-	6,45 ± 0,301	6,70 ± 0,107
Liberación de NO (Cl <sub>50</sub> )	0,36 ± 0,102	0,32 ± 0,094	0,48 ± 0,195

(-) No se puede calcular la Cl<sub>50</sub>, % Inhibición < 50%  
Cl<sub>50</sub> se expresa en μM

Se muestran en la Tabla 18 los datos relativos a los compuestos **1a**, **d**, **e**. Con excepción del compuesto **1a**, el resto de los compuestos mostraron actividad en todos los ensayos farmacológicos realizados. La comparación de **1d** con **1e** pone de manifiesto la mayor actividad de **1d** en todos los ensayos de inhibición enzimática. Por el contrario, en la inhibición de la agregación de  $\beta$ A, y en la desagregación de  $\beta$ A, el compuesto **1e** resultó más activo. Ambos compuestos mostraron un comportamiento similar en cuanto a su capacidad de inhibición de  $\gamma$ -secretasa, inhibición de ROS e inhibición de la liberación de NO.

Tabla 19. Actividad farmacológica de dihidropiridazinonas 2 y piridazinonas 3 en los estudios realizados

Piridazinonas						
	 2		 3			
Actividad	2a R <sup>1</sup> = Ph R = H	2c R <sup>1</sup> = Ph R = Me	3a R <sup>1</sup> = Ph	3b R <sup>1</sup> = <i>p</i> -F- C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3c R <sup>1</sup> = <i>p</i> -CF <sub>3</sub> - C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3d R <sup>1</sup> = 3,4- OCH <sub>2</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>
β-secretasa (CI <sub>50</sub> )	25,83 ± 1,952	38,89 ± 1,704	-	20,49 ± 0,816	22,81 ± 2,638	27,62 ± 0,831
% Inhibición γ-secretasa (100 μM)	10,69 ± 7,604	4,18 ± 10,410	56,28 ± 6,863	9,12 ± 10,890	10,38 ± 1,458	14,04 ± 7,161
Inhibición de AChE (CI <sub>50</sub> )	-	-	7,68 ± 0,135	-	-	-
Inhibición agregación βA (CI <sub>50</sub> )	6,22 ± 0,155	8,30 ± 0,422	6,91 ± 0,239	6,31 ± 0,388	7,13 ± 0,390	6,89 ± 0,197
Desagregación βA (CI <sub>50</sub> )	7,89 ± 0,777	8,35 ± 0,593	7,48 ± 0,141	7,76 ± 0,569	7,15 ± 0,505	8,20 ± 0,255
Generación de ROS (CI <sub>50</sub> )	1,88 ± 0,508	1,51 ± 0,326	3,04 ± 0,190	2,42 ± 0,391	6,12 ± 0,161	0,44 ± 0,135
Liberación de NO (CI <sub>50</sub> )	9,43 ± 0,327	5,76 ± 0,668	0,68 ± 0,173	7,31 ± 0,486	9,94 ± 0,366	16,13 ± 0,707

(-) No se puede calcular CI<sub>50</sub>, % Inhibición < 50%  
CI<sub>50</sub> se expresa en μM

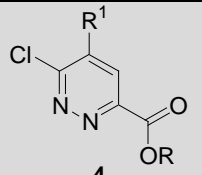
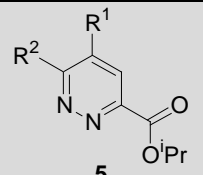
En la Tabla 19 se muestran los datos relativos a los compuestos **2a**, **2c** y **3a-d**. Con excepción del compuesto **3a**, el resto de los compuestos mostraron actividad en todos los ensayos farmacológicos realizados, con excepción de la inhibición de AChE, donde sólo el compuesto **3a** resultó activo.

La comparación de **2a** con **2c** pone de manifiesto que ambos compuestos mostraron similar comportamiento en cuanto a la inhibición de la agregación y la desagregación de A $\beta$ , así como en la inhibición de ROS. Sin embargo, el compuesto **3a** resultó más eficaz en la inhibición de  $\gamma$ -secretasa y en la inhibición de AChE. Dado que la diferencia estructural entre ambos compuestos radica en la funcionalización del átomo de nitrógeno en posición 2, se puede concluir que la funcionalización de dicha posición juega un papel relevante en la actividad inhibitoria de secretasas por este tipo de compuestos, sin relevancia práctica en el resto de propiedades farmacológicas de estas moléculas.

La comparación de los compuestos **3b-d** pone de manifiesto, nuevamente, pocas diferencias significativas en cuanto a su capacidad de inhibición de la agregación y la desagregación de A $\beta$ , así como en la inhibición de ROS. Mientras que los compuestos **3b** y **3c** mostraron actividades de inhibición similares tanto para  $\beta$ -secretasa como para  $\gamma$ -secretasa, el compuesto **3d** mostró mayor eficacia en la inhibición de  $\gamma$ -secretasa, si bien su capacidad inhibitoria de la  $\beta$ -secretasa resultó sensiblemente inferior que la de **3b** y **3c**.

Sin embargo, cabe destacar que, a pesar de su escasa actividad frente a  $\beta$ -secretasa, el compuesto **3a** resultó notablemente más eficaz en la inhibición de  $\gamma$ -secretasa que el resto de compuestos de la serie, y adicionalmente resultó activo en la inhibición de AChE.

Tabla 20. Actividad farmacológica de las piridazinas 4 y 5 en los distintos estudios realizados

Piridazinas							
	 4		 5				
Actividad	4a R <sup>1</sup> = Ph R = iPr	4c R <sup>1</sup> = H R = Me	5a R <sup>1</sup> = Ph R <sup>2</sup> = Ph	5b R <sup>1</sup> = Ph R <sup>2</sup> = <i>p</i> -MeO- C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5c R <sup>1</sup> = Ph R <sup>2</sup> = <i>p</i> -F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5d R <sup>1</sup> = <i>p</i> -CF <sub>3</sub> - C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> R <sup>2</sup> = Ph	5e R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = <i>p</i> - CF <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
β-secretasa (CI <sub>50</sub> )	-	4,04 ± 1,380	17,65 ± 9,723	13,01 ± 3,726	35,77 ± 4,512	19,07 ± 0,504	30,88 ± 7,058
γ-secretasa (CI <sub>50</sub> )	-	26,76 ± 7,019	44,33 ± 0,357	-	-	-	59,82 ± 2,772
% Inhibición de AChE (100 μM)	30,23 ± 6,310	26,91 ± 6,410	30,23 ± 5,270	21,89 ± 7,140	26,25 ± 5,850	23,64 ± 3,450	29,75 ± 4,970
% Inhibición agregación βA (10 μM)	42,61 ± 5,742	34,74 ± 7,281	28,95 ± 4,924	31,29 ± 3,682	32,65 ± 5,936	33,09 ± 6,892	37,59 ± 6,031
% Desagregación βA (10 μM)	15,14 ± 0,483	31,25 ± 4,620	23,70 ± 4,854	31,30 ± 5,004	15,63 ± 1,792	18,75 ± 1,218	20,17 ± 1,666
Generación de ROS (CI <sub>50</sub> )	4,14 ± 0,381	6,23 ± 0,182	6,46 ± 0,048	-	5,95 ± 0,101	-	-
Liberación de NO (CI <sub>50</sub> )	0,42 ± 0,112	5,18 ± 0,465	0,94 ± 0,115	10,96 ± 0,597	5,85 ± 0,288	5,73 ± 0,301	5,33 ± 0,243

(-) No se puede calcular CI<sub>50</sub>, % Inhibición < 50%  
CI<sub>50</sub> se expresa en μM

Se muestran en la Tabla 20 los datos relativos a los compuestos **4a**, **4c** y **5a-e**. El compuesto **4a** no mostró actividad significativa de inhibición de  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, y junto con él, los compuestos **5b**, **5c** y **5d** no mostraron actividad inhibitoria significativa de  $\gamma$ -secretasa. Por otra parte, los compuestos **5b**, **5d** y **5e** no mostraron actividad significativa en la inhibición de ROS. Así pues, los compuestos **4c** y **5a** fueron los únicos que mostraron actividad simultánea en todo el conjunto de ensayos.

Adicionalmente, la comparación de los compuestos **4c** y **5a** pone de manifiesto un mejor comportamiento global de **4c** en la inhibición enzimática de  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, así como un mayor porcentaje de inhibición de la agregación de  $\beta$ A, mientras que **5a** se mostró claramente superior en la desagregación de  $\beta$ A.

Por otra parte, en lo que respecta a la liberación de NO, tanto los compuestos **4** como los compuestos **5** mostraron una elevada capacidad para su inhibición, que superaron la del compuesto empleado como referencia en dicho ensayo (flurbiprofeno). Los mejores resultados se obtuvieron para los compuestos **4a** y **5a**. Asimismo, todos los compuestos **5** presentaron valores similares en el porcentaje de desagregación de  $\beta$ A, y tan solo dos de ellos (**5a** y **5c**) mostraron actividad inhibitoria de la generación de radicales libres, con valores similares. Si bien **5a** resultó activo frente a todos los ensayos, únicamente se mostró como el más activo de la serie en la inhibición de  $\gamma$ -secretasa, aunque tan solo los compuestos **5a** y **5e** mostraron actividad inhibitoria de este enzima. El compuesto **5b** fue el más activo tanto en la inhibición de  $\beta$ -secretasa como en la desagregación de A $\beta$ .

Finalmente, la consideración global de los resultados permite concluir que los compuestos **2a** (que mostró las mayores capacidades de inhibición de la agregación y de efecto desagregante del péptido  $\beta$ A), **3d** (que mostró la mayor inhibición de la generación de ROS), y **4c** (que mostró la mayor capacidad de inhibición enzimática tanto de  $\beta$ -secretasa como de  $\gamma$ -secretasa), y que resultaron activos también en todos los demás ensayos realizados, presentan los mejores perfiles de todos los compuestos ensayados de cara a un posterior desarrollo en búsqueda de fármacos útiles en la terapia multidiana de la EA

## 8. Conclusiones



**Derivados 1,4-naftoquinona:**

1. Varios compuestos con estructura 1,4-naftoquinona presentaron actividad inhibitoria de AChE. Los compuestos **9**, **21** y **24** resultaron particularmente activos. La funcionalización de la posición 5 del sistema de 1,4-naftoquinona con grupos funcionales de carácter electronegativo y con capacidad de aceptación de enlaces de hidrógeno (**21**, **24**) favoreció la actividad inhibitoria. Sin embargo, la presencia de un grupo hidroxilo en dicha posición (**9**) requirió la presencia adicional de un halógeno (bromo) en posición 2.
2. Los compuestos **2**, **3**, **5**, **9**, **11**, **12**, **14** y **19** inhibieron  $\beta$ -secretasa con una  $CI_{50} < 10 \mu M$ . Con excepción del compuesto **11**, todos ellos presentan grupos OH no protegidos. La actividad inhibitoria de  $\beta$ -secretasa resultó independiente de la posición de dichos grupos en la estructura.
3. Los compuestos **4**, **8** y **24** poseen las  $CI_{50}$  más bajas en la inhibición de la agregación de  $\beta A$ . La presencia de grupos funcionales con carácter electroceptor en el anillo bencénico de la estructura de 1,4-naftoquinona parece favorecer dicha actividad.
4. Los compuestos **1**, **3**, **4**, **19** y **24** son activos en la inhibición de la agregación y en la desagregación de  $\beta A$ . Además de presentar grupos OH no protegidos, algunos compuestos como **24** y la propia 1,4-naftoquinona (**1**) no funcionalizada mostraron actividad.
5. En la inhibición de la liberación de óxido nítrico, los compuestos **2**, **3**, **5**, **6**, **9**, **10**, **15** y **16** presentan actividad (por encima del 40% de inhibición), siendo el **15** el que resultó más activo. De nuevo, la presencia de grupos OH no protegidos favoreció la actividad.
6. Como posibles candidatos para el desarrollo de fármacos con potencial terapéutico en la EA, se proponen los derivados **3**, **9**, **19** y **24**. Los compuestos **3** y **19** resultaron activos en la inhibición de  $\beta$ -secretasa y de la agregación de  $\beta A$ , en la desagregación de  $\beta A$ , y en la inhibición de la liberación de óxido nítrico. El compuesto **9** resultó activo en la inhibición de AChE,  $\beta$ -secretasa, y en la inhibición de la liberación de óxido nítrico. El compuesto **24** resultó activo en la inhibición de AChE, y en la agregación y desagregación de  $\beta A$ , siendo uno de los compuestos que posee la  $CI_{50}$  más bajas en la inhibición de la agregación de  $\beta A$ .

**Derivados de 3-ariloxoglutaratos, piridazinonas y piridazinas:**

7. En cuanto a los efectos en la inhibición de la agregación de  $\beta$ A y la capacidad desagregante y desestabilizadora de las fibrillas  $\beta$ A preformadas, las piridazinonas presentaron la mayor actividad, con valores de  $CI_{50}$  entre 6,22 y 8,20  $\mu$ M.
8. En la inhibición de la actividad  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, sólo los 3-ariloxoglutaratos y las piridazinas mostraron una actividad relevante. El compuesto **4c** es el que presentó mayor actividad, con una  $CI_{50}$  de 4,04 y 26,76  $\mu$ M, respectivamente.
9. Sobre la actividad inhibitoria de ROS, las piridazinas que presentaron actividad fueron los compuestos **4a** y **4c** (6-cloropiridazinas), y los compuestos **5a** y **5c** (5,6-diarilpiridazinas). La presencia de grupos arilo no sustituidos (**4a**, **5a**, Ar = fenilo), la ausencia de dicho grupo (**4c**) o la funcionalización del anillo arílico en posición 6 con grupos fuertemente electroaceptores y con capacidad para la formación de enlaces de hidrógeno, favoreció dicha actividad.
10. En lo que respecta a la inhibición de la liberación de óxido nítrico, la mayor actividad se detectó para los 3-ariloxoglutaratos, siendo el más activo el compuesto **1d**. De igual forma, tanto los compuestos de la serie **4** como los compuestos de la serie **5** mostraron una elevada capacidad de inhibición, que superó la del compuesto de referencia en dicho ensayo (flurbiprofeno). Los mejores resultados se obtuvieron para los compuestos **4a** y **5a**.
11. Como posibles candidatos para el desarrollo de fármacos con potencial terapéutico en la EA, se propone que los 4-aril-2-oxopentanodioatos (**1d** y **1e**), todos los derivados con esqueleto de piridazinona, especialmente el compuesto **3a** y, todos los derivados de piridazina, especialmente el compuesto **4c**, podrían ser explorados en otras dianas farmacológicas relacionadas con la EA. Además, estos resultados sugieren que la preparación de nuevos derivados a partir de ellos podría traducirse en compuestos de interés para el desarrollo de fármacos con actividad multidiana.

## 9. Bibliografía



- Aguilar-Martínez, M.; Cuevas, G.; Jiménez-Estrada, M.; González, I.; Lotina-Hennsen, B.; Macías-Ruvalcaba, N. An experimental and theoretical study of the substituent effects on the redox properties of 2-[(R-phenyl) amine]-1,4-naphthalenediones in acetonitrile. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3684.
- Aleeva, G. N.; Molodavkin, G. M.; Voronina, T. A. Comparison of antidepressant effects of azafan, tianeptine, and paroxetine. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2009**, *148*, 54.
- Allegri, R. F.; Guekht, A. Cerebrolysin improves symptoms and delays progression in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Drugs Today (Barc)*. **2012**, *48*, Suppl A, 25.
- Al-Majed, A. A.; Al-Omar, F. A.; Nagi, M. N. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *543*, 40.
- Alvarez, X. A.; Cacabelos, R.; Sampedro, C.; Aleixandre, M.; Linares, C.; Granizo, E.; Doppler, E.; Moessler, H. Efficacy and safety of Cerebrolysin in moderate to moderately severe Alzheimer's disease: results of a randomized, double-blind, controlled trial investigating three dosages of Cerebrolysin. *Eur. J. Neurol.* **2011**, *18*, 59.
- Ashton Acton, Q. Secretory Proteinase Inhibitory Proteins—Advances in Research and Application. ScholarlyEditions. Atlanta, Georgia, **2013**.
- Asif, M. Some recent approaches of biologically active substituted pyridazine and phthalazine drugs. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2984.
- Assimopoulou, A. N.; Sturm, S.; Stuppner, H.; Papageorgiou, V. P. Preparative isolation and purification of alkannin/shikonin derivatives from natural products by high-speed counter-current chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 182.
- Bajda, M.; Guzior, N.; Ignasik, M.; Malawska, B. Multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease treatment. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4949.
- Ballatore, C.; Brunden, K. R.; Piscitelli, F.; James, M. J.; Crowe, A.; Yao, Y. M.; Hyde, E.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y.; Smith, A. B. Discovery of Brain-Penetrant, Orally Bioavailable Aminothienopyridazine Inhibitors of Tau Aggregation. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3739.
- Ballatore, C.; Crowe, A.; Piscitelli, F.; James, M.; Lou, K. V.; Rossidivito, G.; Yao, Y. M.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y.; Brunden, K. R.; Smith, A. B. Aminothienopyridazine inhibitors of tau aggregation: Evaluation of structure-activity relationship leads to selection of candidates with desirable in vivo properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4451.
- Banerjee, P. S. Various Biological Activities of Pyridazinone Ring Derivatives. *Asian J. Chem.* **2011**, *23*, 1905.
- Barbaro, R.; Betti, L.; Botta, M.; Corelli, F.; Giannaccini, G.; Maccari, L.; Manetti, F.; Strappaghetti, G.; Corsano, S. Synthesis, biological evaluation, and pharmacophore generation of new pyridazinone derivatives with affinity toward alpha(1)- and alpha(2)-adrenoceptors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2118.

- Bayer, T. A.; Schäfer, S.; Breyhan, H.; Wirths, O.; Treiber, C.; Multhaup, G. A vicious circle: role of oxidative stress, intraneuronal Abeta and Cu in Alzheimer's disease. *Clin. Neuropathol.* **2006**, *25*, 163.
- Bergeron, F.; Klarskov, K.; Hunting, D. J.; Wagner, J. R. Near-UV photolysis of 2-methyl-1,4-naphthoquinone-DNA duplexes: characterization of reversible and stable interstrand cross-links between quinones and adenine moieties. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 745.
- Beswick, P.; Bingham, S.; Bountra, C.; Brown, T.; Browning, K.; Campbell, I.; Chessell, I.; Clayton, N.; Collins, S.; Corfield, J.; Guntrip, S.; Haslam, C.; Lambeth, P.; Lucas, F.; Mathews, N.; Murkit, G.; Naylor, A.; Pegg, N.; Pickup, E.; Player, H.; Price, H.; Stevens, A.; Stratton, S.; Wiseman, J. Identification of 2,3-diaryl-pyrazolo[1,5-b]pyridazines as potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5445.
- Biedler, J. L.; Helson, L.; Spengler, B. A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* **1973**, *33*, 2643.
- Biedler, J. L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M.; Freedman, L. S. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* **1978**, *38*, 3751.
- Birch, D. J. S.; Imhof, R. E. "Time-domain fluorescence spectroscopy using time correlated single-photon counting". En *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol 1. Techniques. Editado por Lakowicz J.R. Plenum Press, New York, **1991**, 1.
- Blasi, E.; Barluzzi, R.; Bocchini, V.; Mazzolla, R.; Bistoni, F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J. Neuroimmunol.* **1990**, *27*, 229.
- Blennow, K.; de Leon, M.J.; Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet* **2006**, *368*, 387.
- Bolognesi, M. L.; Simoni, e.; Rosini, M.; Minarini, A.; Tumiatti, V.; Melchiorre. Multitarget-directed ligands: innovative chemical probes and therapeutic tools against Alzheimer's disease. *C. Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2797.
- Bossy-Wetzel, E.; Schwarzenbacher, R.; Lipton, S.A. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat. Med.* **2004**, *10 Suppl*, S2.
- Bourne, Y.; Grassi, J.; Bougis, P. E.; Marchot, P. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30370.
- Bozzali, M.; Parker, G. J.; Spanò, B.; Serra, L.; Giulietti, G.; Perri, R.; Magnani, G.; Marra, C.; G Vita, M.; Caltagirone, C.; Cercignani, M. Brain tissue modifications induced by cholinergic therapy in Alzheimer's disease. *Hum. Brain Mapp.* **2013**, *34*, 3158.
- Broersen, L. M.; Kuipers, A. A.; Balvers, M.; van Wijk, N.; Savelkoul, P. J.; de Wilde, M. C.; van der Beek, E. M.; Sijben, J. W.; Hageman, R. J.; Kamphuis, P. J.; Kiliaan, A. J. A specific multi-nutrient diet reduces Alzheimer-like pathology in young adult A $\beta$ PPswe/PS1dE9 mice. *J. Alzheimers Dis.* **2013**; *33*, 177.
- Bruneton, J. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales (2ª ed). Editorial Acribia, **2001**.

- Butini, S.; Brogi, S.; Novellino, E.; Campiani, G.; Ghosh, A. K.; Brindisi, M.; Gemma, S. Source. The structural evolution of  $\beta$ -secretase inhibitors: a focus on the development of small-molecule inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1787.
- Butterfield, D.A.; Drake, J.; Pocernich, C.; Castegna, A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.* **2001**, *7*, 548.
- Calabrese, E. J. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Hum. Exp. Toxicol.* **2010**, *29*, 249.
- Caliskan-Ergun, B.; Sukuroglu, M.; Coban, T.; Banoglu, E.; Suzen, S. Screening and evaluation of antioxidant activity of some pyridazine derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 225.
- Carotti, A.; Catto, M.; Leonetti, F.; Campagna, F.; Soto-Otero, R.; Mendez-Alvarez, E.; Thull, U.; Testa, B.; Altomare, C. Synthesis and monoamine oxidase inhibitory activity of new pyridazine-, pyrimidine- and 1,2,4-triazine-containing tricyclic derivatives. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5364.
- Castagnoli, K. P.; Steyn, S. J.; Petzer, J. P.; Van der Schyf, C. J.; Castagnoli, N, Jr. Neuroprotection in the MPTP Parkinsonian C57BL/6 mouse model by a compound isolated from tobacco. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 523.
- Castagnoli, K.; Petzer, J. B.; Steyn, S. J.; van der Schyf, C. J.; Castagnoli, N. Jr. Inhibition of human MAO-A and MAO-B by a compound isolated from flue-cured tobacco leaves and its neuroprotective properties in the MPTP mouse model of neurodegeneration. *Inflammopharmacology* **2003**, *11*, 183.
- Chico, L. K.; Behanna, H. A.; Hu, W.; Zhong, G.; Roy, S. M.; Watterson, D. M. Molecular properties and CYP2D6 substrates: central nervous system therapeutics case study and pattern analysis of a substrate database. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 2204.
- Chiriano, G.; Sartini, A.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Bolognesi, M. L.; Roberti, M.; Recanatini, M.; Carloni, P.; Cavalli, A. Sequential virtual screening approach to the identification of small organic molecules as potential BACE-1 inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *77*, 268.
- Chow, Y. L.; Lee, K. H.; Vidyadaran, S.; Lajis, N. H.; Akhtar, M. N.; Israf, D. A.; Syahida, A. Cardamonin from *Alpinia rafflesiana* inhibits inflammatory responses in IFN-gamma/LPS-stimulated BV2 microglia via NF-kappaB signalling pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *12*, 657.
- Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 387.
- Constantino, L.; Barloco, D. Designed multiple ligands: basic research vs clinical outcomes. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3353.
- Contreras J. M.; Rival, Y. M.; Chayer, S.; Bourguignon, J. J.; Wermuth, C. G. Aminopyridazines as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 730.
- Contreras, J. M.; Parrot, I.; Sippl, W.; Rival, Y. M.; Wermuth, C. G. Design, synthesis, and structure-activity relationships of a series of 3-[2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethylamino]pyridazine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2707.

Craft, J. M.; Van Eldik, L. J.; Zasadzki, M.; Hu, W.; Watterson, D. M. Aminopyridazines attenuate hippocampus-dependent behavioral deficits induced by human beta-amyloid in a murine model of neuroinflammation. *J. Mol. Neurosci.* **2004**, *24*, 115.

Craft, S. Insulin resistance syndrome and Alzheimer disease: pathophysiologic mechanisms and therapeutic implications. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2006**, *20*, 298.

Craig, L. A.; Hong, N. S.; McDonald, R. J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2011**, *35*, 1397.

Davenport, C. M.; Sevastou, I. G.; Hooper, C.; Pocock, J. M. Inhibiting p53 pathways in microglia attenuates microglial-evoked neurotoxicity following exposure to Alzheimer peptides. *J. Neurochem.* **2010**, *112*, 552.

Davtyan, H.; Ghochikyan, A.; Petrushina, I.; Hovakimyan, A.; Davtyan, A.; Poghosyan, A.; Marleau, A. M.; Movsesyan, N.; Kiyatkin, A.; Rasool, S.; Larsen, A. K.; Madsen, P. J.; Wegener, K. M.; Ditlevsen, D. K.; Cribbs, D. H.; Pedersen, L. O.; Agadjanyan, M. G. Immunogenicity, efficacy, safety, and mechanism of action of epitope vaccine (Lu AF20513) for Alzheimer's disease: prelude to a clinical trial. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 4923.

De Strooper, B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **2003**, *38*, 9.

Deane, R.; Wu, Z.; Zlokovic, B. V. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* **2004**, *35*, 2628.

Du, H. Z.; Zhang, C. F.; Li, M. Y.; Yang, P. 3-Benzidino-6(4-chlorophenyl) pyridazine blocks delayed rectifier and transient outward potassium current in acutely isolated rat hippocampal pyramidal neurons. *Neurosci. Lett* **2006**, *402*, 159.

Dumas, J. A.; Newhouse, P. A. The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional Ren, Y.; Sahara, N. Characteristics of tau oligomers. *Front. Neurol.* **2013**, *4*, 102.

Egea, J. Rios, C. 1,8-Naphthyridine derivatives as cholinesterases inhibitors and cell Ca<sup>2+</sup> regulators, a multitarget strategy for Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2807.

Eisenbrand, G.; Pool-Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B. J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, S.; Lhuguenot, J. C.; Pieters, R.; Kleiner, J. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 193.

Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. Jr., Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.

Esler, W. P.; Kimberly, W. T.; Ostaszewski, B. L.; Ye, W.; Diehl, T. S.; Selkoe, D. J.; Wolfe, M. S. Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma -secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 2720.

Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; Di Pardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, S. L.; Lotti, V. J.; Cerino, D. J.; Chen, T. B. P. J. K.; Kunkel, K. A.; Springer, J. P.; Hirshfield, J. Methods for Drug Discovery: Development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235.

Fan, L.Y.; Chiu, M. J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol. Taiwan* **2010**, *19*, 228.

Fleisher, A. S.; Raman, R.; Siemers, E. R.; Becerra, L.; Clark, C. M.; Dean, R. A.; Farlow, M. R.; Galvin, J. E.; Peskind, E. R.; Quinn, J. F.; Sherzai, A.; Sowell, B. B.; Aisen, P. S.; Thal, L. J. Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a gamma-secretase inhibitor in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **2008**, *65*, 1031.

Forloni, G.; Colombo, L.; Girola, L.; Tagliavini, F.; Salmona, M. Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett.* **2001**, *487*, 404.

Froede, H. C.; Wilson, I. B. Direct determination of acetyl-enzyme intermediate in the acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylcholine and acetylthiocholine. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 11010.

Fuster-Matanzo, A.; Llorens-Martín, M.; Hernández, F.; Avila, J. Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators Inflamm.* **2013**, *2013*, 260925.

Gackowski, D.; Rozalski, R.; Siomek, A.; Dziaman, T.; Nicpon, K.; Klimarczyk, M.; Araszkiwicz, A.; Olinski, R. Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia. *J. Neurol. Sci.* **2008**, *266*, 57.

Gauthier, S.; Aisen, P. S.; Ferris, S. H.; Saumier, D.; Duong, A.; Haine, D.; Garceau, D.; Suhy, J.; Oh, J.; Lau, W.; Sampalis, J. Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: exploratory analyses of the MRI sub-group of the Alphase study. *J. Nutr. Health Aging.* **2009**, *13*, 550.

Geldenhuys, W. J.; Van der Schyf, C. J. Designing drugs with multi-target activity: the next step in the treatment of neurodegenerative disorders. *Expert Opin. Drug Discov.* **2013**, *8*, 115.

Gibson, G.E.; Huang, H. M. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2005**, *26*, 575.

Glenner, G.G.; Wong, C.W.; Quaranta, V.; Eanes, ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl. Pathol.* **1984**, *2*, 357.

Gold, M.; Alderton, C.; Zvartau-Hind, M.; Egginton, S.; Saunders, A. M.; Irizarry, M.; Craft, S.; Landreth, G.; Linnamägi, U.; Sawchak, S. Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2010**, *30*, 131.

Graeber, M. B.; Li, W.; Rodriguez, M. L. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 3798.

Greenwood, J. R.; Vaccarella, G.; Capper, H. R.; Mewett, K. N.; Allan, R. D.; Johnston, G. A. R. Theoretical studies on the free-radical bromination of methyl-pyridazines in the synthesis of novel heterocyclic analogues of neurotransmitters. *J. Mol. Struct. Theochem.* **1996**, *368*, 235.

Groenning, M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status. *Chem. Biol.* **2010**, *3*, 1.

Gu, H.; Long, D.; Song, C.; Li, X. Recombinant human NGF-loaded microspheres promote survival of basal forebrain cholinergic neurons and improve memory impairments of spatial learning in the rat model of Alzheimer's disease with fimbria-fornix lesion. *Neurosci. Lett.* **2009**, *453*, 204.

Guzmán-Martínez, L.; Farías, G. A.; Maccioni, R. B. Tau Oligomers as Potential Targets for Alzheimer's Diagnosis and Novel Drugs. *Front. Neurol.* **2013**, *4*, 167.

Hadden, M. K.; Hill, S. A.; Davenport, J.; Matts, R. L.; Blagg, B. S. Synthesis and evaluation of Hsp90 inhibitors that contain the 1,4-naphthoquinone scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 634.

Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* **2001**, *18*, 685.

Han, F.; Shioda, N.; Moriguchi, S.; Yamamoto, Y.; Raie, A. Y.; Yamaguchi, Y.; Hino, M.; Fukunaga, K. Spiro[imidazo[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one (ZSET1446/ST101) treatment rescues olfactory bulbectomy-induced memory impairment by activating Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II and protein kinase C in mouse hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *326*, 127.

Han, X. Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, *2*, 65.

Herrera-Molina, R.; Flores, B.; Orellana, J. A.; von Bernhardt, R. Modulation of interferon-gamma-induced glial cell activation by transforming growth factor beta1: a role for STAT1 and MAPK pathways. *J. Neurochem.* **2012**, *123*, 113.

Hock, C.; Maddalena, A.; Raschig, A.; Müller-Spahn, F.; Eschweiler, G.; Hager, K.; Heuser, I.; Hampel, H.; Müller-Thomsen, T.; Oertel, W.; Wienrich, M.; Signorell, A.; Gonzalez-Agosti, C.; Nitsch, R. M. Treatment with the selective muscarinic m1 agonist talsaclidine decreases cerebrospinal fluid levels of A beta 42 in patients with Alzheimer's disease. *Amyloid* **2003**, *10*, 1.

Hom, R. K.; Gailunas, A. F.; Mamo, S.; Fang, L. Y.; Tung, J. S.; Walker, D. E.; Davis, D.; Thorsett, E. D.; Jewett, N. E.; Moon, J. B.; John, V. Design and synthesis of hydroxyethylene-based peptidomimetic inhibitors of human beta-secretase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 158.

Hopkins, A. L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nature Chem. Biol.* **2008**, *4*, 682.

Hu, W.; Ralay Ranaivo, H.; Craft, J. M.; Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M. Validation of the neuroinflammation cycle as a drug discovery target using integrative chemical biology and lead

compound development with an Alzheimer's disease-related mouse model. *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, *2*, 197.

Huang, Y.; Li, T.; Eatherton, A.; Mitchell, W. L.; Rong, N.; Ye, L.; Yang, X. J.; Jin, S.; Ding, Y.; Zhang, J.; Li, Y.; Wu, Y.; Jin, Y.; Sang, Y.; Cheng, Z.; Browne, E. R.; Harrison, D. C.; Hussain, I.; Wan, Z.; Hall, A.; Lau, L. F.; Matsuoka, Y. Orally bioavailable and brain-penetrant pyridazine and pyridine-derived  $\gamma$ -secretase modulators reduced amyloidogenic A $\beta$  peptides in vivo. *Neuropharmacology* **2013**, *70*, 278.

Huy, P. D.; Yu, Y. C.; Ngo, S. T.; Thao, T. V.; Chen, C. P.; Li, M. S.; Chen, Y. C. In silico and in vitro characterization of anti-amyloidogenic activity of vitamin K3 analogues for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1830*, 2960.

Iqbal, F.; Ellwood, R.; Mortensen, M.; Smart, T. G.; Baker, J. R. Synthesis and evaluation of highly potent GABA(A) receptor antagonists based on gabazine (SR-95531). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4252.

Jacobs, A.H.; Tavitian, B. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **2012**, *32*, 1393.

Jerome, K. D.; Hepperle, M. E.; Walker, J. K.; Xing, L.; Devraj, R. V.; Benson, A. G.; Baldus, J. E.; Selness, S. R. Discovery of 5-substituted-N-arylpyridazinones as inhibitors of p38 MAP kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3146.

Jiménez-Aliaga, K.; Bermejo-Bescós, P.; Benedí, J.; Martín-Aragón, S. Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APPswe cells. *Life Sci.* **2011**, *89*, 939.

Jin, Y. R.; Cho, M. R.; Ryu, Ch. K.; Chung, J. H.; Yuk, D. Y.; Hong, J. T.; Lee, K. S.; Lee, J. J.; Lee, M. L.; Lim, Y.; Yun, Y. P. Antiplatelet activity of J78 (2-chloro-3-[2'-bromo-4'-fluoro-phenyl]-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone), an antithrombotic agent, is mediated by thromboxane (TX) A2 receptor blockade with TXA2 synthase inhibition and suppression of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 214.

Josey, B. J.; Inks, E. S.; Wen, X.; Chou, C. J. Structure-activity relationship study of vitamin k derivatives yields highly potent neuroprotective agents. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1007.

Jurisch-Yaksi, N.; Sannerud, R.; Annaert, W. A fast growing spectrum of biological functions of  $\gamma$ -secretase in development and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 2815.

Kabysheva, M. S.; Storozhevykh, T. P.; Pinelis, V. G.; Bunik, V. I. Synthetic regulators of the 2-oxoglutarate oxidative decarboxylation alleviate the glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 1531.

Kandiah, N.; Feldman, H. H. Therapeutic potential of statins in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **2009**, *283*, 230.

- Kelly, T. R.; Parekh, N. D.; Trachtenberg, E. N. Regiochemical control in the Diels-Alder reaction of substituted naphthoquinones. The directing effects of C-6 oxygen substituents. *J. Organic Chem.* **1982**, *47*, 5009.
- Kenche, V. B.; Zawisza, I.; Masters, C. L.; Bal, W.; Barnham, K. J.; Drew, S. C. Mixed ligand Cu<sup>2+</sup> complexes of a model therapeutic with Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptide and monoamine neurotransmitters. *Inorg Chem.* **2013**, *52*, 4303
- Kim, H.; Park, B. S.; Lee, K. G.; Choi, C. Y.; Jang, S. S.; Kim, Y. H.; Lee, S. E. Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8537.
- Kim, S. K.; Park, H. J.; Hong, H. S.; Baik, E. J.; Jung, M. W.; Mook-Jung, I. ERK1/2 is an endogenous negative regulator of the gamma-secretase activity. *FASEB J.* **2006**, *20*, 157.
- Kimura, T.; Hong Nguyen, P. T.; Ho, S. A.; Tran, A. H.; Ono, T.; Nishijo, H. T-817MA, a neurotrophic agent, ameliorates the deficits in adult neurogenesis and spatial memory in rats infused i.c.v. with amyloid-beta peptide. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 451.
- Kirschbauma, F.; Schwassmann, H. O. Ontogeny and evolution of electric organs in gymnotiform fish. *J. Physiol.* **2008**, *102*, 347.
- Kneubühler, S.; Thull, U.; Altomare, C.; Carta, V.; Gaillard, P.; Carrupt, P.-A.; Carotti, A.; Testa, B. Inhibition of monoamine oxidase-B by 5H-indeno[1,2-c]pyridazines: biological activities, quantitative structure-activity relationships (QSARs) and 3DQSARs. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3874.
- Koh, M. T.; Rosenzweig-Lipson, S.; Gallagher, M. Selective GABA(A) alpha5 positive allosteric modulators improve cognitive function in aged rats with memory impairment. *Neuropharmacology* **2013**, *64*, 145.
- Komatsu, H.; Liu, L.; Murray, I.V.; Axelsen, P. H. A mechanistic link between oxidative stress and membrane mediated amyloidogenesis revealed by infrared spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1768*, 1913.
- Kovalenko, T. N.; Ushakova, G. A.; Osadchenko, I.; Skibo, G. G.; Pierzynowski, S. G. The neuroprotective effect of 2-oxoglutarate in the experimental ischemia of hippocampus. *J. Physiol. Pharmacol.* **2011**, *62*, 239.
- Kuklinski, C. Farmacognosia. Editorial Omega, **2000**.
- Kung, H. F. The  $\beta$ -Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease: Seeing Is Believing. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 265.
- Lakowicz, J. R. En: Principles of fluorescence spectroscopy, 2<sup>a</sup> Edición. Editado por Lakowicz, J. R. Kluwer Academic-Plenum Publishers, **1999**.
- Lambert, J. C.; Heath, S.; Even, G.; Campion, D.; Sleegers, K.; Hiltunen, M.; Combarros, O.; Zelenika, D.; Bullido, M. J.; Tavernier, B.; Letenneur, L.; Bettens, K.; Berr, C.; Pasquier, F.; Fiévet, N.; Barberger-Gateau, P.; Engelborghs, S.; De Deyn, P.; Mateo, I.; Franck, A.; Helisalmi, S.;

- Porcellini, E.; Hanon, O. European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, de Pancorbo M. M. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 1094.
- Lamberth, C.; Trah, S.; Wendeborn, S.; Dumeunier, R.; Courbot, M.; Godwin, J.; Schneiter, P. Synthesis and fungicidal activity of tubulin polymerisation promoters. Part 2: pyridazines. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2803.
- Lancôt, K. L.; Hussey, D. F.; Herrmann, N.; Black, S. E.; Rusjan, P. M.; Wilson, A. A.; Houle, S.; Kozloff, N.; Verhoeff, N. P.; Kapur, S. A positron emission tomography study of 5-hydroxytryptamine-1A receptors in Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **2007**, *15*, 888.
- Lannfelt, L.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Batsman, S.; Ames, D.; Harrison, J.; Masters, C. L.; Targum, S.; Bush, A. I.; Murdoch, R.; Wilson, J.; Ritchie, C. W. PBT2-201-EURO study group. Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* **2008**, *7*, 779.
- LeBel, C.P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 227.
- Lee, H. G.; Perry, G.; Moreira, P. I.; Garrett, M. R.; Liu, Q.; Zhu, X.; Takeda, A.; Nunomura, A.; Smith, M. A. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol. Med.* **2005**, *11*, 164.
- León R.; Marco-Contelles, J. A step further towards multitarget drugs for Alzheimer and neuronal vascular diseases: targeting the cholinergic system, amyloid- $\beta$  aggregation and Ca(2+) dyshomeostasis. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 552.
- Li, F.; Tsien, J. Z. Memory and the NMDA receptors. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 302.
- Li, J.; Lin, J. C.; Wang, H.; Peterson, J. W.; Furie, B. C.; Furie, B.; Booth, S. L.; Volpe, J. J.; Rosenberg, P. A. Novel role of vitamin K in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 5816.
- Liang, X.; Wang, Q.; Hand, T.; Wu, L.; Breyer, R. M.; Montine, T. J.; Andreasson, K. Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 10180.
- Lin, P. H.; Pan, W. C.; Kang, Y. W.; Chen, Y. L.; Lin, C. H.; Lee, M. C.; Chou, Y. H.; Nakamura, J. Effects of naphthalene quinonoids on the induction of oxidative DNA damage and cytotoxicity in calf thymus DNA and in human cultured cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1262.
- Lockhart, I. A.; Mitchell, S. A.; Kelly, S. Safety and tolerability of donepezil, rivastigmine and galantamine for patients with Alzheimer's disease: systematic review of the 'real-world' evidence. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2009**, *28*, 389.

López-Diazguerrero, N. E.; González Puertos, V. Y.; Hernández-Bautista, R. J.; Alarcón-Aguilar, A.; Luna-López, A.; Königsberg Fainstein, M. Hormesis: What doesn't kill you makes you stronger. *Gac. Med. Mex.* **2013**, *149*, 438.

Lorenzo Fernández, P.; Lorenzo-Velázquez, B.; Moreno González, A.; Lizasoain Hernández, I.; Leza Cerro, J. C.; Moro Sanchez, M. A.; Portolés Pérez, A. *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª edición. Ed. Médica Panamericana, **2008**.

Lu, J. J.; Bao, J. L.; Wu, G. S.; Xu, W. S.; Huang, M. Q.; Chen, X. P.; Wang, Y. T. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 456.

Lu, L.; Qin, A.; Huang, H.; Zhou, P.; Zhang, C.; Liu, N.; Li, S.; Wen, G.; Zhang, C.; Dong, W.; Wang, X.; Dou, Q. P.; Liu, J. Shikonin extracted from medicinal Chinese herbs exerts anti-inflammatory effect via proteasome inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *11*, 658, 242.

Lu, Y.; Ansar, S.; Michaelis, M. L.; Blagg, B. S. Neuroprotective activity and evaluation of Hsp90 inhibitors in an immortalized neuronal cell line. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1709.

Luheshi, L. M.; Tartaglia, G. G.; Brorsson, A. C.; Pawar, A. P.; Watson, I. E.; Chiti, F.; Vendruscolo, M.; Lomas, D. A.; Dobson, C. M.; Crowther, D. C. Systematic in vivo analysis of the intrinsic determinants of amyloid Beta pathogenicity. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e290.

Ma, Q. L.; Yang, F.; Rosario, E. R.; Ubeda, O. J.; Beech, W.; Gant, D. J.; Chen, P. P.; Hudspeth, B.; Chen, C.; Zhao, Y.; Vinters, H. V.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 9078.

Maeda, Y.; Nakano, M.; Sato, H.; Miyazaki, Y.; Schweiker, S. L.; Smith, J. L.; Truesdale, A. T. 4-Acylamino-6-arylfuro[2,3-d]pyrimidines: potent and selective glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3907.

Maidment I. D.; Fox, C. G.; Boustani, M.; Rodriguez, J.; Brown, R. C.; Katona, C. L. Efficacy of memantine on behavioral and psychological symptoms related to dementia: a systematic meta-analysis. *Ann. Pharmacother.* **2008**, *42*, 32.

Maillard, M. C.; Hom, R. K.; Benson, T. E.; Moon, J. B.; Mamo, S.; Bienkowski, M.; Tomasselli, A. G.; Woods, D. D.; Prince, D. B.; Paddock, D. J.; Emmons, T. L.; Tucker, J. A.; Dappen, M. S.; Brogley, L.; Thorsett, E. D.; Jewett, N.; Sinha, S.; John, V. Design, synthesis, and crystal structure of hydroxyethyl secondary amine-based peptidomimetic inhibitors of human beta-secretase. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 776.

Malinka, W.; Redzicka, A.; Jastrzębska-Więsek, M.; Filipek, B.; Dybała, M.; Karczmarzyk, Z.; Urbańczyk-Lipkowska, Z.; Kalicki, P. Derivatives of pyrrolo[3,4-d]pyridazinone, a new class of analgesic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4992.

Mandal, M.; Zhu, Z.; Cumming, J. N.; Liu, X.; Strickland, C.; Mazzola, R. D.; Caldwell, J. P.; Leach, P.; Grzelak, M.; Hyde, L.; Zhang, Q.; Terracina, G.; Zhang, L.; Chen, X.; Kuvelkar, R.; Kennedy, M.

- E.; Favreau, L.; Cox, K.; Orth, P.; Buevich, A.; Voigt, J.; Wang, H.; Kazakevich, I.; McKittrick, B. A.; Greenlee, W.; Parker, E. M.; Stamford, A. W. Design and validation of bicyclic iminopyrimidinones as beta amyloid cleaving enzyme-1 (BACE1) inhibitors: conformational constraint to favor a bioactive conformation. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9331.
- Matsuda, T.; Aoki, T.; Koshi, T.; Ohkuchi, M.; Shigyo, H. Synthesis and bioactivities of novel 5,6-bis(4-methoxyphenyl)-2H-pyridazin-3-one derivatives: inhibitors of interleukin-1 beta (IL-1beta) production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2373.
- Matsuda, T.; Aoki, T.; Ohgiya, T.; Koshi, T.; Ohkuchi, M.; Shigyo, H. Synthesis and bioactivities of novel pyridazine derivatives: inhibitors of interleukin-1 beta (IL-1beta) production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2369.
- Matsuya, T.; Takamatsu, H.; Murakami, Y.; Noda, A.; Ichise, R.; Awaga, Y.; Nishimura, S. Synthesis and evaluation of [11C]FR194921 as a nonxanthine-type PET tracer for adenosine A1 receptors in the brain. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 837.
- Maugel, N.; Snider, B. B. Efficient synthesis of the tetracyclic aminoquinone moiety of marmycin A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4926.
- McConlogue, L.; Buttini, M.; Anderson, J. P.; Brigham, E. F.; Chen, K. S.; Freedman, S. B.; Games, D.; Johnson-Wood, K.; Lee, M.; Zeller, M.; Liu, W.; Motter, R.; Sinha, S. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J Biol Chem.* **2007**, *282*, 26326.
- McGeer, E. G.; McGeer, P. L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *19*, 355.
- McGeer, P.L.; McGeer, E. G. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol. Aging* **2007**, *28*, 639.
- McGuinness, B.; Craig, D.; Bullock, R.; Passmore, P. Statins for the prevention of dementia. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2009**, (2), CD003160.
- McLaurin, J.; Kierstead, M. E.; Brown, M. E.; Hawkes, C. A.; Lambermon, M. H.; Phinney, A. L.; Darabie, A. A.; Cousins, J. E.; French, J. E.; Lan, M. F.; Chen, F.; Wong, S. S.; Mount, H. T.; Fraser, P. E.; Westaway, D.; St George-Hyslop, P. Cyclohexanehexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 801.
- Mei, Z.; Situ, B.; Tan, X.; Zheng, S.; Zhang, F.; Yan, P.; Liu, P. Cryptotanshinione upregulates alpha-secretase by activation PI3K pathway in cortical neurons. *Brain Res.* **2010**, *1348*, 165.
- Miranda, K. M.; Espey, M. G.; Wink, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, **2001**, *5*, 62.
- Molina, M. T.; Navarro, C.; Moreno, A.; Csaky, A. G. Arylation of benzo-fused 1,4-quinones by the addition of boronic acids under dicationic Pd(II)-catalysis. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4938.

- Moon, D. O.; Choi, Y. H.; Kim, N. D.; Park, Y. M.; Kim, G. Y. Anti-inflammatory effects of beta-lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Int. Immunopharmacol.* **2007**, *7*, 506.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55
- Mount, C.; Downton C. Alzheimer disease: progress or profit? *Nat. Med.* **2006**, *12*, 780.
- Murakami, A. Modulation of protein quality control systems by food phytochemicals. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2013**, *52*, 215.
- Nakagami, Y.; Nishimura, S.; Murasugi, T.; Kaneko, I.; Meguro, M.; Marumoto, S.; Kogen, H.; Koyama, K.; Oda, T. A novel beta-sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid beta-induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *137*, 676.
- Nam, K. N.; Son, M. S.; Park, J. H.; Lee, E. H. Shikonins attenuate microglial inflammatory responses by inhibition of ERK, Akt, and NF-kappaB: neuroprotective implications. *Neuropharmacology* **2008**, *55*, 819.
- Necula, M.; Kayed, R.; Milton, S.; Glabe, C. G. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10311.
- Ni, R.; Marutle, A.; Nordberg, A. J. Modulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid- $\beta$  interactions in Alzheimer's disease brain. *Alzheimers Dis.* **2013**, *33*, 841.
- Nygaard, H. B. Current and emerging therapies for Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* **2013**, *35*, 1480.
- Ochiai, K.; Takita, S.; Eiraku, T.; Kojima, A.; Iwase, K.; Kishi, T.; Fukuchi, K.; Yasue, T.; Adams, D. R.; Allcock, R. W.; Jiang, Z.; Kohno, Y. Phosphodiesterase inhibitors. Part 3: Design, synthesis and structure-activity relationships of dual PDE3/4-inhibitory fused bicyclic heteroaromatic-dihydropyridazinones with anti-inflammatory and bronchodilatory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1644.
- Oddo, S.; Caccamo, A.; Smith, I.F.; Green, K.N.; LaFerla, F. M. A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A $\beta$ . *Am. J. Pathol.* **2006**, *168*, 184.
- Oehlrich, D.; Berthelot, D. J.; Gijssen, H. J.  $\gamma$ -Secretase modulators as potential disease modifying anti-Alzheimer's drugs. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 669.
- O'Hare, E.; Scopes, D. I.; Treherne, J. M.; Norwood, K.; Spanswick, D.; Kim, E. M. RS-0406 arrests amyloid-beta oligomer-induced behavioural deterioration in vivo. *Behav. Brain Res.* **2010**, *210*, 32.
- Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. Preformed beta-amyloid fibrils are destabilized by coenzyme Q10 in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 111.
- Østby, O. B.; Gundersen, L. L.; Rise, F.; Antonsen, O.; Fosnes, K.; Larsen, V.; Bast, A.; Custers, I.; Haenen, G. R. Synthesis of 5-substituted pyrrolo[1,2-b]pyridazines with antioxidant properties. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2001**, *334*, 21.

Ostrowitzki, S.; Deptula, D.; Thurfjell, L.; Barkhof, F.; Bohrmann, B.; Brooks, D. J.; Klunk, W. E.; Ashford, E.; Yoo, K.; Xu, Z. X.; Loetscher, H.; Santarelli, L. Mechanism of amyloid removal in patients with Alzheimer disease treated with gantenerumab. *Arch. Neurol.* **2012**, *69*, 198.

Padhye, S.; Dandawate, P.; Yusufi, M.; Ahmad, A.; Sarkar, F. H. Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 1131.

Park, B. M.; Hong, S. S.; Lee, C.; Lee, M. S.; Kang, S. J.; Shin, Y. S.; Jung, J. K.; Hong, J. T.; Kim, Y.; Lee, M. K.; Hwang, B. Y. Naphthoquinones from *Catalpa ovata* and their inhibitory effects on the production of nitric oxide. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 381.

Peters, I.; Igbavboa, U.; Schütt, T.; Haidari, S.; Hartig, U.; Rosello, X.; Böttner, S.; Copanaki, E.; Deller, T.; Kögel, D.; Wood, W. G.; Müller, W. E.; Eckert, G. P. The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 964.

Pike, C. J.; Walencewicz-Wasserman, A. J.; Kosmoski, J.; Cribbs, D. H.; Glabe, C. G.; Cotman, C. W. Structure-activity analyses of  $\beta$ -amyloid peptides: contributions of the  $\beta$  25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* **1995**, *64*, 253.

Plastino, M.; Fava, A.; Pirritano, D.; Cotronei, P.; Sacco, N.; Sperli, T.; Spanò, A.; Gallo, D.; Mungari, P.; Consoli, D.; Bosco, D. Effects of insulinic therapy on cognitive impairment in patients with Alzheimer disease and diabetes mellitus type-2. *J. Neurol. Sci.* **2010**, *288*, 112.

Postina, R. J. Activation of  $\alpha$ -secretase cleavage. *Neurochem.* **2012**, *120*, 46.

Purohit, A.; Radeke, H.; Azure, M.; Hanson, K.; Benetti, R.; Su, F.; Yalamanchili, P.; Yu, M.; Hayes, M.; Guaraldi, M.; Kagan, M.; Robinson, S.; Casebier, D. Synthesis and biological evaluation of pyridazinone analogues as potential cardiac positron emission tomography tracers. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2954.

Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 329.

Ralay Ranaivo, H.; Craft, J. M.; Hu, W.; Guo, L.; Wing, L. K.; Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M. Glia as a therapeutic target: selective suppression of human amyloid-beta-induced upregulation of brain proinflammatory cytokine production attenuates neurodegeneration. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 662.

Rampa, A.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Bisi, A. Hybrid-based multi-target ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2716.

Ransohoff, R. M. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, S152.

Risner, M. E.; Saunders, A. M.; Altman, J. F.; Ormandy, G. C.; Craft, S.; Foley, I. M.; Zvartau-Hind, M. E.; Hosford, D. A.; Roses, A. D. Rosiglitazone in Alzheimer's Disease Study Group. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J.* **2006**, *6*, 246.

Roscales, S. Tesis Doctoral. Nuevos aspectos de las reacciones de los ácidos borónicos: de la catálisis metálica a la catálisis orgánica. Enero 2015, UCM.

Roscales, S.; Ortega, A.; Martín-Aragón, S.; Bermejo-Bescós, P.; Csáky, A. G. PdII-Catalyzed Conjugate Addition of Boronic Acids to Ketoglutaconic Esters toward the Synthesis of Functionalized Pyridazin-3(2H)-ones with Neuroprotective Activity *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 5398.

Rubio-Perez, J. M.; Morillas-Ruiz, J. M. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*, **2012**, 2012, 756357.

Salehi, A.; Delcroix, J. D.; Belichenko, P. V.; Zhan, K.; Wu, C.; Valletta, J. S.; Takimoto-Kimura, R.; Kleschevnikov, A. M.; Sambamurti, K.; Chung, P. P.; Xia, W.; Villar, A.; Campbell, W. A.; Kulnane, L. S.; Nixon, R. A.; Lamb, B. T.; Epstein, C. J.; Stokin, G. B.; Goldstein, L. S.; Mobley, W. C. Increased APP expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron* **2006**, 51, 29.

Salloway, S.; Sperling, R.; Gilman, S.; Fox, N. C.; Blennow, K.; Raskind, M.; Sabbagh, M.; Honig, L. S.; Doody, R.; van Dyck, C. H.; Mulnard, R.; Barakos, J.; Gregg, K. M.; Liu, E.; Lieberburg, I.; Schenk, D.; Black, R.; Grundman, M. Bapineuzumab 201 Clinical Trial Investigators. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* **2009**, 73, 2061.

Salomone, S.; Caraci, F.; Leggio, G.M.; Fedotova, J.; Drago, F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, 73, 504.

Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandeventer, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **1999**, 400, 173.

Scherzer-Attali, R.; Convertino, M.; Pellarin, R.; Gazit, E.; Segal, D.; Caffisch, A. Methylations of tryptophan-modified naphthoquinone affect its inhibitory potential toward A $\beta$  aggregation. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 1780.

Scherzer-Attali, R.; Farfara, D.; Cooper, I.; Levin, A.; Ben-Romano, T.; Trudler, D.; Vientrov, M.; Shaltiel-Karyo, R.; Shalev, D. E.; Segev-Amzaleg, N.; Gazit, E.; Segal, D.; Frenkel, D. Naphthoquinone-tryptophan reduces neurotoxic A $\beta$ \*56 levels and improves cognition in Alzheimer's disease animal model. *Neurobiol. Dis.* **2012**, 46, 663.

Scopes, D. I.; O'Hare, E.; Jeggo, R.; Whyment, A. D.; Spanswick, D.; Kim, E. M.; Gannon, J.; Amijee, H.; Treherne, J. M. A $\beta$  oligomer toxicity inhibitor protects memory in models of synaptic toxicity. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, 167, 383.

Sennvik, K.; Fastbom, J.; Blomberg, M.; Wahlund, L. O.; Winblad, B.; Benedikz, E. Levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* **2000**, 278, 169.

- Sever, P. S.; Chang, C. L.; Gupta, A. K.; Whitehouse, A.; Poulter, N. R.; ASCOT Investigators. The Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial: 11-year mortality follow-up of the lipid-lowering arm in the U.K. *Eur. Heart J.* **2011**, *32*, 2525.
- Shearman, M. S.; Beher, D.; Clarke, E. E.; Lewis, H. D.; Harrison, T.; Hunt, P.; Nadin, A.; Smith, A. L.; Stevenson, G.; Castro, J. L. L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8698.
- Shimizu, H.; Tanaka, S.; Toki, T.; Yasumatsu, I.; Akimoto, T.; Morishita, K.; Yamasaki, T.; Yasukochi, T.; Iimura, S. Discovery of imidazo[1,2-b]pyridazine derivatives as IKKbeta inhibitors. Part 1: Hit-to-lead study and structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5113.
- Shimizu, H.; Yamasaki, T.; Yoneda, Y.; Muro, F.; Hamada, T.; Yasukochi, T.; Tanaka, S.; Toki, T.; Yokoyama, M.; Morishita, K.; Iimura, S. Discovery of imidazo[1,2-b]pyridazines as IKKbeta inhibitors. Part 3: exploration of effective compounds in arthritis models. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4550
- Shimizu, H.; Yasumatsu, I.; Hamada, T.; Yoneda, Y.; Yamasaki, T.; Tanaka, S.; Toki, T.; Yokoyama, M.; Morishita, K.; Iimura, S. Discovery of imidazo[1,2-b]pyridazines as IKKbeta inhibitors. Part 2: improvement of potency in vitro and in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 904.
- Shyamala, R.; Vijayashree, R.; Rao, K. R.; Ruckmani, A.; Vijayaraghavan, R.; Bhattacharya, R.; Mathangi, D. C. Effect of alpha-ketoglutarate on neurobehavioral, neurochemical and oxidative changes caused by sub-chronic cyanide poisoning in rats. *Neurochem. Res.* **2011**, *36*, 540.
- Siegel, S.J.; Bieschke, J.; Powers, E.T.; Kelly, J. W. The oxidative stress metabolite 4-hydroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. *Biochemistry* **2007**, *46*, 1503.
- Sigurdsson, E.M. Tau-focused immunotherapy for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* **2009**, *6*, 446.
- Simon, S.; Massoulié, J. Cloning and Expression of Acetylcholinesterase from Electrophorus. Splicing pattern of the 3' exons in vivo and in transfected mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 33045.
- Sodhi, R. K.; Singh, N.; Jaggi, A. S. Neuroprotective mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor agonists in Alzheimer's disease. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2011**, *384*, 115.
- Son, T. G.; Camandola, S.; Arumugam, T. V.; Cutler, R. G.; Telljohann, R. S.; Mughal, M. R.; Moore, T. A.; Luo, W.; Yu, Q. S.; Johnson, D. A.; Johnson, J. A.; Greig, N. H.; Mattson, M. P. Plumbagin, a novel Nrf2/ARE activator, protects against cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **2010**, *112*, 1316
- Stine, W. B. Jr.; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11612.

- Sultana, R.; Perluigi, M.; Butterfield, D. A. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid. Redox Signal* **2006**, *8*, 2021.
- Sun, X.T., Jin, L.; Ling, P. X. Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug Discov. Ther.* **2012**, *6*, 285.
- Sundriyal, S.; Viswanad, B.; Ramarao, P.; Chakraborti, A. K.; Bharatam, P. V. New PPARgamma ligands based on barbituric acid: virtual screening, synthesis and receptor binding studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4959.
- Swomley, A. M.; Förster, S.; Keeney, J. T.; Triplett, J.; Zhang, Z.; Sultana, R.; Butterfield, D. A. Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, doi:10.1016/j.bbadis.2013.09.015.
- Tamagno, E.; Guglielmotto, M; Aragno, M.; Borghi, R.; Autelli, R.; Giliberto, L.; Muraca, G.; Danni, O.; Zhu, X.; Smith, M. A.; Perry, G.; Jo, D. G.; Mattson, M. P.; Tabaton, M. Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 683.
- Tao, M.; Aimone, L. D.; Gruner, J. A.; Mathiasen, J. R.; Huang, Z.; Lyons, J.; Raddatz, R.; Hudkins, R. L. Synthesis and structure-activity relationship of 5-pyridazin-3-one phenoxy piperidines as potent, selective histamine H(3) receptor inverse agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1073.
- Tao, M.; Raddatz, R.; Aimone, L. D.; Hudkins, R. L. Synthesis and structure-activity relationships of 4,5-fused pyridazinones as histamine H3 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6126.
- Tauraitė, D.; Razumas, V.; Butkus, E. Lipophilic 1,4-naphthoquinone derivatives: synthesis and redox properties in solution and entrapped in the aqueous cubic liquid-crystalline phase of monoolein. *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *159*, 45.
- Tavares, F. X.; Boucheron, J. A.; Dickerson, S. H.; Griffin, R. J.; Preugschat, F.; Thomson, S. A.; Wang, T. Y.; Zhou, H. Q. N-Phenyl-4-pyrazolo[1,5-b]pyridazin-3-ylpyrimidin-2-amines as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase 3 with good cellular efficacy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4716.
- Tietze, L. F.; Singidi, R. R.; Gericke, K. M. Total synthesis of the proposed structure of the anthracycline metabolite delta-indomycinone. *Chem.-Eur. J.* **2007**, *13*, 9939.
- Trippier, B. C.; Labby, K. J.; Hawker, D. D.; Mataka, J. J.; Silverman, R. B. Target- and mechanism-based therapeutics for neurodegenerative diseases: Strength in numbers. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3121.
- Trofimova, L.; Lovat, M.; Groznaya, A.; Efimova, E.; Dunaeva, T.; Maslova, M.; Graf, A.; Bunik, V. Behavioral impact of the regulation of the brain 2-oxoglutarate dehydrogenase complex by synthetic phosphonate analog of 2-oxoglutarate: implications into the role of the complex in neurodegenerative diseases. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2010**, *2010*, 749061.

- Tynebor, R. M.; Chen, M. H.; Natarajan, S. R.; O'Neill, E. A.; Thompson, J. E.; Fitzgerald, C. E.; O'Keefe, S. J.; Doherty, J. B. Synthesis and biological activity of pyridopyridazin-6-one p38 MAP kinase inhibitors. Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 411.
- Uno, Y.; Iwashita, H.; Tsukamoto, T.; Uchiyama, N.; Kawamoto, T.; Kori, M.; Nakanishi, A. Efficacy of a novel, orally active GSK-3 inhibitor 6-Methyl-N-[3-[[3-(1-methylethoxy)propyl]carbamoyl]-1H-pyrazol-4-yl]pyridine-3-carboxamide in tau transgenic mice. *Brain Res.* **2009**, *1296*, 148.
- Valera, E.; Dargusch, R.; Maher, P. A.; Schubert, D. Modulation of 5-lipoxygenase in proteotoxicity and Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 10512.
- Van, T. N.; De Kimpe, N. Synthesis of 6H-naphtho[2,3-c]chromene-7,12-diones via palladium-catalyzed intramolecular cyclization of 2-bromo-3-aryloxymethyl-1,4-naphthoquinones. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5941.
- Vanhanen, M.; Koivisto, K.; Moilanen, L.; Helkala, E. L.; Hänninen, T.; Soininen, H.; Kervinen, K.; Kesäniemi, Y. A.; Laakso, M.; Kuusisto, J. Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurology* **2006**, *67*, 843.
- Vassar, R.; Bennett, B.; Babu-Khan, S.; Rogers, G.; Citron, M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **1999**, *286*, 735.
- Velentza, A. V.; Wainwright, M. S.; Zasadzki, M.; Mirzoeva, S.; Schumacher, A. M.; Haiech, J.; Focia, P. J.; Egli, M.; Watterson, D. M. An aminopyridazine-based inhibitor of a pro-apoptotic protein kinase attenuates hypoxia-ischemia induced acute brain injury. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3465.
- Velliquette, R. A.; O'Connor, T.; Vassar, R. Energy inhibition elevates beta-secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 10874.
- Verhoest, P. R.; Fonseca, K. R.; Hou, X.; Proulx-Lafrance, C.; Corman, M.; Helal, C. J.; Claffey, M. M.; Tuttle, J. B.; Coffman, K. J.; Liu, S.; Nelson, F.; Kleiman, R. J.; Menniti, F. S.; Schmidt, C. J.; Vanase-Frawley, M.; Liras, S. Design and discovery of 6-[(3S,4S)-4-methyl-1-(pyrimidin-2-ylmethyl)pyrrolidin-3-yl]-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one (PF-04447943), a selective brain penetrant PDE9A inhibitor for the treatment of cognitive disorders. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9045.
- Viayna, E.; Sabate, R.; Muñoz-Torrero, D. Dual inhibitors of  $\beta$ -amyloid aggregation and acetylcholinesterase as multi-target anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1820.
- Villarroya, M.; García, A. G.; Marco, J. L. New classes of AChE inhibitors with additional pharmacological effects of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3177.

- Voropai, E. S.; Samtsov, M. P.; Kaplevskii, K. N.; Maskevich, A. A.; Stepuro, V. I.; Povarova, O. I.; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K.; Fink, A. L.; Uverskii, V. N. Spectral Properties of Thioflavin T and Its Complexes with Amyloid Fibrils. *J. Appl. Spectr. (Rus)* **2003**, *70*, 868.
- Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1172.
- Wan, Z. H.; Hall, A.; Jin, Y.; Xiang, J. N.; Yang, E.; Eatherton, A.; Smith, B.; Yang, G.; Yu, H. H.; Wang, J.; Ye, L.; Lau, L. F.; Yang, T.; Mitchell, W.; Cai, W.; Zhang, X. M.; Sang, Y. X.; Wang, Y. H.; Tong, Z. L.; Cheng, Z. Q.; Hussain, I.; Elliott, J. D.; Matsuoka, Y. Pyridazine-derived gamma-secretase modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2011**, *21*, 4016.
- Wang, Y. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 276.
- Watterson, D. M.; Velentza, A. V.; Zasadzki, M.; Craft, J. M.; Haiech, J.; Van Eldik, L. J. Discovery of a new class of synthetic protein kinase inhibitors that suppress selective aspects of glial activation and protect against beta-amyloid induced injury: a foundation for future medicinal chemistry efforts focused on targeting Alzheimer's disease progression. *J. Mol. Neurosci.* **2003**, *20*, 411
- Watterson, S. H.; Xiao, Z.; Dodd, D. S.; Tortolani, D. R.; Vaccaro, W.; Potin, D.; Launay, M.; Stetsko, D. K.; Skala, S.; Davis, P. M.; Lee, D.; Yang, X.; McIntyre, K. W.; Balimane, P.; Patel, K.; Yang, Z.; Marathe, P.; Kadiyala, P.; Tebben, A. J.; Sheriff, S.; Chang, C. Y. Y.; Ziemba, T.; Zhang, H.; Chen, B. -C.; DelMonte, A. J.; Aranibar, N.; McKinnon, M.; Barrish, J. C.; Suchard, S. J.; G. Dhar, T. G. M. Small Molecule Antagonist of Leukocyte Function Associated Antigen-1 (LFA-1): Structure-Activity Relationships Leading to the Identification of 6-((5S,9R)-9-(4-Cyanophenyl)-3-(3,5-dichlorophenyl)-1-methyl-2,4-dioxo-1,3,7-triazaspiro[4.4]nonan-7-yl)nicotinic Acid (BMS-688521). *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3814.
- Weinreb, O.; Amit, T.; Bar-Am, O.; Youdim, M. B. Ladostigil: a novel multimodal neuroprotective drug with cholinesterase and brain-selective monoamine oxidase inhibitory activities for Alzheimer's disease treatment. *Curr. Drug Targets.* **2012**, *13*, 483.
- Wiesmann, M.; Jansen, D.; Zerbi, V.; Broersen, L. M.; Garthe, A.; Kiliaan, A. J. Improved spatial learning strategy and memory in aged Alzheimer A $\beta$ PPswe/PS1dE9 mice on a multi-nutrient diet. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *37*, 233.
- Williams, P.; Sorribas, A.; Howes, M.-J. R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 48.
- Wyss-Coray, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.* **2006**, *12*, 1005.
- Xing, W.; Fu, Y.; Shi, Z.; Lu, D.; Zhang, H.; Hu, Y. Discovery of novel 2,6-disubstituted pyridazinone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 95.

Xing, X.; Chang, L. C.; Kong, Q.; Colton, C. K.; Lai, L.; Glicksman, M. A.; Lin, C. L.; Cuny, G. D. Structure-activity relationship study of pyridazine derivatives as glutamate transporter EAAT2 activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5774.

Yamin, G. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87*, 1729.

Yan, R.; Bienkowski, M. J.; Shuck, M. E.; Miao, H.; Tory, M. C.; Pauley, A. M.; Brashier, J. R.; Stratman, N. C.; Mathews, W. R.; Buhl, A. E.; Carter, D. B.; Tomasselli, A. G.; Parodi, L. A.; Heinrikson, R. L.; Gurney, M. E. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* **1999**, *402*, 53.

Yang, X.; Dai, G.; Li, G.; Yang, E. S. Coenzyme Q10 reduces beta-amyloid plaque in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci* **2010**, *41*, 110.

Yuk, D. Y.; Ryu, Ch. K.; Hong, J. T.; Chung, K. H.; Kang, W. S.; Kim, Y.; Yoo, M. K.; Lee, Ch. H.; Yun, Y. P. Antithrombotic and antiplatelet activities of 2-chloro-3-[4-(ethylcarboxy)-phenyl]-amino-1,4-naphthoquinone (NQ12), a newly synthesized 1,4-naphthoquinone derivative. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1001.

Zazpe, A.; Artaiz, I.; Innerarity, A.; del Olmo, E.; Castro, E.; Labeaga, L.; Pazos, A.; Orjales, A. In vitro and in vivo characterization of F-97013-GD, a partial 5-HT<sub>1A</sub> agonist with antipsychotic- and antiparkinsonian-like properties. *Neuropharmacology* **2006**, *51*, 129.

Zhao, X.; Ou, Z.; Grotta, J. C.; Waxham, N.; Aronowski, J. Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity. *Brain Res.* **2006**, *1073-1074*, 460.

Zheng, H.; Fridkin, M.; Youdim, M. B. H. From antioxidant chelators to site-activated multi-target chelators targeting hypoxia inducing factor, beta-amyloid, acetylcholinesterase and monoamine oxidase A/B. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 364.

