

# Búsqueda de fármacos multidiana en el tratamiento del Alzheimer (proyecto teórico).

Rocío Benítez Fernández<sup>a</sup>, Alberto Langtry Yáñez, Celia López Gutiérrez, Belén Ortiz del Castillo, Altea Soto Neira

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. robenitezfdez@gmail.com

**Palabras clave:** Alzheimer; RAGE;  $\beta$ -amiloide;  $\beta$ -secretasa; multidiana; HTS (High Throughput Screening)

## Resumen

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central con etiología idiopática, caracterizada por una pérdida progresiva de la función intelectual. Las repercusiones económicas son muy importantes ya que es un proceso patológico crónico que genera incapacidad laboral, carga física y psíquica de los cuidadores y además requiere atención social y sanitaria [1]. El mecanismo molecular que por el cual se produce la patología del Alzheimer no está completamente esclarecido, aunque sí se sabe que se caracteriza por la formación intracelular de ovillos neurofibrilares (NFTs) de agregados de proteína tau hiperfosforilada en las células del sistema nervioso central y por la deposición extracelular de placas formadas por agregados de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), debido al mal procesamiento por parte de la enzima  $\beta$ -secretasa. Estos agregados junto con la presencia de tejido dañado en el cerebro producen una estimulación de la inflamación crónica, en la que interviene el receptor de membrana RAGE [2]. Puesto que se trata de una enfermedad multifactorial, para la que no existe un tratamiento farmacológico eficaz, solo paliativo, la estrategia que propone este trabajo es la búsqueda de un fármaco multidiana que actúe sobre dos de los componentes más relevantes en el desarrollo de la enfermedad:  $\beta$ -secretasa y el receptor RAGE [3]. De este modo, hipotetizamos que se conseguirá un efecto sinérgico, ya que se frenará el progreso de la enfermedad al reducir la deposición de beta-amiloides y se reducirá la inflamación, mejorando la función cognitiva. Para ello, se plantea la realización de un ensayo HTS, mediante la técnica de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), que permita el cribado sobre una quimioteca, con el fin de encontrar posibles compuestos candidatos a inhibir las dos dianas seleccionadas. Para evitar los posibles efectos adversos, sería necesario realizar diversos ensayos tanto de toxicidad hepática como sistémica, así como establecer una óptima vía de administración y vehiculización.

**Cita:** Benítez Fernández, Rocío; Langtry Yáñez, Alberto; López Gutiérrez, Celia; Ortiz del Castillo, Belén; Soto Neira, Altea (2017) Búsqueda de fármacos multidiana en el tratamiento del Alzheimer (proyecto teórico). *dianas* 6 (2): e20170907. ISSN 1886-8746 [journal.dianas.e20170907](http://journal.dianas.e20170907). URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** © Benítez-Fernández R, Langtry-Yáñez A, López-Gutiérrez C, Ortiz-del-Castillo B, Soto-Neira A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Introducción

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central con etiología idiopática, caracterizada por una pérdida progresiva de la función intelectual: memoria, conocimiento, lenguaje, personalidad, relaciones visión-espacio, etc., debida a la muerte progresiva de neuronas. Además, es una enfermedad para la que no existe un tratamiento farmacológico eficaz, solo paliativo. El Alzheimer comienza lentamente, pero con el tiempo los síntomas empeoran, lo que hace que el enfermo necesite unos cuidados totales. Las repercusiones económicas son muy importantes ya que es un proceso patológico crónico que genera incapacidad laboral, carga física y psíquica de los cuidadores y, además, requiere atención social y sanitaria [1]. El mayor factor de riesgo es la edad, lo que constituye un problema ya que en el último siglo la esperanza de vida de la población se ha duplicado hasta alcanzar los 82 años y además la tasa de natalidad ha disminuido progresivamente previéndose que para el 2049, haya un gran número de población anciana y muy poca población joven [4]. Por este motivo, se proyecta que en 2030 se alcancen los 74.7 millones de enfermos de Alzheimer en todo el mundo [5]. El Alzheimer y otras demencias son por tanto uno de los retos más importante para la salud pública a nivel internacional de cara al futuro [6].

Los estudios epidemiológicos orientados hacia esta enfermedad, han definido algunos factores de riesgo tanto genéticos como no genéticos confirmados por varias investigaciones. El factor de riesgo más característico es la edad, aunque también se ha visto una mayor incidencia en mujeres que en hombres, hecho que se asocia más a su mayor esperanza de vida en comparación con los hombres y a la desaparición de los estrógenos como neuroprotectores. Un factor también importante es el consumo de tabaco, que aumenta el riesgo de padecer estas enfermedades ya que su consumo continuo aumenta el

estrés oxidativo en el cerebro, lo que promueve la aparición de las mismas [7]. Otro factor de riesgo es la obesidad, debido a que el gen asociado a la obesidad (TPO) se expresa en el cerebro y su sobreexpresión conlleva a una disminución del 10% aproximadamente del lóbulo occipital y frontal, lo que produce una disminución de la cognición [8]. La mayoría de los casos asociados a Alzheimer tienen una aparición tardía, desarrollada de manera aleatoria debido al fallo desconocido de las funciones neuronalógicas por el envejecimiento. Sin embargo, se ha localizado una mutación en el gen de la alipoproteína E en el cromosoma 19, implicada en el metabolismo y agregación del péptido  $\beta$ -amiloide. Esta mutación da lugar a diferentes isoformas de la enzima (2, 3 y 4), dependiendo de la cual, la predisposición a padecer la enfermedad es diferente. La isoforma 4 conlleva mayor predisposición mientras que la isoforma 2 parece proteger frente a ella. Actualmente, se sabe que mutaciones en otros genes implicados en el correcto procesamiento del  $\beta$ -amiloide, como CLU, CR1 [9] y genes que codifican para  $\beta$ -secretasas, son también responsables de que se desarrolle la enfermedad [10]. Por otro lado, hay casos documentados de herencia (inferior al 10% de los casos de Alzheimer en la actualidad) debido a mutaciones en los cromosomas 1, 14 o 21 lo que parece indicar que se trata de una enfermedad multifactorial.

### Características y mecanismos moleculares de la enfermedad

El mecanismo molecular por el cual se produce la patología del Alzheimer no está completamente esclarecido, aunque sí se sabe que se caracteriza por la formación intracelular de ovillos neurofibrilares (NFTs) de agregados de proteína tau hiperfosforilada en las células del sistema nervioso central y por la deposición extracelular de placas formadas por agregados de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) [11]. Estos agregados junto con la presencia de tejido dañado en el cerebro producen una estimulación de la inflamación crónica [12].

#### *Ovillos neurofibrilares*

La proteína tau forma parte de una familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), que se expresa principalmente en neuronas. Esta proteína tau participa en el ensamblaje de monómeros de tubulina dentro de los microtúbulos para dar lugar a la red de microtúbulos neuronales, los cuales contribuyen al mantenimiento de la forma celular y sirven como vía de transporte a través de los axones. Se sabe que su actividad está regulada en gran parte por el equilibrio entre la fosforilación y desfosforilación, así como por el número de dominios funcionales de unión a tubulina, localizados en el extremo C-terminal de la proteína. Durante el desarrollo de la enfermedad, se va produciendo una hiperfosforilación de tau causada por el desequilibrio entre quinasas y fosfatasa. La principal quinasa involucrada en las modificaciones de tau y por tanto en degeneración neuronal es la quinasa glucógeno sintetasa 3b (GSK3 b), mientras que la principal fosfatasa es la PP2A [13]. Además de estas marcas histopatológicas, el cerebro de un enfermo de Alzheimer presenta un nivel alto de gliosis reactiva (astrocitos “reactivos” y microglía “activada”), así como de marcadores de inflamación y marcadores de muerte neuronal mediante la señalización a través de la vía NF $\kappa$ B, que da lugar a un aumento de producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , y múltiples factores pro-apoptóticos [14].

### Placas seniles

Las placas seniles se encuentran principalmente en el neocórtex [13] y están formadas por la acumulación de péptidos  $\beta$ -amiloideos dentro del tejido neural, lo que induce una disfunción del tejido, un deterioro cognitivo [15]. Además favorecen la formación de los ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas mediante la sobre-activación de la proteína quinasa GSK3b [16]. Estos péptidos  $\beta$ -amiloideos surgen de la escisión de la proteína precursora amiloide (APP), una proteína transmembrana con papel fisiológico dentro de las células, por lo que en un estado normal no presenta neurotoxicidad [3]. Este precursor puede ser procesado por tres enzimas diferentes:  $\alpha$ -secretasa,  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa. Cuando APP es procesada por  $\alpha$ -secretasa, y secuencialmente por  $\gamma$ -secretasa, se produce una proteína que no forma agregados. Sin embargo, cuando APP es procesada por  $\beta$ -secretasa y secuencialmente por  $\gamma$ -secretasa, se producen varias isoformas del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), las cuales tienden a agregarse y a formar estas placas [17]. Las dos isoformas más comunes son  $A\beta$  1-40 y  $A\beta$  1-42, que se diferencian en el sitio de corte donde actúa la  $\gamma$ -secretasa. La  $A\beta$  1-40 es la más común, pero  $A\beta$  1-42 es la más propensa a la agregación [16]. En la actualidad, estas secretasas se han propuesto como dianas en el desarrollo de terapias contra el Alzheimer, desarrollándose por un lado activadores de  $\alpha$ -secretasa como por ejemplo el Etazolato y NCT0091834, los cuales han llegado a fases clínicas II/III [18]. Por otro lado, se han desarrollado inhibidores de  $\beta$ -secretasa, como Merck's MK-8931 y Astra Zeneca's AZD3293 habiendo llegado a fase clínica III [19] [20]. Otros fueron retirados en la fase II/III debido a problemas de toxicidad, como LY2886721 [21]. Finalmente, otra estrategia fue el uso de inhibidores para  $\gamma$ -secretasa, como por ejemplo Bristol-Myers-Squibb's avagacestat (BMS708163), los cuales fueron retirados principalmente por sus pobres resultados [22].

#### *Inflamación crónica*

La inflamación crónica regulada por sobre-activación de la microglía en el cerebro, acelera el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer [2]. Al ser por tanto uno de los componentes principales responsables de la progresión y cronicidad de la enfermedad, el mantenimiento de la homeostasis de este sistema de

defensa es crucial en la ralentización de la enfermedad. Aunque siempre se pensó que era un proceso secundario a la degeneración, ciertos experimentos recientes han demostrado que algunos mediadores inflamatorios sobre-estimulaban la enzima  $\beta$ -secretasa, responsable del mal procesamiento de la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide (APP), produciendo así una retroalimentación positiva en el ciclo [23]. Estos mediadores pro-inflamatorios liberados por las células de la microglía incluyen: citoquinas, proteínas del complemento, especies reactivas de oxígeno, radicales libres y NO. El mayor responsable de la estimulación de estas células no solo es la neurodegeneración del tejido sino también el propio péptido  $\beta$ -amiloide. Este péptido actúa como ligando de unos receptores de membrana presentes tanto en células de la microglía como también en neuronas [12]. Este es el receptor RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End Products*), miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas de superficie. El receptor RAGE es una proteína transmembrana constituida por cinco dominios estructurales: el dominio citosólico responsable de la transducción de la señal intracelular, el dominio transmembrana que permite el anclaje del receptor a la membrana y, por último, tres dominios extracelulares (C1, C2 y V), dos de ellos son constantes y uno variable, al cual se une el  $\beta$ -amiloide. La unión ligando-receptor provoca la activación de GSK3. Esta proteína presenta una doble función: la fosforilación de tau y la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Este factor de transcripción desencadena procesos apoptóticos en neuronas y la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-5, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ). en células de la microglía. Por último NF- $\kappa$ B también revula la expresión del propio receptor, de forma que existe una retroalimentación positiva en esta vía que provoca la degeneración de forma continua del tejido neuronal. Por lo tanto, el receptor RAGE es un buen candidato a ser explorado como diana terapéutica, ya que su inactivación frenaría la apoptosis neuronal y la inflamación [24]. Uno de los abordajes terapéuticos actuales es la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B donde la curcumina es un ejemplo clásico ya que es un polifenol natural que reduce la respuesta inflamatoria inhibiendo la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B [25]. Sin embargo, debido a sus características farmacocinéticas su aplicación en terapéutica está muy limitada. Actualmente, está en desarrollo otro inhibidor, Gx-50, capaz de reducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias en modelos de ratón con enfermedad de Alzheimer; aunque aún no ha conseguido entrar en fase clínica.

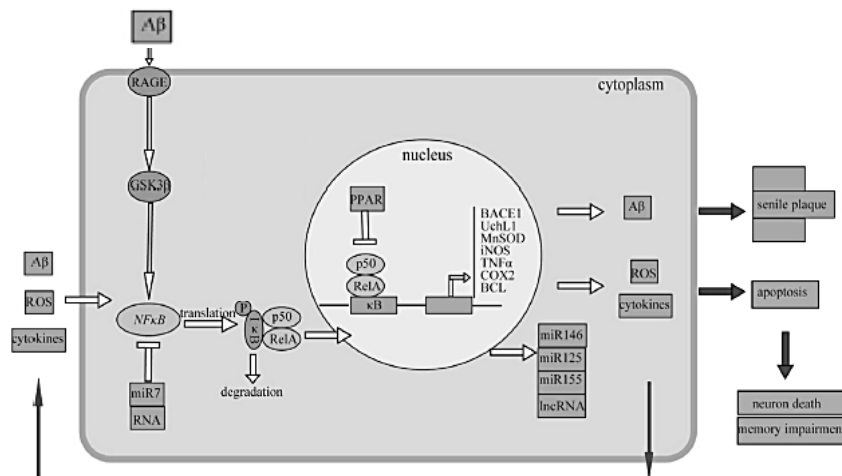


Fig. 1. This diagram shows the different mediators of A $\beta$ , ROS and inflammatory cytokines are involved in AD pathogenesis through NF- $\kappa$ B activation leading to downstream targets changes and form loop to aggravate AD. PI3K/AKT, MAPK and AGE/RAGE/GSK-3 pathways are involved in the process. While miR7 and PPAR repress NF- $\kappa$ B activation.

### Tratamientos actuales

Actualmente son utilizados tratamientos que solamente palian los síntomas de esta enfermedad, pero no frenan su progreso. Algunos de ellos son inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima encargada de la hidrólisis de la acetilcolina (neurotransmisor), lo que aumenta la biodisponibilidad de esta sustancia, permitiendo retrasar el déficit colinérgico provocado por los síntomas del Alzheimer. Entre este tipo de fármacos encontramos el Donepezilo, Rivastigina, Galantamina y Tacrina [26]. También se utilizan fármacos antagonistas de los receptores de glutamato del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), otro neurotransmisor imprescindible para la plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria [27]. El uso de este tipo de fármacos se debe a que en trastornos neurodegenerativos en general se produce un aumento en la concentración de glutamato lo que conlleva una sobreexcitación de estos receptores que produce en último término la muerte celular [28]. Los efectos secundarios son compartidos entre todos ellos tales como náuseas, vómitos, dolor de cabeza, diarreas y pérdida de apetito [29].

### Nuevo abordaje

La naturaleza compleja y multifactorial de la enfermedad del Alzheimer hace que sea difícil encontrar nuevas terapias efectivas y sobretodo que frenen su progreso. Por ello, recientemente la investigación de

nuevas terapias está basada en el diseño de fármacos multidiana (*multi-target-directed ligands*, MTDL). Estos fármacos son moléculas capaces de unirse a varias dianas de forma más eficaz y en comparación con la polifarmacología presentan varias ventajas: evitan la sincronización de perfiles farmacocinéticos, farmacológicos y toxicológicos de varios fármacos, evitan interacciones fármaco-fármaco y simplifican los ensayos clínicos y la posología.

## Materiales y métodos

### Selección de dianas.

Tras la investigación bibliográfica sobre los diferentes mecanismos moleculares y las estrategias que actualmente se utilizan para abordar la enfermedad, se seleccionaron como dianas la enzima  $\beta$ -secretasa y el receptor de membrana RAGE con el objetivo de obtener moléculas candidatas capaces de inhibir ambas. Dicha elección está basada en las siguientes observaciones; en cuanto a la  $\beta$ -secretasa: a) La acumulación de la proteína  $\beta$ -amiloide es uno de los principales eventos patogénicos que ocurren en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Existe un desequilibrio entre la producción y la degradación. b) El APP cuando es procesado por la  $\beta$ -secretasa produce varias isoformas de la proteína  $\beta$ -amiloide las cuales tienden a agregarse. c) La formación del  $\beta$ -amiloide sobreactiva a la proteína GSK3, la cual desencadena una hiperfosforilación de tau responsable de la formación de los ovillos neurofibrilares y, por tanto, la disfunción sináptica. En cuanto al receptor RAGE: a) La inflamación crónica regulada por sobre-activación de la microglía en el cerebro acelera el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. b) El receptor RAGE se encuentra expresado en las células de la microglía; activado gracias a la unión del  $\beta$ -amiloide. c) RAGE es el responsable de la activación de la vía del NF-KB contribuyendo a la liberación de mediadores pro-inflamatorios como citoquinas, especies reactivas de oxígeno, proteínas del complemento, radicales libre y NO. d) RAGE participa esencialmente en el desarrollo embrionario, por lo que su inhibición no tendrá efectos adversos en individuos adultos.

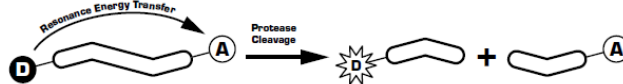
En definitiva, en nuestro proyecto proponemos una aproximación multidiana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, para obtener nuevas moléculas capaces de inhibir a la  $\beta$ -secretasa y al receptor RAGE. De este modo, nuestra hipótesis es que se conseguirá un efecto sinérgico, ya que se frenará el progreso de la enfermedad al reducir la deposición de beta-amiloides y se reducirá la inflamación, mejorando la función cognitiva.

### Ensayos de cribado.

Todos los compuestos disponibles en nuestra quimioteca se usarán para un primer cribado masivo con el objetivo de encontrar compuestos que inhiban la enzima  $\beta$ -secretasa.

### Cribado de alto rendimiento (HTS): ensayo enzimático con $\beta$ -secretasa (FRET).

Para llevarlo a cabo se utilizará el kit para ensayo FRET de  $\beta$ -secretasa (*KIT  $\beta$ -secretasa FRET Assay Kit Red – Panvera*). Este kit se basa en el método transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) por el que se monitoriza el procesamiento del sustrato por la enzima. Para este ensayo, se usa la región de la proteína precursora amiloide (APP) procesada por la  $\beta$ -secretasa (EVNLDAEFK), sintetizada junto con dos fluoróforos, un donador de fluorescencia (derivado de rodamina) y un aceptor de fluorescencia a ambos lados de la secuencia. El donador cede los electrones al aceptor al ser excitado por la luz mediante transferencia de energía de resonancia. El sustrato intacto es débilmente fluorescente y se convierte en altamente fluorescente cuando es procesado por la enzima. Por lo tanto, el incremento en la fluorescencia esta linealmente relacionado con el ratio de proteólisis. Además, este kit cuenta con la proteína beta-secretasa purificada expresada en *Baculovirus*.



### Cribado del receptor RAGE (FRET).

Una vez realizado el primer cribado para identificar los “hits” que presentan un efecto inhibitorio sobre  $\beta$ -secretasa, llevaremos a cabo un segundo cribado para identificar cuáles de ellos presentan también un efecto inhibitorio en la unión del péptido  $\beta$ -amiloide al receptor RAGE. Para ello, emplearemos de nuevo la técnica de FRET, pero en este caso con dos construcciones. Por un lado, tendremos un extracto del dominio extracelular V del receptor RAGE (dominio de unión del péptido  $\beta$  amiloide) unida a una proteína fluorescente azul (CFP) que absorba excitación a 450nm y emita a 475nm. Este extracto fue previamente clonado y purificado en *Baculovirus*. Por otro lado, tendremos un extracto del péptido  $\beta$ -amiloide unido a una proteína fluorescente amarilla (YFP), que emitirá la fluorescencia a 530nm cuando el péptido interactúe con el receptor y la YFP absorba la emisión de la CFP tras incidir a 450nm. Esto se obtiene mediante síntesis química de la secuencia de aminoácidos específica unida a la YFP.

Si tras estos dos cribados no se consiguiera ninguna molécula con capacidad de actuar tanto sobre  $\beta$ -secretasa como sobre la unión de RAGE a su sustrato, podríamos llevar a cabo el segundo cribado con toda nuestra quimioteca para, basándonos en los hits encontrados en ambos cribados, sintetizar una molécula con los dominios de unión a  $\beta$ -secretasa y a RAGE.

#### Medición citoquinas inflamatorias en la línea celular de neuroglioma H4.

Una vez obtenidos aquellos compuestos capaces de unirse a las dos dianas seleccionadas, el siguiente paso sería ver cómo los distintos compuestos actúan *in vitro* sobre las células. Para ello, en primer lugar se medirían los niveles de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ ) en células de neuroglioma H4 tratadas con los distintos compuestos. Aquellos compuestos que reduzcan los niveles de estas citoquinas serán posibles candidatos para inhibir la inflamación en microglía. Para este ensayo, se dispondrá de células H4 en placas de cultivo a las cuales se les tratará durante 24h con una concentración determinada de cada compuesto candidato, así como células control sin tratamiento. Transcurrido este tiempo, se toman los sobrenadantes para proceder al establecimiento de los perfiles de citoquinas inflamatorias. Esta medición se realizaría mediante la técnica ELISA (Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas), la cual se basa en la detección de un determinado antígeno presente en una muestra mediante el uso de dos tipos de anticuerpos; un anticuerpo primario que se une al antígeno y un anticuerpo secundario, enlazado a peroxidasa, que se une al primario y es capaz de generar un producto detectable por un cambio de color. La aparición de estos colorantes permite medir indirectamente el antígeno en la muestra mediante espectrofotometría [30]. Cada muestra a evaluar será incubada en diferentes placas con los distintos anticuerpos primarios contra las citoquinas a medir. Tras la incubación y los lavados correspondientes se incubarán con un anticuerpo secundario. Finalmente se lava e incuba con un cromógeno, parando la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se mide la absorbancia a 450 nm contra filtro de 550 nm [31].

Tras nuestros cribados deberíamos encontrar algún compuesto que inhibiera tanto  $\beta$ -secretasa como el receptor RAGE y disminuya los niveles de citoquinas, dando lugar a uno o varios “hits”. Posteriormente se deberían realizar otros ensayos como medir los niveles de especies reactivas de oxígeno en cultivos celulares (células control y células tratadas con las moléculas “hits” seleccionadas). De este modo se observaría si la inhibición de la unión ligando-receptor reduce el estrés oxidativo a través de la vía NF- $\kappa$ B. Es importante señalar que al añadir alguno de nuestros “hits” seleccionados a un cultivo celular de células neuroglioma puede producirse la muerte de las células por citotoxicidad del fármaco, por lo que habría que descartarlo de inmediato. Una vez obtenidos los “hits” que cumplen todas las características anteriores es necesario realizar ensayos de toxicidad empleando ratones modelo de Alzheimer para poder conocer tanto el índice terapéutico de cada fármaco (curvas dosis-respuesta) como la hepatotoxicidad, lo cual es uno de los efectos secundarios esperados de nuestros “hits”. Así finalmente, seleccionaríamos una serie de candidatos con la menor toxicidad hepática y sistémica; además de aquellos con un IC<sub>50</sub> más bajo.

## Discusión

Nuestro fármaco, al igual que el resto de tratamientos en el mercado, puede dar lugar a efectos secundarios, debido a dos razones principalmente; 1) interacción inespecífica con moléculas no diana por similitud de centros activos o 2) localización no específica de nuestra diana en el organismo. En este caso, tanto  $\beta$ -secretasa como RAGE tienen una mayor expresión en hígado y pulmón respectivamente. No se conoce exactamente la función de RAGE en el pulmón en individuos adultos, pero se ha visto que sus rutas de señalización promueven la proliferación, diferenciación y migración celular en los primeros estadios del desarrollo embrionario, por lo que en individuos adultos no debería presentar efectos adversos [32]. Además, se ha visto en numerosos estudios que la inhibición de RAGE disminuye la inflamación, por lo que protege de patologías como la enfermedad de Crohn o la diabetes. Sin embargo, sería adecuado realizar un estudio más exhaustivo sobre la toxicidad que puede provocar la inhibición de RAGE en células de pulmón para confirmar que no produce efectos secundarios. Por otra parte, los inhibidores de  $\beta$ -secretasa dirigidos a células neuronales si han demostrado tener toxicidad en hígado debido su implicación en el procesamiento de STGal6 ( $\beta$ -galactosidasa  $\alpha$ (2,6) sialiltransferasa), enzima encargada de la resistencia frente al estrés celular producido por radiación [33].

Para resolver estos problemas de especificidad, es de especial importancia encontrar una adecuada vehiculización del fármaco, así como una forma de administración directa al encéfalo. Una de las formas más eficaces son las nanopartículas. Dentro de ellas, los dendrímeros y los liposomas son los vehículos más utilizados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Los dendrímeros son polímeros sintéticos tridimensionales de entre 10-100 nm de diámetro que encapsulan el fármaco en su interior e interactúan con la barrera hematoencefálica (BHE) a través de sus moléculas de superficie. Por otro lado, los liposomas están formados por una bicapa lipídica en cuyo interior se encuentra un núcleo hidrófilo en el que está contenido el fármaco. Estos atraviesan la BHE mediante transcitosis mediada por receptor y una vez dentro liberan su contenido [34]. Por lo tanto, el uso de estos vehículos para la administración del fármaco contra Alzheimer proporcionaría un mayor rendimiento. Por último,

aconsejamos su administración a través del bulbo olfatorio, ya que permite una mayor absorción por las células del cerebro disminuyendo no sólo la toxicidad fuera de este órgano sino también la dosis de fármaco necesaria para el tratamiento. Finalmente el tamaño de las nanopartículas no debe superar los 100 nm para evitar su acumulación en pulmones, lo que podría producir toxicidad [35].

## Referencias

1. Huang, Y., & Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148(6), 1204-1222.
2. Shi, Z. M., Han, Y. W., Han, X. H., Zhang, K., Chang, Y. N., Hu, Z. M., ... & Hong, W. (2016). Upstream regulators and downstream effectors of NF- $\kappa$ B in Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*, 366, 127-134.
3. Chen, M., Wang, J., Jiang, J., Zheng, X., Justice, N. J., Wang, K., ... & Li, H. (2017). APP modulates KCC2 expression and function in hippocampal GABAergic inhibition. *eLife*, 6, e20142.
4. Instituto Nacional de Estadística. (2 junio 2016). Salud: Esperanza de vida. [file:///C:/Users/A/Downloads/4\\_1\\_Esperanza\\_de\\_vida%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/A/Downloads/4_1_Esperanza_de_vida%20(1).pdf) (Consultado 9 de feb. 2017).
5. Prince, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M., Karagiannidou, M. (2016). World Alzheimer Report 2016: Improving healthcare for people living with dementia. *Alzheimer's Disease International (ADI)*.
6. Organización Mundial de la Salud. (2013). Demencia: una prioridad de salud pública. Recuperado de: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/98377/1/9789275318256\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/98377/1/9789275318256_spa.pdf?ua=1).
7. Durazzo, T. C., Mattsson, N., Weiner, M. W., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2014). Smoking and increased Alzheimer's disease risk: a review of potential mechanisms. *Alzheimer's & Dementia*, 10(3), S122-S145.
8. Ho, A. J., Stein, J. L., Hua, X., Lee, S., Hibar, D. P., Leow, A. D., ... & Foroud, T. (2010). A commonly carried allele of the obesity-related FTO gene is associated with reduced brain volume in the healthy elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18), 8404-8409.
9. Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., ... & Jones, N. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 41(10), 1088-1093.
10. BrightFocus Foundation. Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. <http://www.brightfocus.org/espanol/la-enfermedad-de-alzheimer-y-la-demencia/factores-de-riesgo-de-la-enfermedad-de-alzheimer> (Consultado 9 feb. 2017).
11. Bloom, G. S. (2014). Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA neurology*, 71(4), 505-508.
12. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., ... & Finch, C. E. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 21(3), 383-421.
13. MacLeod, R., Hillert, E. K., Cameron, R. T., & Baillie, G. S. (2015). The role and therapeutic targeting of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase in Alzheimer's disease. *Future Science OA*, 1(3).
14. Vallée, A., & Lecarpentier, Y. (2016). Alzheimer disease: crosstalk between the canonical Wnt/beta-catenin pathway and PPARs alpha and gamma. *Frontiers in Neuroscience*, 10.
15. Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(8), a006239.
16. Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *science*, 297(5580), 353-356.
17. O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual review of neuroscience*, 34, 185-204.
18. Vallée, A., & Lecarpentier, Y. (2016). Alzheimer disease: crosstalk between the canonical Wnt/beta-catenin pathway and PPARs alpha and gamma. *Frontiers in Neuroscience*, 10.
19. Charite University (Berlin, Germany). An efficacy and safety trial of MK-8931 in mild to moderate Alzheimer's disease (P07738) (EPOCH). (2016). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01739348> (Consultado 10 feb. 2017).

20. Charite University (Berlin, Germany). An efficacy and safety study of AZD3293 in early Alzheimer's disease (AMARANTH). (2017). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02245737> (Consultado 10 feb. 2017).
21. Charite University (Berlin, Germany). Study of LY2886721 in mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease or mild Alzheimer's disease. (2014). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01561430?term=NCT01561430&rank=1> (Consultado 10 de feb. 2017).
22. Charite University (Berlin, Germany). Sunphenon EGCg (Epigallocatechin- Gallate) in the early stage of Alzheimer's disease. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00951834?term=nct%2000951834&rank=1> (Consultado 10 de feb. 2017).
23. Heneka, M. T., & O'Banion, M. K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology*, 184(1), 69-91.
24. Piras, S., Furfaro, A.L., Domenicotti, C., Traverso, N., Marinari, U.M, Pronzato, M.A., Nitti, M. (2016). RAGE expression and ROS generation in neurons: differentiation versus damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi:10.1155/2016/9348651.
25. Maiti, P., Hall, T. C., Paladugu, L., Kolli, N., Learman, C., Rossignol, J., & Dunbar, G. L. (2016). A comparative study of dietary curcumin, nanocurcumin, and other classical amyloid-binding dyes for labeling and imaging of amyloid plaques in brain tissue of 5 $\times$ -familial Alzheimer's disease mice. *Histochemistry and cell biology*, 146(5), 609-625.
26. Salazar M., Peralta, C., Pastor, F.J. (2012). *Tratado de psicofarmacología: bases y aplicación clínica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana. Pág 261.
27. Rammes G., Mattusch C., Wulff M., Seeser F., Kreuzer M., Zhu K., Deussing JM., Herms J., Parsons C.G. (2017). Involvement of GluN2B subunit containing N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors in mediating the acute and chronic synaptotoxic effects of oligomeric amyloid-beta (A $\beta$ ) in murine models of Alzheimer's disease (AD). *Neuropharmacology*, 3908(17), 30044-8.
28. Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., & Möbius, H. J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333-1341.
29. BrightFocus Foundation. Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. <http://www.brightfocus.org/espanol/la-enfermedad-de-alzheimer-y-la-demencia/factores-de-riesgo-de-la-enfermedad-de-alzheimer> (Consultado 9 feb. 2017).
30. Tarazi, H., Odeh, R. A., Al-Qawasmeh, R., Yousef, I. A., Voelter, W., & Al-Tel, T. H. (2017). Design, synthesis and SAR analysis of potent BACE1 inhibitors: Possible lead drug candidates for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 1213-1224.
31. Marta, R. F., Goette, N. P., & Molinas, F. C. (2006). Niveles de citoquinas megacariocitopoyéticas en pacientes con trombocitemia esencial y su relación con características clínicas y bioquímicas. *Medicina (Buenos Aires)*, 66(6), 540-546.
32. Marinakis, E., Bagkos, G., Piperi, C., Roussou, P., & Diamanti-Kandarakis, E. (2014). Critical role of RAGE in lung physiology and tumorigenesis: a potential target of therapeutic intervention?. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 52(2), 189-200.
33. Lahiri, D. K., Maloney, B., Long, J. M., & Greig, N. H. (2014). Lessons from a BACE1 inhibitor trial: Off-site but not off base. *Alzheimer's & Dementia*, 10(5), S411-S419.
34. Clemente M. (2015). *Nanopartículas en el Sistema Nervioso Central (Trabajo Fin de Grado)*. Facultad de Farmacia, Universidad Miguel Hernandez, Alicante.
35. Krishnan, J. K., Arun, P., Appu, A. P., Vijayakumar, N., Figueiredo, T. H., Braga, M. F., ... & Frey, W. H. (2016). Intranasal delivery of obidoxime to the brain prevents mortality and CNS damage from organophosphate poisoning. *Neurotoxicology*, 53, 64-73.