



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia**

Unitat de Farmacologia, Facultat de Medicina

**EFFECTE DELS ANTICOLINESTERÀSICS HUPRINA X I AVCRI104P3  
EN ELS PROCESSOS NEURODEGENERATIUS I D'ENVELLIMENT**

**Júlia Relat Pardo**

**TESI DOCTORAL**

Bellaterra 2015





**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia**

Unitat de Farmacologia, Facultat de Medicina

Programa de doctorat en Farmacologia

**EFFECTE DELS ANTICOLINESTERÀSICS HUPRINA X I AVCRI104P3  
EN ELS PROCESSOS NEURODEGENERATIUS I D'ENVELLIMENT**

Memòria presentada per Júlia Relat Pardo per optar al Grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Treball realitzat a la Unitat de Farmacologia de la Facultat de Medicina del Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció de la Dra. M<sup>a</sup> Victòria Clos Guillén i la Dra. Belén Pérez Fernández.

Bellaterra, 2 de març del 2015

Doctoranda

Directora de la tesi

Directora de la tesi

Júlia Relat Pardo

Dra. M<sup>a</sup> Victòria Clos  
Guillén

Dra. Belén Pérez  
Fernández



## ÍNDEX



<b>ABREVIATURES</b> .....	15
<b>RESUM</b> .....	23
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	27
<b>1. LA MALALTIA D'ALZHEIMER</b> .....	27
1.1. La disfunció colinèrgica .....	27
1.2. El pèptid A $\beta$ i les plaques amiloides .....	28
1.2.1. El processament de la proteïna precursora amiloide .....	28
1.2.2. El model d'agregació del pèptid A $\beta$ .....	31
1.3. Els cabdells neurofibril·lars .....	32
<b>2. L'APOPTOSI O LA MORT CEL·LULAR PROGRAMADA.</b>	
<b>IMPLICACIÓ EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER</b> .....	33
2.1. L'estrès oxidatiu i l'homeòstasi del calci. Implicació en la malaltia d'Alzheimer .....	34
2.2. Vies de senyalització i molècules implicades en l'apoptosi/supervivència i en la malaltia d'Alzheimer .....	38
2.2.1. Caspases .....	39
2.2.2. Bcl2 .....	40
2.2.3. Cdk5 .....	41
2.2.4. GSK3 .....	42
2.2.5. PI3K/Akt .....	44
2.2.6. Sinaptofisina .....	44
<b>3. LA NEUROINFLAMACIÓ EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER</b> .....	45
<b>4. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES PER A LA MALALTIA</b>	
<b>D'ALZHEIMER</b> .....	48
4.1. Les colinesterases .....	50
4.1.1. L'Acetilcolinesterasa .....	51
4.1.1.1. El model molecular alterat de l'AChE en la malaltia d'Alzheimer .....	55

4.1.1.2. L'AChE i l'apoptosi . . . . .	56
4.1.1.3. L'AChE i el processament de l'APP . . . . .	59
4.1.1.4. Interaccions de l'AChE amb els agregats del pèptid A $\beta$ . . . . .	60
4.2. Els inhibidors de l'AChE . . . . .	63
4.2.1. El desenvolupament dels inhibidors de l'AChE de lloc d'unió dual . . . . .	64
4.2.2. Les huprines i els heterodímers . . . . .	66
4.2.2.1. Les huprines . . . . .	66
4.2.2.2. Els heterodímers . . . . .	68
<b>5. MODELS EXPERIMENTALS ANIMALS PER A L'ESTUDI DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER . . . . .</b>	<b>72</b>
5.1. Models modificats genèticament . . . . .	72
5.1.1. El model de ratolí triple transgènic (3xTg) . . . . .	75
5.2. Models no modificats genèticament . . . . .	76
<b>OBJECTIUS . . . . .</b>	<b>81</b>
<b>MATERIAL I MÈTODES . . . . .</b>	<b>85</b>
<b>1. MATERIAL . . . . .</b>	<b>85</b>
1.1. Reactius . . . . .	85
1.2. Equips i programes informàtics . . . . .	86
1.3. Fàrmacs . . . . .	86
1.4. Encebadors . . . . .	87
1.5. Anticossos . . . . .	87
1.6. Plasmidis . . . . .	88
1.7. Línies cel·lulars . . . . .	88
1.8. Animals d'experimentació . . . . .	89
<b>2. MÈTODES . . . . .</b>	<b>90</b>
2.1. Estudi dels efectes produïts pels anticolinesteràsics HX i AVCRI104P3 en cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb	



els gens de les isoformes S i R de l'ACHÉ . . . . .	91
2.1.1. Obtenció dels plasmidis i transfecció cel·lular . . . . .	91
2.1.2. Estudis de viabilitat cel·lular . . . . .	94
2.1.3. Determinació dels nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHÉ per qRT-PCR . . . . .	96
2.2. Estudi dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic HX en el model de neurotoxicitat amb l'àcid kaïníc en ratolins C57BL/6 . . . . .	99
2.2.1. Disseny experimental i tractament farmacològic . . . . .	99
2.2.2. Determinació dels nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHÉ per qRT-PCR . . . . .	100
2.2.3. Determinació de l'expressió de les proteïnes Bcl2, pAkt(Ser473)/Akt, pGSK3 $\beta$ (Ser9)/GSK3 $\beta$ , sinaptofisina i p25/p35 per <i>Western blot</i> (WB) . . . . .	101
2.2.4. Determinació de l'activitat de les caspases 3/7 en el còrtex per luminescència . . . . .	108
2.2.5. Determinació de l'expressió dels marcadors de gliosi i neurogènesi en l'hipocamp per immunohistoquímica (IHQ): GFAP, Iba1 i DCX . . . . .	108
2.3. Estudi dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 en ratolins 126/SV x C57BL/6 de 12 mesos . . . . .	111
2.3.1. Disseny experimental i tractament farmacològic . . . . .	111
2.4. Estudi dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 en ratolins triple transgènics (3xTg) per l'Alzheimer (PS1 <sub>M146V</sub> , APP <sub>SWE</sub> , tau <sub>P301L</sub> ) de 12 mesos . . . . .	112
2.4.1. Disseny experimental i tractament farmacològic . . . . .	112
2.4.2. Determinació de l'expressió dels pèptids A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub> en l'hipocamp i el còrtex per ELISA ( <i>Enzyme Linked     Immunoabsorbent Assay</i> ) . . . . .	112
2.5. Tractament de les dades i anàlisi estadístic . . . . .	113
<b>RESULTATS . . . . .</b>	<b>117</b>
<b>1. AVALUACIÓ DELS EFECTES PRODUÏTS PELS INHIBIDORS DE L'ACHÉ AVCRI104P3 I HX EN CÈL·LULES SH-SY5Y TRANSFECTA-</b>	

<b>DES AMB ELS GENS DE LES ISOFORMES S I R DE L'ACHE</b> . . . . .	117
1.1. Efecte de les isoformes S i R de l'ACHe i dels IACHe sobre la viabilitat cel·lular . . . . .	117
1.2. Efecte dels IACHe sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHe . . . . .	120
<b>2. AVALUACIÓ DELS EFECTES PRODUÏTS PER L'INHIBIDOR DE L'ACHE HX EN EL MODEL DE NEUROTOXICITAT AMB L'ÀCID KAÍNIC EN RATOLINS C57BL/6</b> . . . . .	121
2.1. Efecte de l'HX sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHe en el còrtex frontal . . . . .	123
2.2. Efecte de l'HX sobre l'expressió de les proteïnes implicades en l'apoptosi i la supervivència cel·lular en l'hipocamp i el còrtex: Bcl2, pAkt(Ser473)/Akt, pGSK3 $\beta$ (Ser9)/GSK3 $\beta$ , sinaptofisina i p25/p35, i activitat de les caspases 3/7 en el còrtex . . . . .	124
2.3. Efecte de l'HX sobre l'expressió dels marcadors de gliosi i neurogènesi en l'hipocamp: GFAP, Iba1 i DCX . . . . .	132
<b>3. AVALUACIÓ DELS EFECTES PRODUÏTS PER L'INHIBIDOR DE L'ACHE AVCRI104P3 EN RATOLINS 126/SV x C57BL/6 DE 12 MESOS</b> . . . . .	136
3.1. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHe en el còrtex frontal . . . . .	136
3.2. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'expressió de les proteïnes implicades en l'apoptosi i la supervivència cel·lular en l'hipocamp i el còrtex: Bcl2, pAkt(Ser473)/Akt, pGSK3 $\beta$ (Ser9)/GSK3 $\beta$ , sinaptofisina i p25/p35, i activitat de les caspases 3/7 en el còrtex . . . . .	137
3.3. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'expressió dels marcadors de gliosi i neurogènesi en l'hipocamp: GFAP, Iba1 i DCX . . . . .	143
<b>4. AVALUACIÓ DELS EFECTES PRODUÏTS PER L'INHIBIDOR DE L'ACHE AVCRI104P3 EN RATOLINS TRIPLE TRANSGÈNICS (3xTg) PER L'ALZHEIMER (PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>SWE</sub>, TAU<sub>P301L</sub>) DE 12 MESOS</b> . . . . .	145

4.1. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE en el còrtex frontal . . . . .	145
4.2. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'expressió de les proteïnes implicades en l'apoptosi i la supervivència cel·lular en l'hipocamp i el còrtex: Bcl2, pAkt(Ser473)/Akt, pGSK3 $\beta$ (Ser9)/GSK3 $\beta$ , sinaptofisina i p25/p35, i activitat de les caspases 3/7 en el còrtex . . . . .	146
4.3. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'expressió dels marcadors de gliosi i neurogènesi en l'hipocamp: GFAP, Iba1 i DCX . . . . .	152
4.4. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'expressió dels pèptids A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub> en l'hipocamp i el còrtex . . . . .	154
<b>DISCUSSIÓ</b> . . . . .	159
<b>CONCLUSIONS</b> . . . . .	193
<b>BIBLIOGRAFIA</b> . . . . .	197



## **ABREVIATURES**



**3xTg-AD:** ratolins mascles triple transgènics homozigots per a gens associats a la malaltia d'Alzheimer

**A $\beta$ :** pèptid  $\beta$ -amiloide

**ACh:** acetilcolina

**AChE:** actilcolinesterasa

**AChE-S,R,E:** isoformes S, R i E de l'AChE

**ADAM:** *a desintegrin and metalloprotease motif* ( $\alpha$ -secretasa)

**ADP:** *adenosine diphosphate*

**AICD:** *APP (amyloid precursor protein) intracellular domain*

**AIF:** *apoptosis inducing factor*

**AINE:** antiinflamatori no esteroïdal

**Akt/PKB:** *protein kinase B*

**AMPA:**  *$\alpha$ -amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

**ANOVA:** *analysis of variance*

**Apaf-1:** *apoptosis-inducing factor-1*

**ApoE:** apolipoproteïna E

**APP:** *amyloid precursor protein*

**APS:** persulfat amònic

**ASCh:** acetiltiocolina

**ASK:** *apoptosis stimulating kinase*

**ATP:** *adenosine triphosphate*

**BACE1:**  *$\beta$ -site APP cleaving enzyme 1* ( $\beta$ -secretasa)

**bAChE:** AChE bovina

**Bad:** *Bcl2 antagonist of cell death*

**Bak:** *Bcl2 antagonist killer*

**Bax:** *Bcl2 associated X protein*

**BCh:** butirilcolina

**BChE:** butirilcolinesterasa

**Bcl2:** *B-cell lymphoma 2*

**Bcl-X<sub>L</sub>:** *Bcl2-related protein long isoform*

**BDNF:** *brain derived neurotrophic factor*

**BH:** dominis d'homologia Bcl2

**BHE:** barrera hematoencefàlica

**Bid:** *BH3-interacting domain death agonist*

**BSA:** albúmina sèrica bovina

**BSCh:** butiriltiocolina

**Calpaïnes:** *calcium-dependent nonlysosomal cysteine proteases*

**cAMP:** *cyclic adenine monophosphate*

**CaMPK II:** *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*

**Caspases:** *cysteinyI aspartate-specific proteases*

**CAT:** catalasa

**CCD:** *charge-coupled device*

**Cdk5:** *cyclin dependent kinase 5*

**cDNA:** còpia de DNA

**CD95:** *cluster of differentiation 95*

**CGC:** cel·lules granulars de cerebel

**ChAT:** colinacetiltransferasa

**ChE:** colinesterasa

**CNF:** cabdells neurofibril·lars

**ColQ:** *acetylcholinesterase-associated collagen*

**COX:** ciclooxigenasa

**CREB:** *cyclic AMP response element-binding protein*

**CTF:** fragment C-terminal

**Cyt C:** citocrom C

**C83:** *amyloid precursor c83 protein*

**C99:** *amyloid precursor c99 protein*

**DCX:** *doublecortin*

**DE:** desviació estàndar

**DEPC:** dietilpirocarbonat

**DISC:** *death-inducing signalling complex*

**DMEM:** *dulbecco's modified eagle's medium*

**DMSO:** dimetilsulfòxid

**DNA:** àcid desoxiribonucleic

**DNasa:** desoxiribonucleasa

**dsDNA:** DNA de cadena doble

**DTT:** ditiotreitòl



**DTNB:** àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic)  
**EC:** *half maximal effective concentration*  
**ECL:** *enhanced chemiluminiscence*  
**EDTA:** àcid etilendiamintetracètic  
**ELISA:** *Enzime Linked Immunoabsorvent Assay*  
**EMA:** *European Medicines Agency*  
**ERK:** *extracellular signal-regulated kinase*  
**FAD:** *familiar Alzheimer disease*  
**FADD:** *fas associated death domain*  
**Fas L/CD95L:** *Fas ligand or cluster of differentiation 95*  
**FBS:** sèrum boví fetal  
**FDA:** *Food and Drug Administration*  
**FOXO:** *forkhead box transcription factor*  
**GAPDH:** *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*  
**GFP:** *green fluorescence protein*  
**GFAP:** *glial fibrillary acidic protein*  
**GSK3:** *glycogen synthase kinase 3*  
**Gpx:** glutatió peroxidasa  
**GSH:** glutatió  
**hAChE:** AChE humana  
**hBChE:** BChE humana  
**HRP:** *horseradish peroxidase*  
**HX, HY, HZ:** huprines X, Y i Z  
**IACHe:** inhibidor de l'acetilcolinesterasa  
**Iba1:** *ionized calcium-binding adaptar molecule 1 (allograft inflammatory factor 1-AIF1)*  
**IC<sub>50</sub>:** *half maximal inhibitory concentration*  
**IF:** immunofluorescència  
**IHQ:** immunohistoquímica  
**IKK:** *I $\kappa$ B kinase*  
**IL:** interleucina  
**iNOS:** *inducible nitric oxide synthase*  
**IP:** *iodur de propidi*

**IP3:** *inositol trisphosphate*

**Iso-OMPA:** tetraisopropil pirofosforamida

**JIP:** *JNK interacting proteins*

**JNK:** *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase*

**KA:** àcid kaínic (s'ha utilitzat "KA" enlloc d'"AK" per no confondre-ho amb la proteïna Akt)

**Ki:** constant d'inhibició

**Km:** constant de Michaelis-Menten

**LCR:** líquid cefalo-raquidi

**LDL:** lipoproteïna de baixa densitat

**LTP:** *long term potentiation*

**MA:** malaltia d'Alzheimer

**mAChR:** receptor muscarínic

**MAPK:** *mitogen-activated protein kinase*

**MAPs:** proteïnes associades a microtúbuls

**MAPT:** *microtubule associated protein tau*

**MAO:** monoamino oxidasa

**Mcl1:** *myeloid cell leukemia*

**MEF2:** *myocyte enhancer factor 2*

**MLK:** *mixed-lineage kinases*

**MRI:** *magnetic resonance imaging*

**mRNA:** àcid ribonucleic missatger

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoli bromur

**nAChR:** receptor nicotínic

**NADH:** nicotinamida adenina dinucleòtid reduït

**Ndufc1:** NADH deshidrogenasa ubiquinona subunitat C1 mitocondrial

**NF-kB:** *nuclear factor kappa-B*

**NGF:** *nerve growth factor*

**NMDA:** àcid N-metil-D-aspartic

**NTg:** ratolins no transgènics

**ON:** *overnight*

**pAkt:** *phosphorylated protein kinase B*

**PAS:** *peripheral anionic site of AChE*

**PBS:** tampó fosfat salí

**PBS-T:** tampó fosfat salí al 0.3% de tritó

**PCR:** *polymerase chain reaction*

**PDB:** *protein data bank*

**PDK:** *posphoinositide-dependent kinase*

**PET:** *positron emission tomography*

**PFA:** paraformaldehyd

**pGSK3:** *phosphorylated glycogen synthase kinase 3*

**PI3K:** *phosphatidylinositol 3-kinase*

**PIP<sub>2</sub>:** *phosphatidylinositol biphosphate*

**PIP<sub>3</sub>:** *phosphatidylinositol triphosphate*

**PirDH:** piruvat deshidrogenasa

**PKA:** *protein kinase A (cyclic AMP dependent)*

**PKC:** *protein kinase C*

**PLC:** fosfolipasa C

**PRiMA:** *proline-rich membrane anchor*

**PrP:** proteïna priònica

**PS:** presinilina

**PTEN:** *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*

**PTP:** *permeability transition pore*

**qRT-PCR:** *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*

**RACK1:** *receptor for activated C kinase 1*

**RE:** reticle endoplasmàtic

**RMN:** ressonància magnètica nuclear

**RNA:** àcid ribonucleic

**RNasa:** ribonucleasa

**RNS:** espècies reactives del nitrogen

**ROS:** espècies reactives de l'oxigen

**sAPP $\alpha$  i  $\beta$ :** APP soluble  $\alpha$  i  $\beta$

**siRNA:** *small interfering RNA*

**SDS:** dodecil sulfat sòdic

**SNC:** sistema nerviós central

**SNP:** sistema nerviós perifèric

**SOD:** superòxid dismutasa

**SSF:** solució salina fisiològica

**t<sub>1/2</sub>:** temps de vida mitja

**TA:** temperatura ambient

**TACE:** *tumor necrosis factor-alfa converting enzyme* ( $\alpha$ -secretasa)

**TcAChE:** AChE *Torpedo californica*

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

**Tm:** temperatura de fusió

**TNF $\alpha$ :** *tumor necrosis factor  $\alpha$*

**TP:** tampó fosfat

**Tris:** tris-hiroximetil-aminometà

**Trx:** tioredoxina

**T-TBS:** *Tris-Buffered Saline 0.2% Tween 20*

**Tween 20:** polietilen sorbità monolaurat

**UV:** llum ultravioleta

**V<sub>màx</sub>:** velocitat màxima

**WB:** *Western blot*

**RESUM**



Entre els diferents trastorns neurodegeneratius, la malaltia d'Alzheimer (MA) es caracteritza per la pèrdua progressiva de les funcions cognitives i l'alteració del comportament, essent el sistema colinèrgic central el principal sistema afectat. S'estima que hi ha més de 20 milions de persones que pateixen l'MA al món i s'espera que el 2050 la xifra augmenti fins a 135 milions, convertint-se així en la pròxima epidèmia dels països desenvolupats (Sabharwal & Wisniewski 2014). La seva importància mèdico-sanitària i socio-econòmica, i el fet que no existeixin fàrmacs prou eficaços per frenar-ne el seu progrés, ha provocat que el desenvolupament de nous compostos hagi esdevingut un tema de gran interès científic.

Fins a dia d'avui, els únics fàrmacs aprovats pel tractament de l'MA són els anticolinesteràsics donepezil, rivastigmina i galantamina, i la memantina, un inhibidor dels receptors NMDA (àcid N-metil-D-aspartic) del glutamat. A partir d'aquestes molècules, i considerant que l'acetilcolinesterasa (AChE) desenvolupa moltes altres funcions a més d'hidrolitzar l'acetilcolina (ACh), s'han sintetitzat nous inhibidors de l'AChE (IAChE) capaços no només d'inhibir l'activitat catalítica de l'enzim, sinó també d'actuar com a modificadors de l'MA. Així doncs, alguns d'aquests compostos impedeixen l'agregació del pèptid  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) induïda per la pròpia AChE, bloquegen i potencien determinades vies pro- i antiapoptòtiques, estimulen la neurogènesi i disminueixen la inflamació, entre altres accions.

S'ha descrit que les funcions no catalítiques de l'AChE estan relacionades de forma específica amb dues de les variants de l'enzim: la isoforma S o sinàptica (cervell i múscul), i la isoforma R o *readthrough* (cèl·lules embrionàries i tumorals). S'ha demostrat que ambdues són induïbles per lesions neuronals i/o per determinats IAChE. D'aquesta manera, l'expressió de l'AChE-R s'associa als processos neurogènics, protectors i de reparació, en canvi l'AChE-S sembla intervenir en les vies apoptòtiques i en l'augment de la neurotoxicitat (Zimmermann 2013; Soreq & Seidman 2001).

D'acord amb això, la present tesi doctoral s'ha centrat en l'avaluació dels efectes dels anticolinesteràsics huprina X (HX) i AVCRI104P3 sobre l'expressió de les isoformes S i R de l'AChE, i altres proteïnes implicades en la regulació dels processos neurotòxics i neurogènics, en diferents condicions experimentals *in vitro* i *ex vivo*, com a models dels estats de neurodegeneració i d'envelliment. S'han escollit aquests compostos, donat que diferents estudis previs realitzats en el nostre departament han demostrat que presenten un ampli perfil farmacològic, ja que són antiagregants d'A $\beta$ , inhibidors de la BACE ( *$\beta$ -site APP cleaving enzyme 1*), agonistes nicotínics i muscarínics M<sub>1</sub> i neuroprotectors.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi mostren que ambdós anticolinesteràsics indueixen accions antiapoptòtiques i neuroprotectores i que, aquestes, segueixen patrons diferents, depenent no només del model experimental, sinó també de les característiques estructurals dels compostos, malgrat que ambdós són inhibidors de l'AChE.



## **INTRODUCCIÓ**



## **1. LA MALALTIA D'ALZHEIMER**

La malaltia d'Alzheimer (MA) és el tipus de demència prevalent en les persones majors de 65 anys i actualment s'estima que hi ha més de 20 milions d'afectats al món. Es caracteritza principalment pel deteriorament del sistema colinèrgic, els agregats del pèptid  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) o plaques amiloides i els cabdells neurofibril·lars (CNF), formats per la proteïna tau hiperfosforilada (Ghezzi et al. 2013). Més del 95% dels casos d'Alzheimer són esporàdics d'aparició tardana, i es relacionen amb un conjunt de processos cel·lulars i metabòlics alterats que acaben provocant la mort neuronal (disfunció mitocondrial, pèrdua de l'homeòstasi del calci, desregulació del cicle cel·lular, resistència a la insulina, hipercolesterolèmia, isquèmia, etc). També s'ha vist que l'al·lel  $\epsilon 4$  de l'apolipoproteïna E augmenta el risc de demència (Hunter et al. 2013).

Els casos familiars d'Alzheimer, que representen menys del 5% del total i són d'aparició no tardana, s'associen a les mutacions genètiques de la proteïna precursora amiloide (APP) i de les presinilines (PS) 1 i PS2 (De Strooper et al. 2012). El síndrome de Down (trisomia del cromosoma 21 que inclou el gen de l'APP) també es relaciona amb el desenvolupament de la demència en edats no tardanes (Bello et al. 2013). No obstant, fins al moment cap causa ha estat totalment acceptada i no hi ha tractaments que evitin, aturin o reverteixin el deteriorament cognitiu associat a l'MA.

### **1.1. La disfunció colinèrgica**

Una de les alteracions principals de l'MA és la hipofunció colinèrgica pre-sinàptica. Aquesta s'atribueix a la degeneració de les neurones colinèrgiques que projecten cap al còrtex i cap a l'hipocamp, a la pèrdua d'enzim colinacetiltransferasa (ChAT) i de molècules de colina (amb la conseqüent disminució de la síntesi d'acetilcolina (ACh)), i a l'esgotament dels receptors nicotínics de l'ACh (nAChR) subtipus  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$  i  $\alpha 4\beta 2$  (Posadas et al. 2013; Shimohama 2013). Els receptors muscarínics de l'ACh (mAChR), família de cinc subtipus de receptors ( $M_1$ - $M_5$ ) lligats a la proteïna G, també estan implicats

en la fisiopatologia de l'Alzheimer. Els receptors pre-sinàptics  $M_2$  estan disminuïts, mentre que els post-sinàptics  $M_1$  no presenten canvis. El receptor post-sinàptic  $M_1$ , predominant en el còrtex i en l'hipocamp, desenvolupa un paper important en els processos de memòria i aprenentatge, i en particular en la memòria a curt termini, la més afectada en l'MA. L'estimulació farmacològica dels receptors  $M_1$  activa la proteïna quinasa C (PKC) i afavoreix el processament no amiloidogènic de l'APP (Overk et al. 2010; Fisher 2012; Davie et al. 2013).

La hipòtesi colinèrgica postula que els dèficits colinèrgics pre-sinàptics provoquen la disfunció cognitiva progressiva i part del deteriorament conductual associat a l'MA, i que aquests dèficits es poden restaurar a través de l'activació del sistema colinèrgic (Dumas & Newhouse 2011). Els únics fàrmacs aprovats pel tractament de l'MA, exceptuant la memantina, són els inhibidors de l'AChE (IACHÉ), els quals es basen en la teoria colinèrgica (donepezil, rivastigmina, galantamina) (Schliebs & Arendt 2011).

## **1.2. El pèptid $A\beta$ i les plaques amiloides**

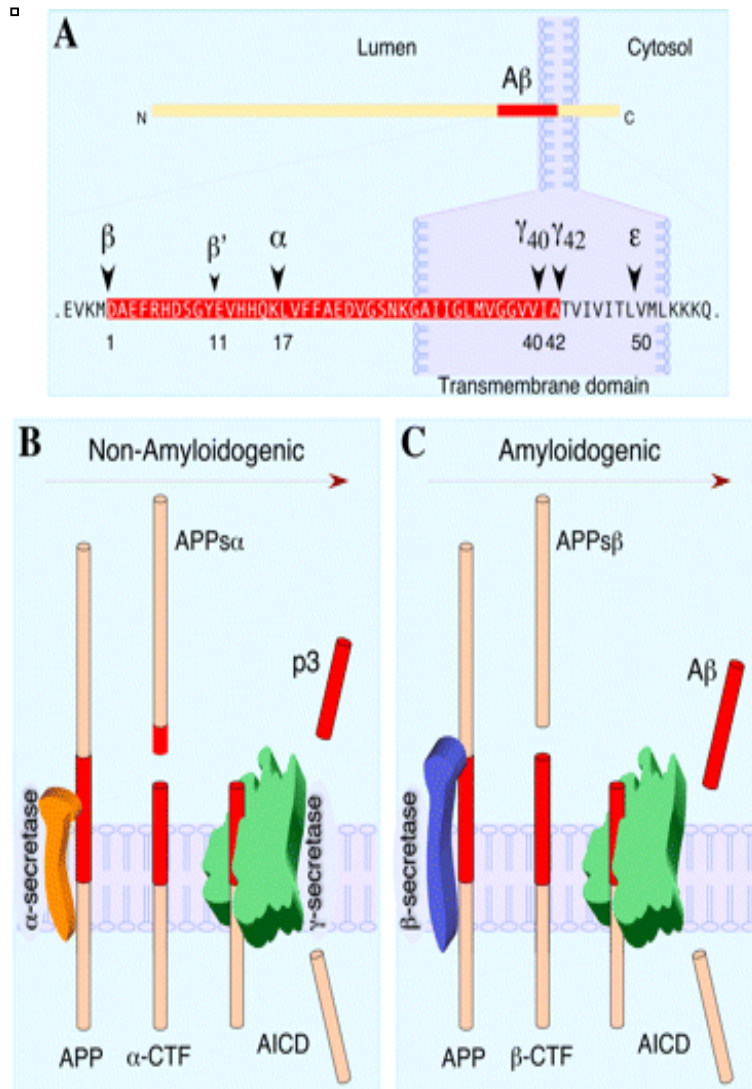
L'alteració neuropatològica principal de l'MA són les plaques amiloides, dipòsits proteics extracel·lulars amb un diàmetre d'entre 20 i 25  $\mu\text{m}$ , localitzats al cervell i formats majoritàriament per agregats del pèptid  $A\beta$ . Aquest té una llargada d'entre 38 i 43 aminoàcids, pesa aproximadament uns 4 kDa, és hidrofòbic i té tendència a agregar-se (Mokhtar et al. 2013).

### **1.2.1. El processament de la proteïna precursora amiloide**

El pèptid  $A\beta$  és un fragment proteolític de la proteïna de membrana precursora amiloide (APP). La funció biològica de l'APP no està clara, sembla estar implicada en els processos d'adhesió cel·lular i actua com a receptor de senyals extracel·lulars (Nalivaeva & Turner 2013). La formació d' $A\beta$  requereix el trencament de l'APP per dues proteases, les secretases  $\beta$  i  $\gamma$ , ambdues proteïnes de membrana (Fig.1C). La secretasa  $\beta$  o BACE1 ( *$\beta$ -site APP*

*Cleaving Enzyme type I*) és una aspartil proteasa que trenca l'APP pel fragment N-terminal del domini A $\beta$  (Holsinger et al. 2013). Això comporta la secreció o despreniment de l'ectodomini APPs $\beta$  de l'APP, el qual sembla tenir una funció apoptòtica (Zhang et al. 2012), i la generació del fragment C-terminal de l'APP de 99 aminoàcids (C99). Aquest és posteriorment trencat per la secretasa  $\gamma$ , proteasa hetero-tetramèrica formada per les subunitats presinilina, nicastrina, Aph-1 (*Anterior pharynx-defective 1*) i Pen-2 (potenciador de la presinilina) (Prox et al. 2012). Com a resultat d'aquesta escissió, es secreta el pèptid A $\beta$  i el domini intracel·lular de l'APP (AICD) s'allibera al citosol (Zhang et al. 2012).

Unes terceres proteases, les secretasses  $\alpha$ , majoritàriament les desintegrines ADAM10 i ADAM17 (*A Desintegrin And Metalloprotease*), escindeixen l'APP dins del domini de l'A $\beta$  i n'impedeixen la formació (Fig.1B). Són metalloendopeptidases de membrana de tipus I, i requereixen de zinc per a dur a terme la seva activitat proteolítica (Klein & Bischoff 2011). L'APP és majoritàriament trencada per les secretases  $\alpha$ , procés que s'esdevé de forma constitutiva, i en menor mesura per la via alternativa de la secretasa  $\beta$ . No obstant, en les neurones primàries l'expressió de la secretasa  $\beta$  és particularment elevada (Janson et al. 2013). La secretasa  $\alpha$  genera la forma secretada de l'APP, l'APPs $\alpha$ , la qual presenta propietats neurotròfiques i neuroprotectores (Zhou et al. 2011). L'altre producte resultant de la proteòlisi duta a terme per la secretasa  $\alpha$  és el fragment C-terminal de l'APP que conté 83 aminoàcids (C83). Aquest és posteriorment trencat per la secretasa  $\gamma$ , generant el pèptid p3 (amb 16 aminoàcids menys a l'extrem N-terminal que el pèptid A $\beta$ ), i el fragment AICD (Fig.1B). El pèptid p3 és benigne i no es troba en les plaques amiloides (Jurisch-Yaksi et al. 2013). Actualment, tant les secretases  $\alpha$ , com les  $\beta$  i les  $\gamma$  es presenten com a possibles dianes farmacològiques pel tractament de l'MA (Marks & Berg 2010; Epis et al. 2012).



**Fig.1 A) Seqüència aminoacídica, localització i llocs de tall de la proteïna de membrana tipus I APP.**

**B) i C) Processament proteolític de l'APP per les vies no amiloidogènica i amiloidogènica.**

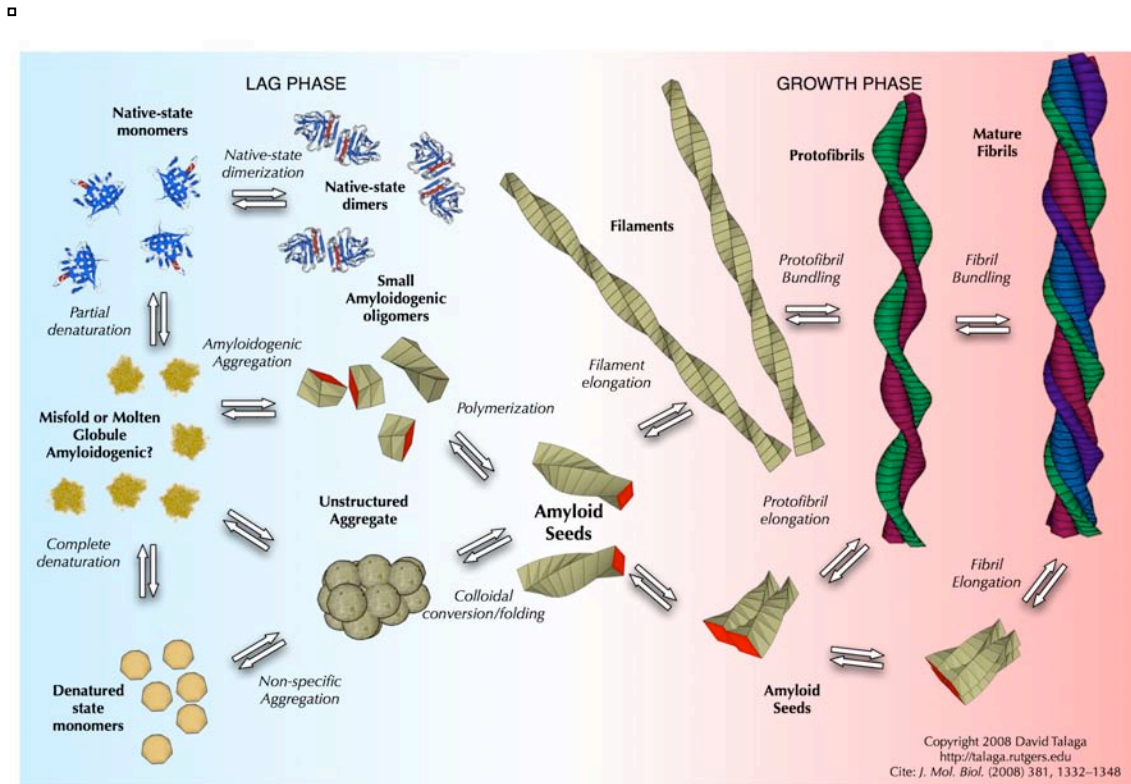
El trencament de l'APP per la secretasa  $\alpha$  produeix l'ectodomini soluble APPs $\alpha$  i el fragment C-terminal  $\alpha$  ( $\alpha$ -CTF o C83), posteriorment processat per la secretasa  $\gamma$ , el que condueix a la secreció del pèptid p3 i a la formació del domini intracel·lular de l'APP (AICD). El trencament seqüencial de l'APP per les secretases  $\beta$  i  $\gamma$ , en canvi, genera el pèptid amiloidogènica A $\beta$ . La secretasa  $\beta$  talla l'APP per l'ectodomini proper al domini transmembrana, s'allibera l'ectodomini soluble APPs $\beta$  i el fragment C-terminal  $\beta$  ( $\beta$ -CTF o C99) es queda unit a la membrana. La secretasa  $\gamma$  talla el fragment C99, que provoca la secreció d'A $\beta$  i la formació del domini intracel·lular de l'APP (AICD) (Adaptat d'<http://pt851.wikidot.com/alzheimer-s-disease-cell-bio>).

### 1.2.2. El model d'agregació del pèptid A $\beta$

El pèptid A $\beta$  és secretat a l'espai extracel·lular en forma monomèrica, on mitjançant un procés d'associació dona lloc a unes fibril·les que s'acoblen entre si formant les conegudes fibres amiloides, resistents a les proteases.

Alguns dels estudis realitzats *in vitro* sobre la caracterització cinètica del procés de fibril·logènesi del pèptid A $\beta$  suggereixen una conversió d'estructura desordenada a estructura  $\beta$  a través d'un intermediari ric en estructura  $\alpha$  (Corsale et al. 2012). El contingut de fulla plegada  $\beta$  creix exponencialment fins a la formació de fibres amiloides. El model d'agregació majoritàriament acceptat consisteix en un mecanisme de polimerització depenent de nucleació. Aquest model comença amb una etapa lenta de formació de nuclis d'agregació que oligomeritzen i donen lloc a protofibril·les. En la segona etapa, l'elongació, es formen ràpidament les fibres madures per associació i/o addició de monòmers als extrems de les protofibril·les. Aquesta etapa d'elongació té un caràcter exponencial i irreversible (Jarrett et al. 1993; Härd 2011) (Fig.2).

Els oligòmers petits d'A $\beta$  són neurotòxics i capaços de desencadenar una cascada patològica d'esdeveniments que inclouen la inflamació, la inhibició de la potenciació a llarg termini de l'hipocamp, la disfunció sinàptica, els cabdells neurofibril·lars, la pèrdua neuronal, l'aparició clínica de la malaltia i en última instància, la mort. La hipòtesi de la cascada amiloidogènica considera que l'eliminació de l'acumulació de l'A $\beta$  al cervell prevé la progressió de l'MA, essent per tant el pèptid A $\beta$  una de les dianes terapèutiques actuals (Lichtenthaler 2011; Belluti et al. 2013).



**Fig.2 Model d'agregació de la proteïna A $\beta$ .** Comprèn una fase de nucleació lenta i una fase d'elongació ràpida que porta a la formació de fibres insolubles (Adaptat d'<http://talaga.rutgers.edu/index.php>).

### 1.3. Els cabdells neurofibril·lars

La tercera alteració neuropatològica de l'MA són els cabdells neurofibril·lars (CNF) formats per la proteïna tau hiperfosforilada i agregada en filaments helicoidals aparellats (Wischik et al. 2013) (Fig.3). La hipòtesi de la tau per a l'Alzheimer postula que la prevenció de la fosforilació excessiva d'aquesta proteïna disminueix la formació dels cabdells neurofibril·lars i conseqüentment frena la progressió de l'MA.

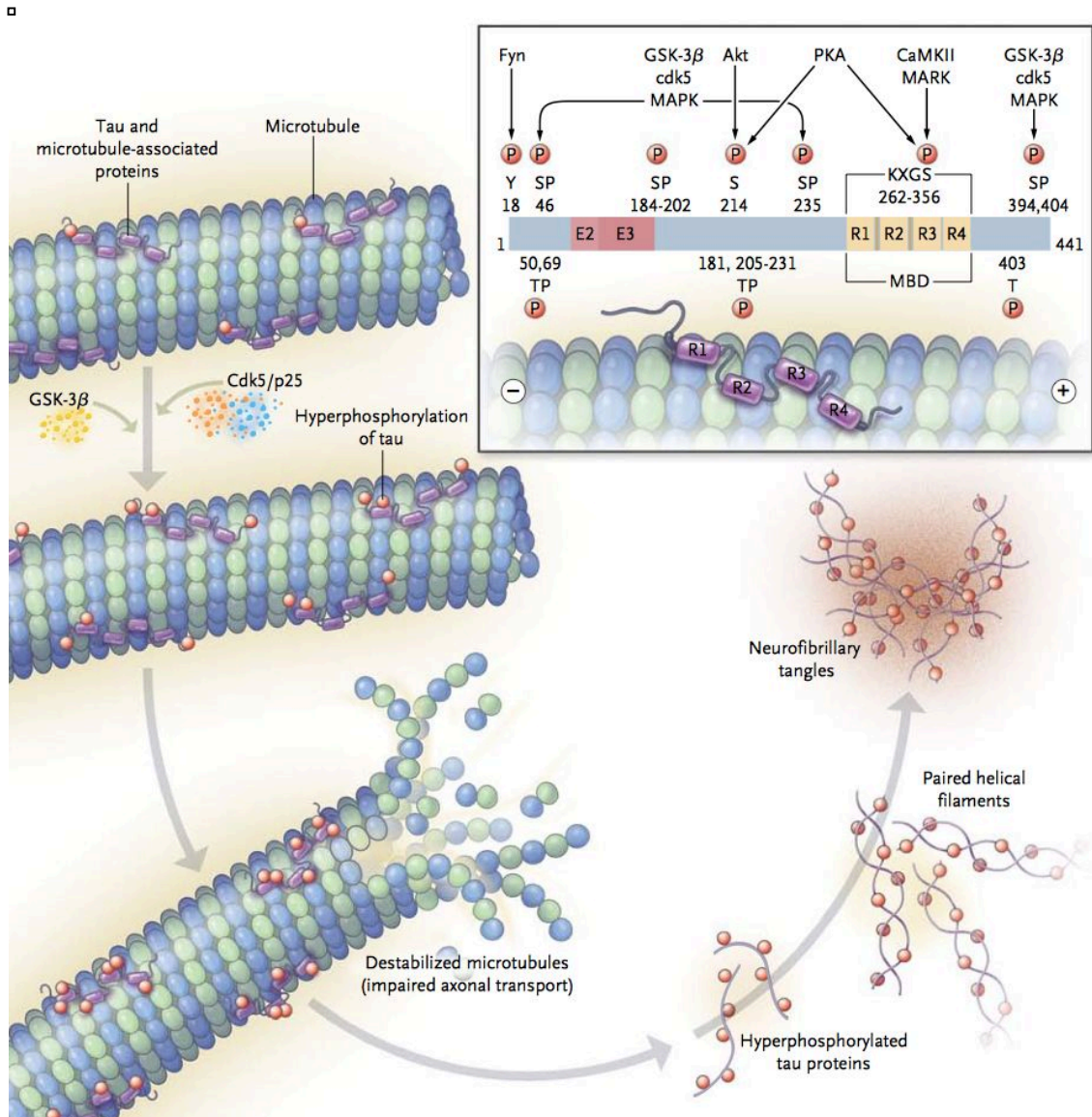
La tau s'expressa als axons associada als microtúbuls que conformen el citoesquelet neuronal, als quals estabilitza i en permet el transport axonal (Kuchibhotla et al. 2013). La fosforilació i desfosforilació reversible d'aquesta proteïna regula la seva desunió i unió als microtúbuls permetent la funció



dinàmica dels mateixos. Durant l'MA es produeix una fosforilació anòmala de la tau per culpa de l'acció de determinades proteïnes tals com les quinases activadores de mitògens (MAPKs), la quinasa glicogen-sintasa  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ), la quinasa tau-tubulina, les quinases dependents de ciclina 2 i 5 (la Cdk2 i la Cdk5), i les quinases activades per estrès (SAPks), totes elles dirigides a prolina o a motius prolina-serina/treonina (P-ST) (Clavaguera et al. 2014). Un altre grup de proteïnes implicades que fosforilen motius diferents als P-ST són la quinasa reguladora d'afinitat als microtúbuls (MARK), la quinasa II dependent de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMPK II), la quinasa dependent d'AMP cíclic (PKA) i la quinasa II de la caseïna (Cavallini et al. 2013). Posteriorment a aquesta hiperfosforilació, varis processos glicosilen i recobreixen de quitina la tau. La proteïna modificada s'uneix entre sí formant filaments helicoidals aparellats que s'agreguen originant els CNF. Aquests alteren el citoesquelet neuronal i provoquen una degeneració neurofibril·lar (una pèrdua de ramificacions dendrítiques i una reducció del número d'estructures sinàptiques). Les lesions originades per la proteïna tau, al igual que les provocades per l'A $\beta$ , condueixen a la mort neuronal en diferents regions cerebrals.

## **2. L'APOPTOSI O LA MORT CEL·LULAR PROGRAMADA. IMPLICACIÓ EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER**

L'apoptosi o la mort cel·lular programada és un procés cel·lular actiu (requereix consum d'energia), que tant es dona en condicions fisiològiques com patològiques. Fisiològicament és un procés fonamental i comú en els organismes pluricel·lulars, ja que és imprescindible per al desenvolupament, la morfogènesi dels òrgans, l'homeòstasi dels teixits i per a l'eliminació de les cèl·lules danyades o infectades pels patògens. En les malalties neurodegeneratives i en l'envelliment, les causes principals de l'apoptosi neuronal són l'estrès oxidatiu, la sobreactivació dels receptors del glutamat i l'estrès metabòlic (Favaloro et al. 2012).



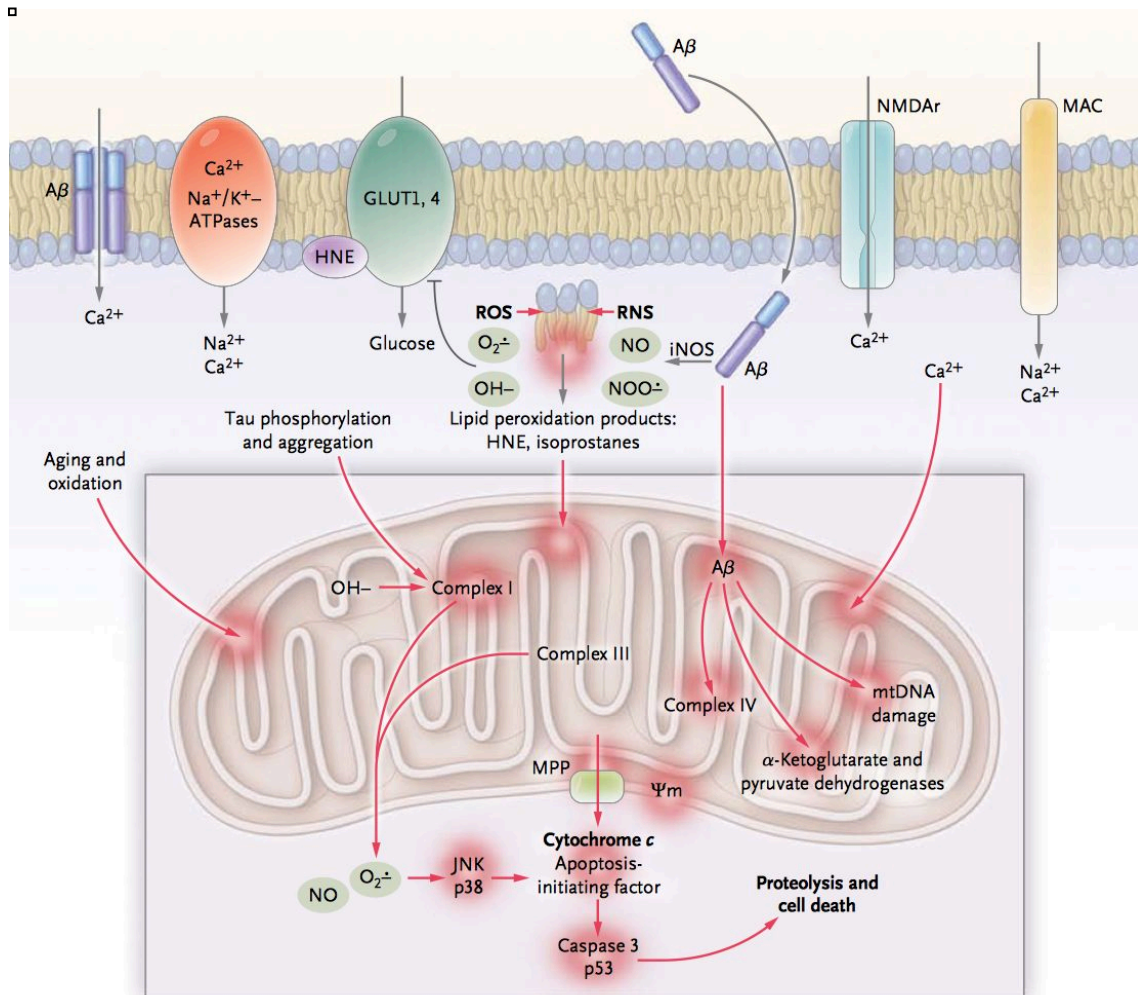
**Fig.3 Formació dels cabdells neurofibril·lars (CNF) en l'MA.** En condicions normals la tau proporciona estabilitat als microtúbuls i presenta una fosforilació adequada per dur a terme les seves funcions. La hiperfosforilació de la tau provoca l'alteració de les seves funcions, la inestabilitat dels microtúbuls i finalment la seva degradació. La tau hiperfosforilada s'aparella en filaments helicoïdals que s'agreguen i formen els cabdells neurofibril·lars (Adaptat de Querfurth & LaFerla 2010).

## 2.1. L'estrès oxidatiu i l'homeòstasi del calci. Implicació en la malaltia d'Alzheimer

Varies hipòtesis consideren l'estrès oxidatiu com la base de la progressió de les malalties neurodegeneratives i de l'envelliment, essent un dels primers

esdeveniments que apareixen en l'MA (Lee et al. 2010; Popa-Wagner et al. 2013). Afecta a múltiples sistemes neuronals i està implicat en la disfunció mitocondrial (Aliev et al. 2014), la desregulació del calci (Stefani et al. 2012), els canvis en la senyalització de l'ACh i el glutamat (Guan 2008; Matos et al. 2008; Forder & Tymianski 2009), la disfunció vascular (Kelleher & Soiza 2013) i l'apoptosi (Nakamura et al. 2011).

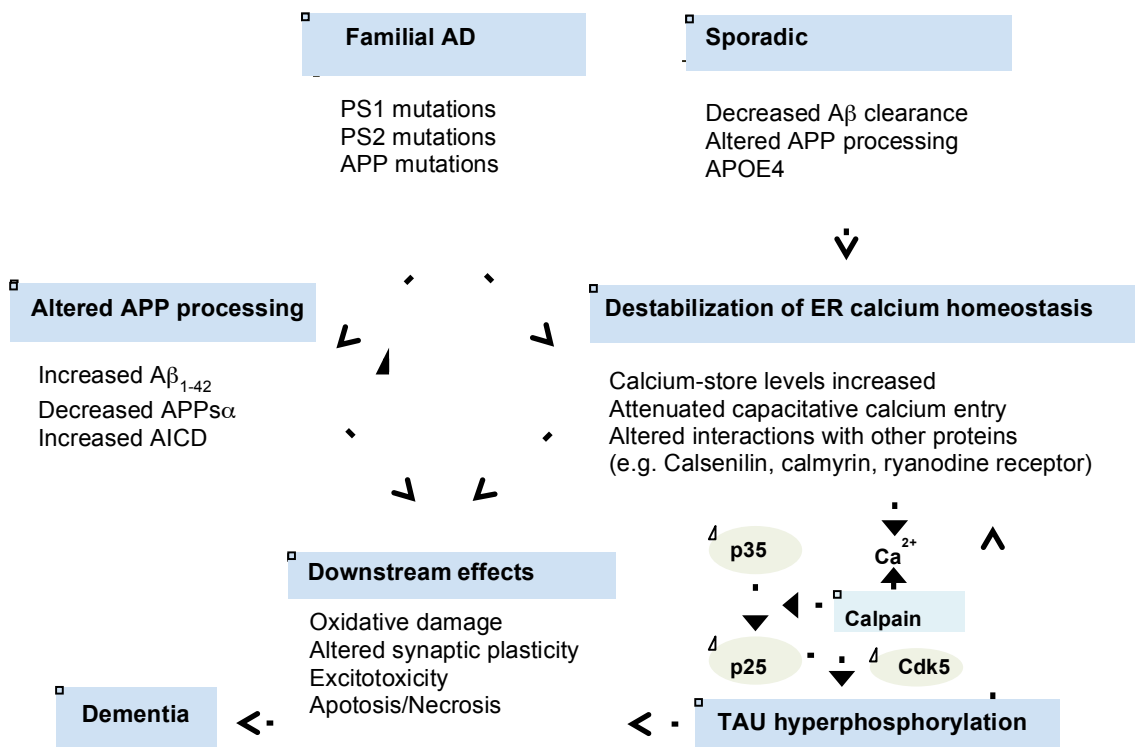
Les espècies reactives de l'oxigen (ROS) produïdes durant el metabolisme oxidatiu propi de la cèl·lula, es veuen incrementades en condicions patològiques o d'envelliment, trencant-se el balanç oxidatiu entre els processos bioquímics que porten a la producció de les ROS i els responsables de la seva eliminació. El mecanisme subjacent sembla implicar la pèrdua de l'homeòstasi del calci cel·lular per culpa de la regulació pertorbada d'aquest en el reticle endoplasmàtic, i/o per la seva entrada a la cèl·lula en resposta a algun dany o trastorn cel·lular. Això provoca la seva acumulació en el mitocondri, l'augment del potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) i l'increment de la producció de les ROS. Com a conseqüència de la despolarització de la membrana del mitocondri, s'allibera el citocrom c i es produeix la mort cel·lular. En condicions fisiològiques la mitocòndria elimina l'excés de les ROS a través de la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa o el sistema del glutatió entre altres mecanismes antioxidants, però quan es dona un desequilibri entre la producció i l'eliminació de les ROS o hi ha una reducció de la reparació de les macromolècules oxidades, la cèl·lula pateix un dany oxidatiu (Gutowski & Kowalczyk 2013). L'SNC és particularment vulnerable al dany oxidatiu com a conseqüència de la gran utilització d'O<sub>2</sub>, la manca d'antioxidants endògens i l'elevat contingut en lípids poliinsaturats, les biomolècules més susceptibles a l'oxidació. A més, hi ha elevades concentracions regionals de metalls redox capaços de generar catalíticament espècies reactives de l'oxigen (Fig.4a i b).



**Fig.4a Estrès oxidatiu, desregulació del calci i dany mitocondrial en l'MA.** El pèptid Aβ centrat en la imatge provoca la sobreproducció de les ROS i les RNS. La peroxidació lipídica de la membrana produeix toxines mitocondrials (hydroxionenal (HNE) i malondialdehid). El dany oxidatiu i l'estimulació dels mecanismes per l'entrada del Ca<sup>2+</sup> provoquen l'augment del calci citosòlic i mitocondrial. L'Aβ intracel·lular ataca al Complex IV de la cadena transportadors d'electrons, als enzims claus del cicle de Krebs i danya el DNA mitocondrial (mtDNA) fragmentant-lo. Els productes de la peroxidació lipídica també promouen la fosforilació i l'agregació de la tau, que a la vegada inhibeix el Complex I de la cadena transportadora d'electrons. Els Complexes I i III generen quantitats exagerades de les ROS i les RNS, es col·lapsa el potencial de la membrana mitocondrial (MPP) i s'activen les caspases (Adaptat de Querfurth & LaFerla 2010).

En el cas de l'MA, el pèptid Aβ, com a substància proapoptòtica, augmenta la vulnerabilitat neuronal a la mort induïda per condicions com l'estrès oxidatiu i la falta d'energia disponible, tal i com passa en els cervells d'edat avançada. En

un entorn oxidant amb una alta concentració d'A $\beta$ , aquesta comença a autoagregar-se i a induir la peroxidació lipídica de la membrana cel·lular. Això impedeix el funcionament de les ATPases o bombes de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> i dels transportadors de la glucosa i del glutamat, la qual cosa porta a la despolarització de la membrana, l'esgotament de l'ATP, l'influx excessiu de calci i la disfunció mitocondrial (Mattson & Pedersen 1998; Liu et al. 2013) (Fig.4a i b).



**Fig.4b L'homeòstasi del calci i la neuropatologia de l'MA.** Diagrama esquemàtic que mostra els mecanismes que poden conduir a la desregulació de l'homeòstasi del calci neuronal a partir de la desestabilització de l'homeòstasi del calci en el reticle endoplasmàtic, i com aquest desequilibri contribueix a la formació de les plaques amiloides, a la degeneració neurofibril·lar, a l'estrès oxidatiu i a l'apoptosi. AICD, *APP intracellular domain* (Adaptat de LaFerla 2002).

## 2.2. Vies de senyalització i molècules implicades en l'apoptosi/supervivència i en la malaltia d'Alzheimer

L'apoptosi pot iniciar-se com a mínim a través de dues vies generals, l'extrínseca i la intrínseca. L'extrínseca comença fora de la cèl·lula, quan les condicions del medi extracel·lular determinen que ha de morir. La unió del lligand Fas (FasL o CD95L) al receptor Fas (CD95) provoca l'agrupació de receptors i comença la via extrínseca. El receptor Fas és un membre de la família dels que es coneixen com a receptors de la mort, que també inclou el receptor TNF (*Tumor Necrosis Factor*). L'agregació de receptors Fas s'uneix a l'FADD (*Fas Associated Death Domain*), una proteïna adaptadora que conté un domini de mort citosòlic. L'FADD es fixe a la forma inactiva de la caspasa 8 que experimenta una auto-activació catalítica i és llavors capaç de trencar la procaspasa 3 a caspasa 3, principal caspasa efectora de l'apoptosi. Aquesta via de l'apoptosi s'anomena mort cel·lular induïda per activació donat que és induïda per l'activació receptor/ligand i no per l'absència d'estímul de supervivència (Lheureux & Le Moulec 2011).

La via intrínseca comença a partir d'una lesió intracel·lular. La lesió podria donar lloc a necrosi i produir una resposta inflamatòria, però la maquinària apoptòtica de la cèl·lula empaqueta la cèl·lula i l'elimina prevenint així la inflamació. El dany mitocondrial, el dany del DNA, l'estrès oxidatiu o l'increment del calci intracel·lular són possibles desencadenants de la via intrínseca en activar proteïnes apoptòtiques com la Bad o la Bax, i superar els efectes de la proteïnes antiapoptòtiques Bcl2 (*B cell lymphoma 2*) i BclXL. El citocrom c, alliberat de les mitocòndries danyades, s'uneix a la proteïna Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) que activa la caspasa iniciadora 9, que a la vegada activa la caspasa efectora 3 (Brentnall et al. 2013). Les cèl·lules apoptòtiques s'encongeixen, es degrada la cromatina i el fosfolípid fosfatidilserina, que es troba amagat a la membrana plasmàtica, s'exposa a la superfície i interacciona amb els receptors dels macròfags i les cèl·lules dendrítiques, els quals s'empassen els fragments cel·lulars (Sinha et al. 2013).

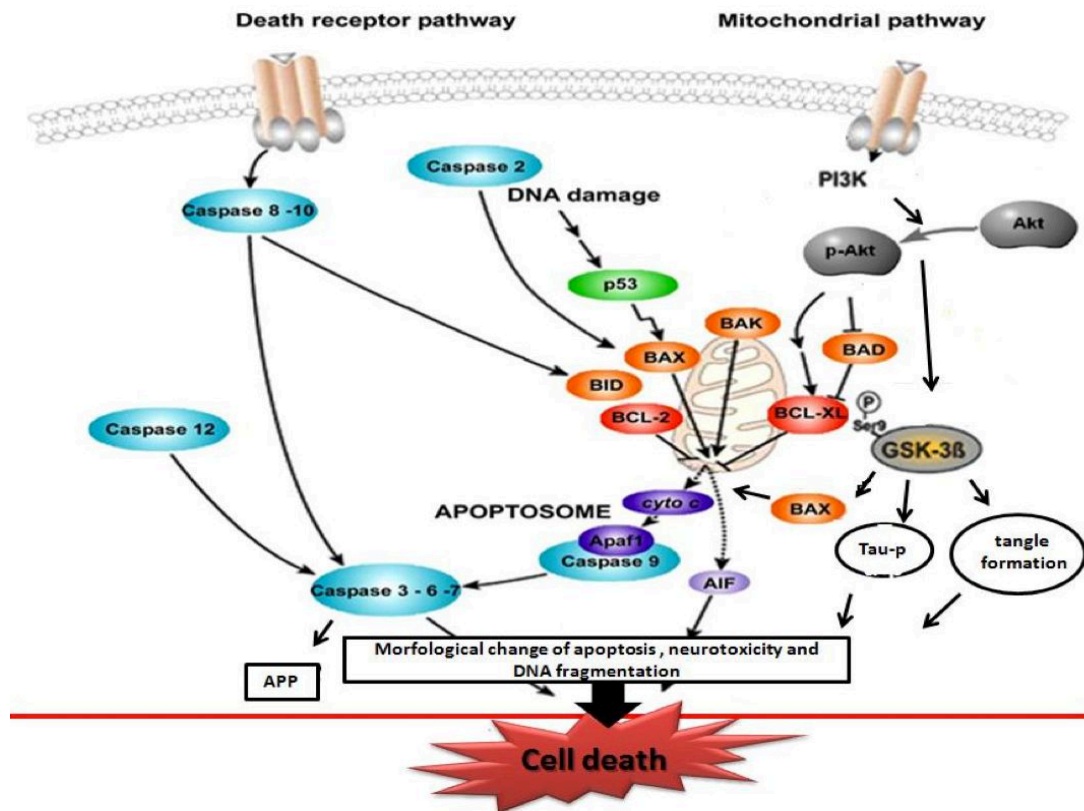
En els cervells amb Alzheimer, l'activitat de les caspases està incrementada i el DNA està danyat. I per tant, l'expressió dels gens relacionats amb l'apoptosi tals com els membres de la família Bcl2 (Bad, Bax, Bcl2, BclXL) i els gens de resposta al dany del DNA es veuen alterats en aquelles neurones associades amb els dipòsits amiloides. Una de les proteïnes que es sobreexpressa és l'Akt o proteïna quinasa serina/treonina B (PKB), la qual inhibeix la GSK3 $\beta$ , que hiperfosforila la proteïna tau i activa la Bax (Fig.5). A la vegada, una de les conseqüències de l'activació de les caspases és el trencament de la tau, la qual cosa afavoreix els canvis conformacionals característics del filaments helicoidals aparellats (*PHF-TAU, Paired Helical Filaments-TAU*). Com ja s'ha comentat, l'acumulació progressiva de la tau comporta una disrupció del citoesquelet, la fallada del transport dendrític i axoplasmàtic, i la pèrdua subsegüent del suport tròfic que culmina amb la mort neuronal (Rohn 2009). Es planteja que l'A $\beta$  intracel·lular podria activar les caspases per la via intrínseca a través del procés que involucra el reticle endoplasmàtic, la desregulació de l'homeòstasi del calci i l'estrès mitocondrial. I els oligòmers extracel·lulars d'A $\beta$  podrien iniciar l'apoptosi a través de l'activació dels receptors de mort de la superfície tals com el receptor TNF per la via extrínseca (Zorn et al. 2012).

### **2.2.1. Caspases**

Les caspases són una família de proteases sintetitzades com a zimògens o pro-caspases, corresponents als precursors inactius. Les pro-caspases es tallen en resposta a senyals apoptòtics i passen a formar heterodímers de dues subunitats petites i dues subunitats grans, que són la forma activa de l'enzim. S'han descobert 12 caspases en els humans, que es divideixen en les caspases iniciadores i les efectores. Les iniciadores es poden activar a elles mateixes i són la 2, la 8, la 9 i la 10. Un cop activades inicien una cascada que activa a les efectores o executores, les quals inclouen la 3, la 6 i la 7, i són les responsables de processar una gran varietat de substrats cel·lulars, alterant així el funcionament de la cèl·lula, fet que condueix a la mort cel·lular. La resta de les caspases no intervenen en l'apoptosi, sinó en el processament de les citocines proinflamatores, i s'anomenen caspases inflamatores (McIlwain et al.

2013).

□



**Fig.5 Vies apoptòtiques i molècules implicades.** Es mostra la via extrínseca del receptor de mort cel·lular (esquerra) i la via intrínseca mitocondrial (dreta). Les caspases s'indiquen en blau, els membres apoptòtics de la família de la Bcl2 en taronja i els antiapoptòtics en vermell, i la via de l'Akt i la GSK3β en gris (Adaptat de Lossi et al. 2005).

### 2.2.2. Bcl2

Les proteïnes de la família de la Bcl2 són reguladors crítics de l'apoptosi. S'inclouen un grup de membres antiapoptòtics i dos grups de membres proapoptòtics: les proteïnes BH3 i el grup Bax (Wyllie 2010). El grup de membres antiapoptòtics està format per la Bcl2, la BclXL, la BclW, l'MCL1 (*Myeloid cell leukemia 1*), la BCL2A1 i la BCLB. La Bcl2 és una proteïna integral de membrana que promou la seva acció antiapoptòtica en inhibir la translocació de la Bax cap a la mitocondria, mantenint d'aquesta manera el potencial de membrana i evitant l'alliberació del Cyt C mitocondrial. Així s'impedeix l'acoblament de l'apoptosoma (complex proteic format per la



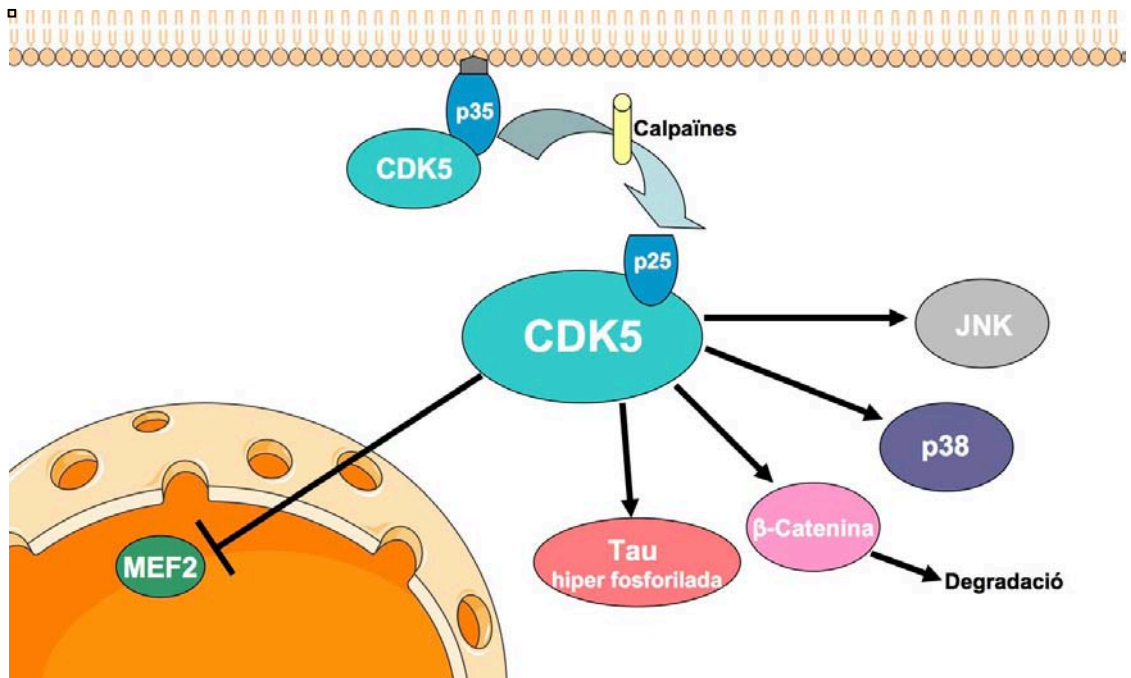
proteïna Apaf-1, el Cyt C, la caspasa 9 i una molècula d'ATP o de dATP) i la consegüent mort cel·lular programada (Vogler 2012).

### **2.2.3. Cdk5**

La quinasa Cdk5 és l'únic membre de la família de les Cdk que no intervé en la progressió del cicle cel·lular. És activa sobretot en neurones postmitòtiques i és necessària pel desenvolupament del cervell, ja que intervé en processos com la migració neuronal i el creixement axonal. A diferència de la resta de quinases dependents de ciclina, no s'activa per ciclins, sinó pels factors p35 i p39 (Kawauchi et al. 2013). Els activadors p35 i p39 s'expressen específicament en neurones, i per tant la seva activitat està restringida a aquest tipus de cèl·lules (Zhu et al. 2011).

Tot i la seva importància en el desenvolupament embrionari del cervell, la sobreactivació de la Cdk5 condueix a la mort neuronal (Shukla et al. 2012). Un dels mecanismes responsables d'aquesta sobreactivació és la unió de la Cdk5 amb el metabòlit p25, producte del trencament proteolític del factor p35 per les calpaïnes, les quals són activades pel calci. Diferents estímuls apoptòtics, com el glutamat, el peròxid d'hidrogen o l'acumulació del pèptid A $\beta$ , incrementen la concentració del calci intracel·lular, que provoca l'activació de les calpaïnes i la formació del factor p25. El complex Cdk5-p25 és més estable que el format amb el factor p35, i manté la quinasa permanentment activada (Lew 2013) (Fig.6). A més a més, la unió Cdk5-p25 s'allibera de la membrana plasmàtica i es queda al citoplasma, des d'on pot hiperfosforilar diferents proteïnes associades als microtúbuls, com per exemple la proteïna tau, i conduir a la disrupció del citoesquelet, fet que pot induir l'apoptosi. En els cervells dels malalts d'Alzheimer s'han observat acumulacions de la forma p25 en els cabdells neurofibril·lars (Sundaram et al. 2013). Contràriament, el complex Cdk5-p35, el qual es manté a la membrana plasmàtica, activa diferents vies de supervivència com la de la PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)/Akt (Li et al. 2003), la de l'*ERK* (Wang et al. 2006), o inhibeix vies apoptòtiques com la de la JNK (Li et al. 2002). L'activador de la Cdk5 determina que es promogui

l'apoptosi o la supervivència cel·lular (Fig.6).



**Fig.6** Accions proapoptòtiques del complex p25-CDK5 (Adaptat de Yeste 2008).

#### 2.2.4. GSK3

La GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) és una quinasa serina/treonina que s'identifica com l'enzim capaç de fosforilar l'enzim glicogen sintetasa provocant la seva inhibició. Posteriorment, es va veure que podia fosforilar aproximadament uns 50 substrats i modular diferents processos com el metabolisme del glicogen, l'estructura cel·lular, l'expressió gènica i l'apoptosi (Phukan et al. 2010). Existeixen dues isoformes, l' $\alpha$  i la  $\beta$ , essent aquesta última la més abundant en l'SNC i la que presenta un paper més rellevant en l'apoptosi. El mecanisme de regulació més conegut es dona a través de la fosforilació de la GSK3 $\beta$  en el residu Ser9 i de la GSK3 $\alpha$  en el residu Ser21, que inhibeixen la seva activitat. La principal quinasa responsable d'aquestes fosforilacions és l'Akt o PKB (*Protein Kinase B*), tot i que existeixen d'altres quinases involucrades (Freyberg et al. 2010).

Una de les funcions més importants de la GSK3 $\beta$  és la regulació de l'apoptosi. Està demostrat que la via intrínseca mitocondrial pot ser amplificada per la GSK3 $\beta$ , després de ser activada per diferents tipus d'estímuls, com poden ser la privació de factors tròfics, la inhibició de la via de la PI3K/Akt, el dany del DNA, l'estrès oxidatiu, l'excitotoxicitat pel glutamat o la hipòxia. A la vegada, és una de les principals quinases involucrades en la fosforilació aberrant de la proteïna tau, la qual en ser fosforilada es dissocia dels microtúbuls, que es desestabilitzen provocant els canvis estructurals propis de l'apoptosi i formant els cabdells neruofibril·lars (Avila et al. 2010; Hernandez et al. 2013) (Fig.7).

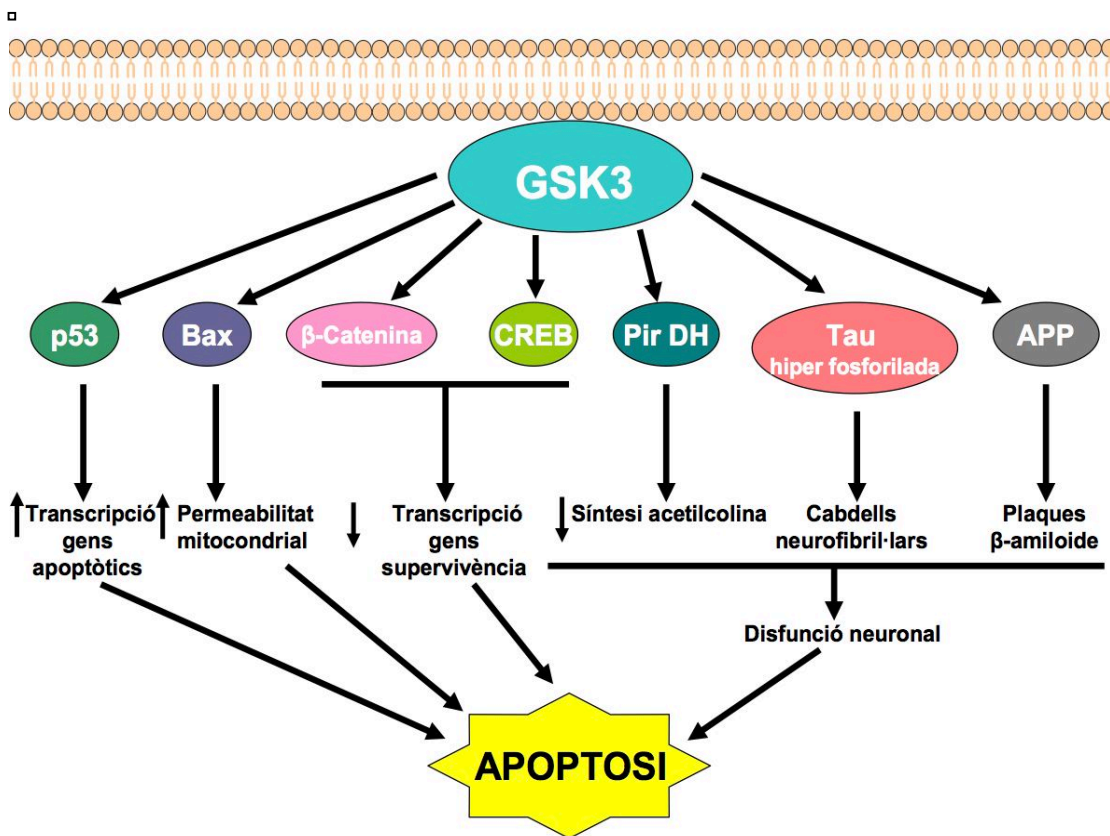


Fig.7 Accions proapoptòtiques de la GSK3 (Adaptat de Yeste 2008).

També s'ha demostrat la fosforilació de l'APP per la GSK3 $\alpha$ , fet que contribueix al processament d'aquesta per formar el pèptid neurotòxic A $\beta$ , que es pot acumular formant les plaques amiloides típiques de l'MA (Balleza-Tapia & Peña 2009; Avila et al. 2010). Per altra banda, la inhibició metabòlica de la piruvat

deshidrogenasa (Pir DH) per la GSK3 $\beta$  pot produir una disfunció neuronal selectiva, ja que aquest enzim proporciona l'acetilCoA necessari per a la síntesi de l'ACh, la qual es deficitària en l'MA (Hoshi et al. 1996; Chen & Zhong 2013) (Fig.7).

### **2.2.5. PI3K/Akt**

Una de les proteïnes que es troben sobreexpressades en situacions d'estrès cel·lular és l'Akt o proteïna quinasa serina/treonina B (PKB). S'activa a través de la fosforilació depenent de la via de senyalització de la fosfatidil inositol 3-quinassa (PI3K), i un cop fosforilada en el residu Ser473 o en el residu Thr308, fosforila els seus substrats, tals com la Ser9 de la GSK3 $\beta$ , que inhibeix, la proteïna apoptòtica Bad, que també inactiva en fosforilar-li el residu Ser136, i les proteïnes apoptòtiques de la família FOXO, les quals també inhibeix (Del'Guidice & Beaulieu 2010; Altomare & Khaled 2012). A la vegada, l'Akt activa, per fosforilació, proteïnes antiapoptòtiques com per exemple el factor de transcripció CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*) o la quinasa IKK (*Ikb kinase*), la qual al seu torn activa el factor de transcripció NF-kB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), que regula l'expressió de determinats gens involucrats en processos immunitaris, inflamatoris, de desenvolupament i de creixement (Chan & Ye 2012) (Fig.8).

### **2.2.6. Sinaptofisina**

La sinaptofisina és una glicoproteïna integral de membrana de les vesícules sinàptiques, que es troben a les terminacions nervioses de l'axó o botons sinàptics de les neurones pre-sinàptiques. Hi ha estudis que demostren que la sinaptofisina està estretament relacionada amb la remodelació sinàptica, amb els processos cognitius i, a més, presenta un paper important en la plasticitat neuronal (Gordon & Cousin 2013).

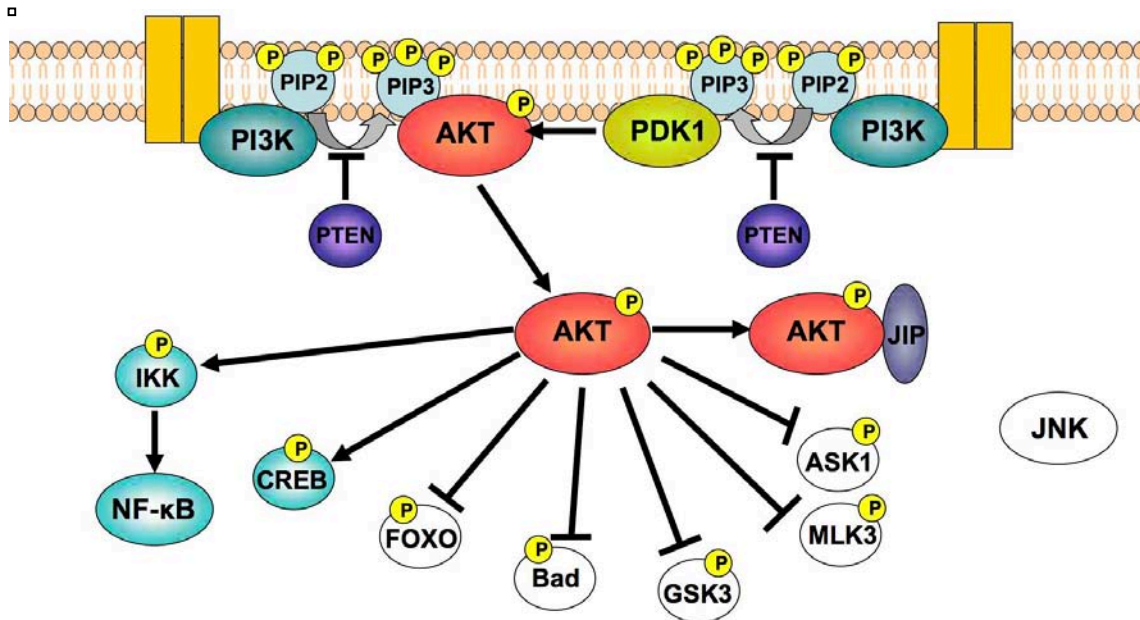


Fig.8 Via de la PI3K/Akt (Adaptat de D'Mello & Chin 2005).

### 3. LA NEUROINFLAMACIÓ EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER

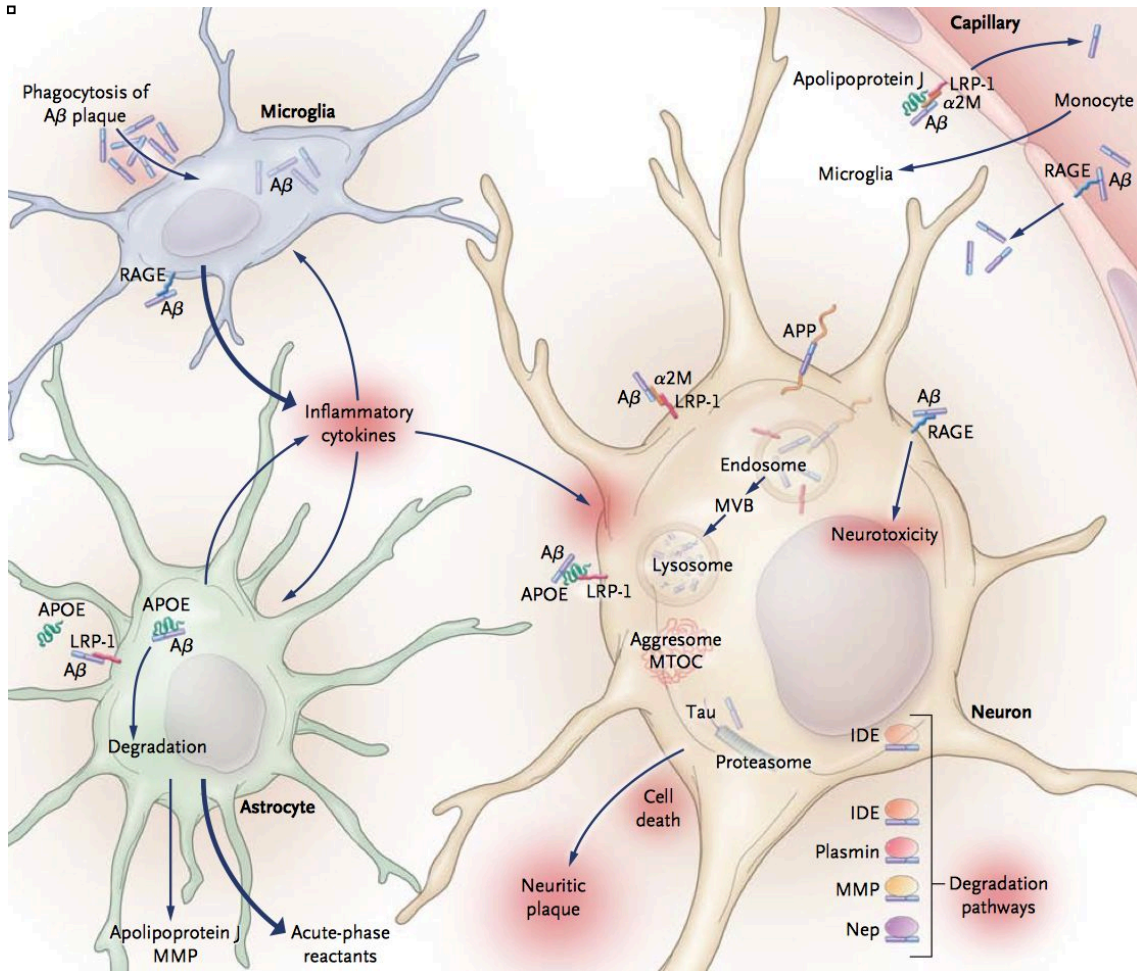
La neuroinflamació és un dels primers esdeveniments que apareixen en l'MA (Popp et al. 2009; Perry & Teeling 2013), i comporta l'activació de la micro- i la macròglia. La inflamació en l'Alzheimer acaba esdevenint un procés crònic causat principalment pel pèptid A $\beta$  i per l'envelliment del sistema immunitari (Herrup 2010; Pizza et al. 2011). L'A $\beta$  activa la micròglia (Cai et al. 2013) que contribueix al seu aclariment, tant de la forma soluble com de la fibril·lar, possiblement per diferents mecanismes (Lee & Landreth 2010). Al seu torn, les citocines IL-6 i TNF $\alpha$  generades durant el procés inflamatori i l'envelliment activen les cèl·lules microgials augmentant així la seva taxa de fagocitosi (Cunningham 2013). A la vegada, paradoxalment, la micròglia també pot contribuir a la deposició del pèptid A $\beta$  en ratolins transgènics (Wegiel et al. 2004). Per la seva part, l'eritropoetina, a través de la via de senyalització de les proteïnes Wnt en modula la seva activació (Shang et al. 2012), i hi ha estudis que demostren la regulació i implicació del sistema colinèrgic en la resposta immunitària innata, basant-se en l'augment dels nivells d'expressió de l'enzim AChE en les cèl·lules microgials activades (Vezzani et al. 2011). En cultius de

micròglia, l'AChE induïx canvis en la morfologia de les cèl·lules així com la regulació a l'alça de la iNOS (la isoforma induïble de la sintasa de l'òxid nítric) (von Bernhardt et al. 2003) (Fig.9). En aquest sentit, cal remarcar la importància dels IChE, els quals disminueixen la neuroinflamació associada a l'MA, tant per la pròpia inhibició de l'AChE, com pel conseqüent augment d'ACh disponible, la qual actua com a antiinflamatori (Ofek et al. 2007).

L'activació dels astròcits per part del pèptid A $\beta$ , entre d'altres, i la seva participació en la funció vascular cerebral, podria contribuir a la progressió de la malaltia (Merlini et al. 2011). L'aclariment de l'A $\beta$  per part dels astròcits sembla implicar la lipoproteïna de baixa densitat (LDL) i l'ApoE (Verghese et al. 2013) amb ambdues funcions, la protectora i la relacionada amb la malaltia, respectivament (Thal 2012). També s'ha vist que els astròcits a través de les citocines (l'interferó- $\gamma$ , el TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ ) afavoreixen la producció del pèptid A $\beta$ , i que les petites plaques poden derivar directament d'ells (Wakabayashi & Miki 2013; Meraz-Ríos et al. 2013) (Fig.9).

L'A $\beta$  també pot ser transportada a través de la barrera hematoencefàlica, drenada a nivell perivascular (amb el risc de que es formi una angiopatia amiloide congofilica), i fagocitada pels macròfags peri-vasculars enlloc de per la micròglia (Hawkes & McLaurin 2009; Malm et al. 2010; Lai & McLaurin 2012).

Les funcions específiques de la micro- i la macròglia, protectores o tòxiques, dependran dels múltiples sistemes de senyalització i seran modificades pels mateixos. L'envelliment de les cèl·lules i del sistema immunitari, les mutacions en les presinilines, la formació del pèptid A $\beta$  i dels cabdells neurofibril·lars, així com les possibles infeccions, són factors que poden desencadenar o ser desencadenats per la resposta inflamatòria. Per tant, el sistema immunitari pot contribuir al desenvolupament de la malaltia, o al contrari, actuar com a mecanisme de defensa (Solito & Sastre 2012).



**Fig.9 Neuroinflamació i mecanismes d'aclariment de l'Aβ.** La micròglia elimina el pèptid Aβ directament per fagocitosis. Els astròcits també participen en l'aclariment de l'Aβ, l'internalitzen a través de receptors i en faciliten la seva transferència a la circulació, fora de l'SNC. La micròglia i els astròcits són reclutats i estimulats en l'MA per alliberar citocines proinflamatòries (l'IL-1β, el TNFα) i reactants de fase aguda (les ROS i el NO). L'aclariment de l'Aβ també es produeix per proteòlisi enzimàtica (la neprilisina (Nep), l'enzim de degradació de la insulina (IDE), la matriu de metaloproteïnases (MMP)) (MOTC denota el centre de microtúbuls organitzats i MVB el cos multivesicular) (Adaptat de Querfurth & LaFerla 2010).

#### 4. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES PER A LA MALALTIA D'ALZHEIMER

Actualment, els únics fàrmacs aprovats per l'FDA (*Food and Drug Administration*) i l'EMA (*European Medicines Agency*) per al tractament de l'Alzheimer, intenten restablir l'equilibri d'aquells neurotransmissors alterats per culpa de la mort neuronal generalitzada. Aquests són els inhibidors de l'AChE (IAChE), que augmenten els nivells d'ACh en inhibir l'enzim responsable del seu metabolisme (tacrina, donepezil, rivastigmina i galantamina) (apartat 4.2) (Anand & Singh 2013), i la memantina, que en bloquejar els receptors NMDA impedeix la neurotransmissió glutamatèrgica, la qual està sobreactivada en els malalts d'Alzheimer (Wilkinson et al. 2013).

Altres fàrmacs utilitzats per millorar la funció colinèrgica són els agonistes dels receptors muscarínics  $M_1$ . Aquests receptors romanen gairebé intactes en els cervells dels pacients amb l'MA i per tant es consideren una diana terapèutica atractiva per al tractament de la malaltia. Milloren els símptomes de l'Alzheimer i es creu que retarden la progressió de la infermetat. Entre ells destaquen la xanomelina i la milamelina (Greig et al. 2013). També s'han descrit millores cognitives en models animals i una disminució dels nivells del pèptid A $\beta$  amb l'administració d'agonistes dels receptors nicotínics (Ni et al. 2013).

No obstant, les estratègies farmacològiques van enfocades principalment al pèptid A $\beta$  i a la proteïna tau hiperfosforilada. En el cas de l'A $\beta$ , s'intenten modular les proteases implicades en la seva formació, i/o evitar la seva agregació i promoure la seva eliminació. Pel que fa a la tau, es busquen molècules que inhibeixin les quinases responsables de la seva hiperfosforilació i que impedeixin la formació dels cabdells neurofibril·lars (Singh et al. 2012; Lemere 2013). Entre les aproximacions terapèutiques focalitzades en les secretases responsables del processament de l'APP, hi ha en fase d'estudi l'inhibidor de la  $\beta$ -secretasa KMI-429 (Singh et al. 2012), entre d'altres, i els inhibidors i/o moduladors de la  $\gamma$ -secretasa (GSIs i GSMs) (Golde et al. 2013). En el cas de la tau, els inhibidors de la GSK3 $\beta$  (quinasa implicada en la



hiperfosforilació d'aquesta proteïna) com ara el liti o l'àcid valproic, són les molècules que susciten més interès. També s'estan desenvolupant inhibidors de la quinasa Cdk5. Les vacunes en contra de l'A $\beta$  com l'ACC-001 de la *Janssen and Pfizer*, la CAD-106 de la *Novartis* o l'ACI-24 de l'*AC Immune* encara estan en fases d'estudi, i pel que fa a la immunoteràpia passiva, cal destacar els anticossos monoclonals anti-A $\beta$  (mAb) com l'AAB-03 (una nova versió del Bapineuzumab de la *Janssen and Pfizer*), el Solanezumab de la *Lilly*, el Crenezumab de l'*AC Immune*, el Gantenerumab de la *Roche*, el BAN2401 de la *BioArtic Neuroscience AB* i *Eisai Inc.* o el BIIB037 de la *Biogen Idec*. Altres immunoteràpies inclouen la immunoglobulina intravenosa (IVIg), composta per un *pool* d'anticossos humans, també en fase d'estudi, i la vacuna de la tau AADvac1 tau-peptide-KLH-conjugat de l'*Axon Neuroscience SE* (Lemere 2013).

Degut a la desregulació i a l'excés de calci intracel·lular que es produeix en les neurones dels malalts amb Alzheimer, provocat en part pel pèptid A $\beta$ , s'estan utilitzant antagonistes del calci com ara el nimodipino (Nimmrich & Eckert 2013), la flunarizina, el verapamilo i la tetrandrina pel tractament de l'MA. Altres estratègies s'han enfocat cap a l'estrès oxidatiu i la inflamació desencadenants apostant pels antioxidants tals com la capsaïcina, la melatonina (Polimeni et al. 2014), l'àcid lipoic, les flavones, els polifenols com la curcumina (Wang et al. 2013) i la vitamina E (Evans et al. 2014), i els antiinflamatoris no esteroïdals (AINE) (Enciu & Popescu 2013). Entre aquests últims destaquen la indometacina, l'AAS, l'ibuprofè i el naproxè. A la vegada, s'ha descrit que alguns AINE modulen l'activitat de la  $\gamma$ -secretasa disminuint la producció de l'A $\beta_{42}$ . També s'han proposat els inhibidors de la monoamino oxidasa B (MAO-B) com a possibles candidats per a la farmacoteràpia de l'MA, degut a la seva capacitat per inhibir el dany oxidatiu (selegilina) (Pazini et al. 2013). La MAO és una flavoproteïna present en la membrana mitocondrial externa de les cèl·lules neuronals i gials. La MAO pot existir en dues isoformes, l'A i la B. S'ha descrit que l'activitat de la MAO-B augmenta amb l'edat i es troba en concentracions elevades al voltant de les plaques senils. A més, en el transcurs de la desaminació oxidativa de les amines biògenes, la MAO-B produeix peròxid d'hidrogen i altres espècies ROS, fet que ha suggerit la seva possible

implicació en l'estrès oxidatiu associat a l'MA (Trillo et al. 2013). Altres estratègies proposen l'ús de fàrmacs quelants de ferro. S'han trobat alts nivells de ferro tant en les plaques amiloides com en els cabdells neurofibril·lars que poden estar implicats en la formació de radicals lliures i en la degeneració neuronal. El tractament amb quelants té com a objectiu eliminar l'excés de ferro que causa neurotoxicitat en el teixit cerebral (deferroxamina) (Jellinger 2013).

En base als coneixements adquirits en els últims anys en relació amb les bases moleculars de l'MA, perfils farmacològics com les estatines (Richardson et al. 2013), els antidiabètics (Alagiakrishnan et al. 2013), els antihipertensius (Yasar et al. 2013), els agents neurotròfics i neuroprotectors (Doi et al. 2013), els inhibidors de les caspases (Zhao et al. 2013) o els moduladors dels receptors AMPA (Piroette et al. 2013), entre altres, també s'han proposat com a possibles fàrmacs per al tractament de l'Alzheimer.

No obstant, i donada l'etiologia multifactorial de l'MA, les estratègies terapèutiques cada vegada més, van dirigides al desenvolupament de compostos "multidiana", i el que es busca és que un mateix fàrmac actuï a la vegada sobre diferents dianes terapèutiques, és a dir, dissenyar compostos capaços d'unir en una sola molècula diferents accions farmacològiques. Actualment hi ha múltiples combinacions com els compostos híbrids derivats de la tacrina que uneixen farmacòfors d'antiinflamatoris, antioxidants (Sun et al. 2013), inhibidors de la BACE1..., a una molècula de tacrina (Minarini et al. 2013), o les molècules antiinflamatòries i antiagregants d'A $\beta$  (Shi et al. 2013). D'entre aquests fàrmacs multifuncionals, cal destacar els IChE de lloc d'unió dual, heterodímers formats per almenys un farmacòfor d'un IChE, que inhibeixen tant el lloc actiu com el lloc perifèric de l'AChE, i per tant presenten a la vegada una acció colinèrgica i antiagregant del pèptid A $\beta$ . També inhibeixen la BACE1 (apartats 4.2.1. i 4.2.2.) (Viayna et al. 2013; Di Pietro et al. 2014).

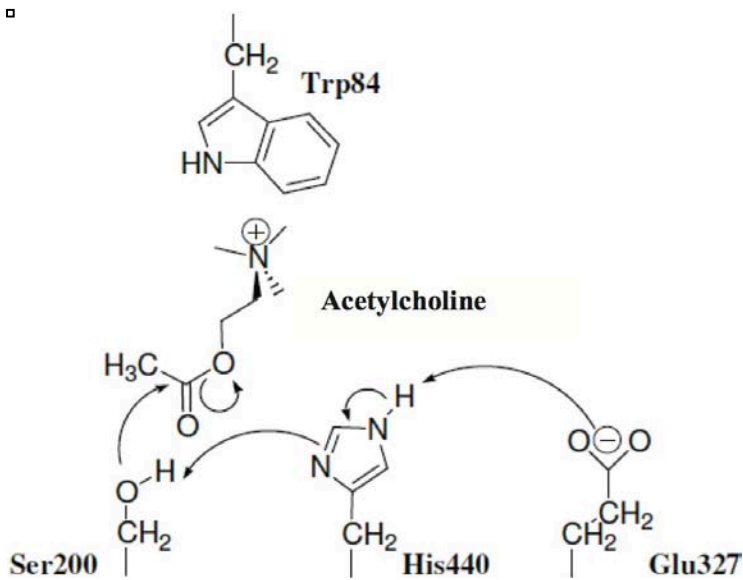
#### **4.1. Les colinesterases**

Les colinesterases, que inclouen l'acetilcolinesterasa (AChE) i la

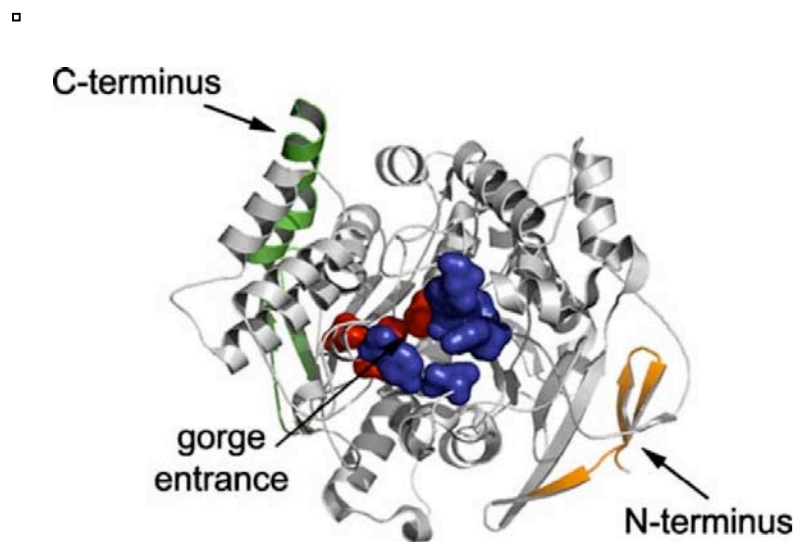
butirilcolinesterasa (BChE), són essencials en les sinapsis colinèrgiques responsables de les funcions cerebrals superiors tals com l'aprenentatge i la memòria, participen en el control de la comunicació neuromuscular i les activitats musculars, i serveixen com a component fisiològic característic de determinades condicions patològiques. L'AChE i la BChE inicialment es van identificar com a eficients hidrolases amb la capacitat d'hidrolitzar ràpidament l'ACh i la BCh, mostrant l'AChE una rapidesa i una potencia selectiva en la hidròlisi superior a la de la BChE. A la vegada, múltiples estudis suggereixen el paper vital de les colinesterases en altres funcions com ara la regulació de l'apoptosi i la inflamació convertint-les en nous focus d'interès (Ofek & Soreq 2013).

#### **4.1.1. L'acetilcolinesterasa**

L'acetilcolinesterasa (AChE) es caracteritza principalment per ser la hidrolasa que metabolitza l'ACh en l'SNC, produint una molècula d'acetat i una de colina que serà recaptada i reutilitzada per la neurona per a la síntesi de nou neurotransmissor. La seva estructura tridimensional va ser determinada per raigs X a partir de l'AChE de l'espècie *Torpedo californica* (TcAChE) pels doctors Sussman i Silman a l'institut Weizmann a Israel el 1991 (Sussman et al. 1991). El lloc actiu de l'enzim està constituït per una tríada catalítica (Ser220, His440 i Glu327) responsable de la hidròlisi del neurotransmissor i un lloc hidrofòbic aniònic localitzat a prop del lloc actiu (Trp84, Tyr130, Tyr330 i Phe330), que estableix la càrrega positiva de l'amoni quaternari de l'ACh i permet que el grup ester s'ubiqui davant del lloc actiu. El lloc actiu es localitza al final d'una gorja estreta de 20Å de profunditat constituïda majoritàriament per residus aromàtics (Phe288 i Phe290). A la boca de la gorja es troba el lloc aniònic perifèric, ric en residus hidrofòbics (Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 i Tyr334), responsable de la primera unió de l'ACh amb l'enzim, la qual dirigeix el neurotransmissor cap al lloc actiu situat al final de la gorja (Wlodek et al. 1996) (Fig.10 i Fig.11).



**Fig.10 Lloc actiu de l'AChE.** Esquema dels residus implicats en la hidròlisi de l'ACh (Adaptat de Cirilo et al. 2003).



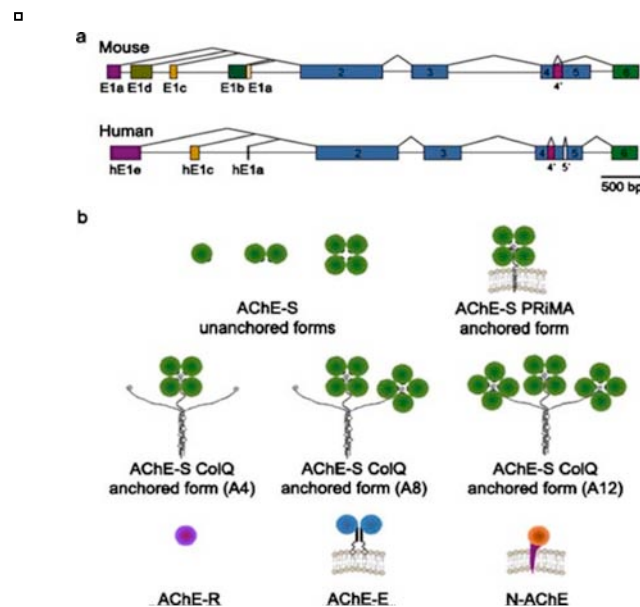
**Fig.11 Estructura tridimensional de la TcAChE (PDB 1GQS).** L'estructura plegada de la molècula es presenta amb els tres residus del lloc catalític en vermell i els cinc residus del lloc perifèric (PAS) en blau. El lloc catalític s'ubica a la part inferior de la gola i els residus aniònics a la seva entrada. La regió helicoïdal que condueix a la variable C-terminal es mostra en verd i el pèptid N-terminal en taronja (Adaptat de Zimmerman & Soreq 2006).

Existeixen múltiples isoformes de l'AChE obtingudes a partir de l'ús alternatiu del promotor del gen, dels *splits* alternatius dels mRNA pre-AChE naixents, de

la multimerització de les subunitats individuals de l'AChE, i de la seva associació amb els diferents ancoratges o proteïnes associades. L'ús alternatiu del promotor juntament amb l'*splicing* alternatiu modifiquen els extrems 5' i 3' dels mRNA de l'AChE, i permeten la formació de sis subunitats proteiques distintes en combinar les tres variants C-terminal amb les dues variants N-terminal. Els tres extrems carboxi diferents donen lloc a les isoformes S o sinàptica (la qual també s'anomena T o *tailed*), E o eritrocítica (també anomenada H o hidrofòbica), i R o *readthrough*. Els dos extrems amino distint (comú i extens) determinen que hi hagi dos variants de cada isoforma, la curta i la llarga (Meshorer & Soreq 2006) (Fig.12). Mentre que el domini catalític de totes les isoformes de l'AChE es manté invariable, les propietats dels diferents pèptids terminals alteren varies de les característiques clau de la proteïna. Una de les característiques de l'AChE-S, la forma majoritària de l'SNC, és el residu de cisteïna en la regió C-terminal, a tres aminoàcids del final de la proteïna. Aquest residu de cisteïna permet la unió disulfur amb d'altres unitats d'AChE-S, donant lloc a homodímers amfipàtics i homotetràmers. Més enllà de la seqüència d'aminoàcids, l'AChE-R es diferencia de l'AChE-S en dues característiques: (1) és hidrofílica, i (2) al faltar-li el residu de cisteïna present a l'extrem carboxi de l'AChE-S, aquesta no pot tetrameritzar amb altres subunitats a través de les unions disulfur. Així, l'AChE-R és una molècula soluble monomèrica, enlloc de ser un tetràmer amfipàtic compost per dímers com és el cas de la majoria de molècules d'AChE-S (Zimmerman & Soreq 2006).

Els tetràmers d'AChE-S s'associen amb una o dues molècules d'ancoratge a la membrana, les quals determinen en part la localització sinàptica de la proteïna: el col·lagen Q (ColQ) a les junctures neuromusculars, i la proteïna de membrana rica en prolines (PRiMA, *proline-rich membrane anchor*) a les sinapsis cerebrals. Les unitats de ColQ homotrimeritzen per formar una estructura helicoidal triple en el domini ric en prolines a l'extrem carboxi. Cada ColQ pot adjuntar un tetràmer d'AChE, de tal manera que els complexos hetero-oligomèrics poden contenir quatre, vuit o dotze subunitats d'AChE, anomenades A4, A8 o A12, respectivament. La glicoproteïna PRiMA, al seu torn, indueix la formació

d'homotetràmers d'AChE i els adjunta a través d'un motiu ric en prolina, mantenint-los ancorats a la membrana cel·lular a través d'un domini transmembrana. Les formes de l'AChE amb un ancoratge PRiMA representen entre el 70 i el 90% del total de l'activitat de l'AChE a l'SNC, l'altre 10-30% s'explica per les formes asimètriques; i sense condicions d'estrès, l'1% és degut a l'AChE-R. Els tetràmers d'AChE associats a PRiMA s'anomenen G4 (per ser globulars), i els monòmers i homodímers no associats a cap proteïna d'ancoratge s'identifiquen com a G1 i G2, respectivament (Fig.12b).



**Fig.12 Estructura dels gens de l'AChE i proteïnes resultants.** a) Exons i introns dels gens de l'AChE de ratolí i humana (cilindres: exons, línies: introns, línies per sobre dels gens: opcions d'*splicing*). A partir dels *splicings* alternatius de l'mRNA pre-AChE s'obtenen diferents transcrits que es tradueixen en sis subunitats proteïques diferents. b) Proteïnes resultants del gen de l'AChE. Les unitats d'AChE poden dimeritzar, tetrameritzar o quedar-se com a monòmers. Els tetràmers d'AChE poden romandre solubles o ancorar-se a la membrana mitjançant les molècules ColQ o PRiMA. L'AChE-R roman de forma inherent com a monòmer soluble. L'AChE-E forma dímers glipiats (lligats covalentment a una molècula de glicosilfosfatidilinositol) ancorats a la membrana dels glòbuls vermells (Adaptat de Zimmerman & Soreq 2006).

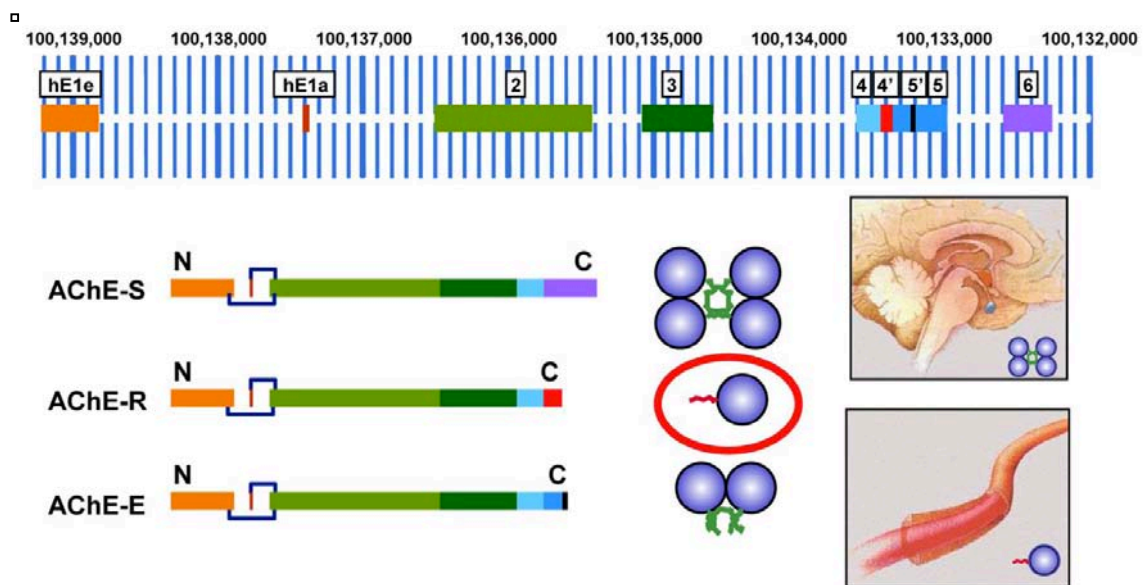
L'AChE-R no té un domini hidrofòbic i és incapaç d'unir-se a ColQ o a PRiMA, per tant segueix essent soluble, i la seva forma secretada mostra una major mobilitat que l'AChE-S (Soreq & Seidman 2001; Sigoillot et al. 2010).

#### **4.1.1.1. El Model molecular alterat de l'AChE en la malaltia d'Alzheimer**

La composició de l'AChE en l'SNC està subjecte als canvis dinàmics dels diversos estímuls cel·lulars i fisiològics. Un augment gradual de l'AChE acompanyat d'un canvi de la isoforma G1 a la forma adulta G4 durant l'embriogènesi ha estat àmpliament descrit en molts organismes (Anselmet et al. 1994). De forma recíproca, la pèrdua dels circuits colinèrgics característica de l'MA es reflecteix en la reducció de l'activitat acetilcolinesteràsica acompanyada per un augment de les fraccions monomèriques en el líquid cefaloraquídic (LCR) i en diversos nuclis cerebrals. Els canvis es correlacionen amb la gravetat clínica de la malaltia, la qual cosa suggereix la seva rellevància fisiològica (Darreh-Shori et al. 2004). Curiosament, varies àrees del cervell dels malalts d'Alzheimer mostren una pèrdua selectiva de la forma tetramèrica de l'AChE, i la sobrerregulació de les formes asimètriques, reduint en gran mesura la relació entre les isoformes G4 i G1 en diverses regions cerebrals (Greenberg et al. 2010). Estudis en pacients d'Alzheimer tractats amb anticolinesteràsics mostren un augment de la isoforma G1 que es correlaciona amb la sobrerregulació de l'AChE-R (Darreh-Shori et al. 2004) (Fig.13).

La importància fisiològica de l'expressió en els primers estadis de vida, i sostinguda, de la forma embrionària G1 podria estar relacionada amb les funcions de desenvolupament tals com la diferenciació neuronal, la regulació del creixement cel·lular o l'adhesió cel·lular atribuïdes a l'AChE. Aquestes funcions possiblement depenen més de les interaccions proteïna-proteïna que de l'activitat catalítica de l'enzim (Paraoanu et al. 2006). Segons això, s'ha suggerit que l'AChE en l'MA podria ser similar a l'AChE embrionària, i que podria reflectir l'activació dels mecanismes de reparació en els cervells amb Alzheimer. S'especula que la forma G1 de l'AChE presenta un paper no colinèrgic durant el desenvolupament del cervell (Layer et al. 2013). Els

mamífers sans presenten una marcada sobreexpressió de l'AChE-R en el còrtex, l'hipocamp, l'estriat i el cerebel quan estan exposats a varis estímuls d'estrès (Livneh et al. 2010). Aquesta sobreexpressió depèn de l'augment del factor d'*splicing* SC35 que es dona durant l'estrès i es manté varies setmanes (Meshorer et al. 2005). Un augment similar de l'AChE-R es produeix durant els tractaments amb corticosterona, organofosforats o amb els IACHÉ piridostigmina i fisostigmina (Jameson et al. 2007).



**Fig.13 L'estrès modifica la composició de l'AChE.** Es mostren els canvis C i N-terminals que donen lloc a les diferents variants de l'AChE. La variant monomèrica soluble AChE-R, produïda en aquells teixits que expressen aquest gen, s'acumula en condicions d'estrès i es troba en circulació, tot i que és menys estable que l'AChE-S. El C-terminal marcat en vermell de l'AChE-R representa el pèptid hematopoètic ARP (Adaptat de Gilboa-Geffen et al. 2012).

#### 4.1.1.2. L'AChE i l'apoptosi

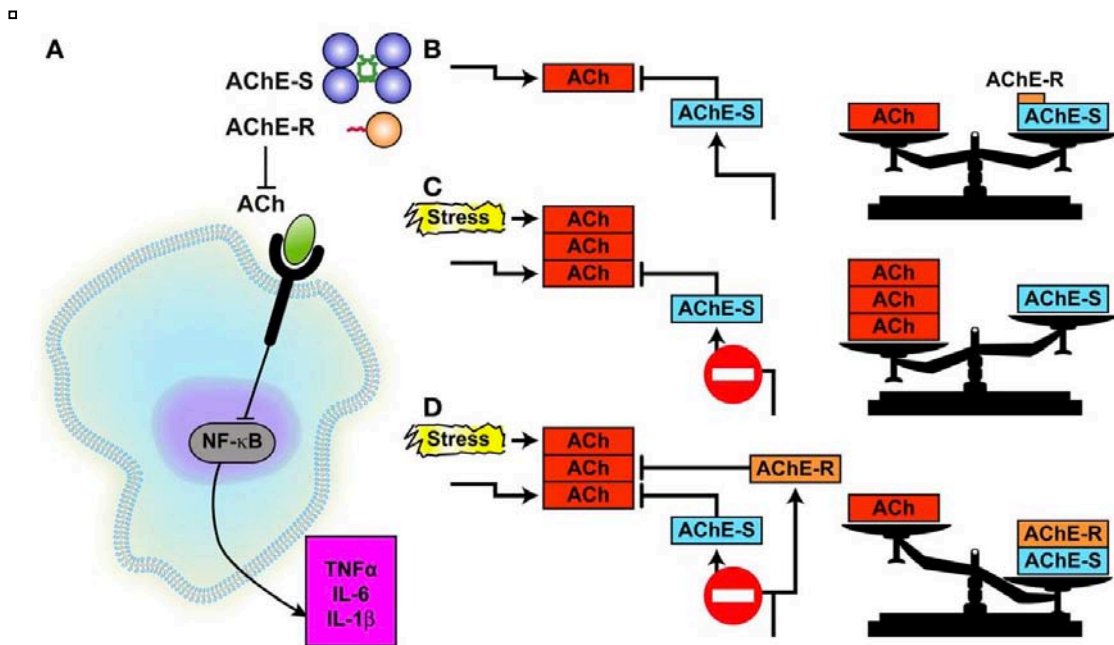
El gen de l'AChE presenta patrons d'*splicing* diferents en condicions d'estrès, inflamació i apoptosi (Meshorer & Soreq 2006; Zhang & Greenberg 2012). Sota condicions d'estrès s'activen tant les fibres pre-ganglionars simpàtiques com el sistema septohipocampal, secretant grans quantitats d'ACh tant en el sistema



nerviós perifèric (SNP) com en l'SNC. Aquesta secreció massiva activa els receptors nicotínics que permeten l'afluència dels ions  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  dins de la cèl·lula. La despolarització causada per aquest influx activa, entre altres, els canals de calci dependents de voltatge. L'augment del calci intracel·lular actua sobre els CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*) o elements de resposta d'unió a cAMP que promouen la transcripció de determinats gens com ara el c-fos. Diverses proteïnes involucrades en el metabolisme de l'ACh inclouen llocs de resposta al factor c-fos en els seus promotors, essent la seva transcripció regulada a la alta o a la baixa poc després de l'inici de la cascada de senyalitzacions en resposta a l'estrès, recolzant la idea de què poden contrarestar la hiperexcitació colinèrgica. Entre aquests canvis d'expressió gènica hi ha la inducció selectiva de l'expressió de la isoforma R de l'AChE, de igual capacitat catalítica que la isoforma S, però minoritària, més inestable i més mòbil (Shaked et al. 2008) (Fig.13 i Fig.14).

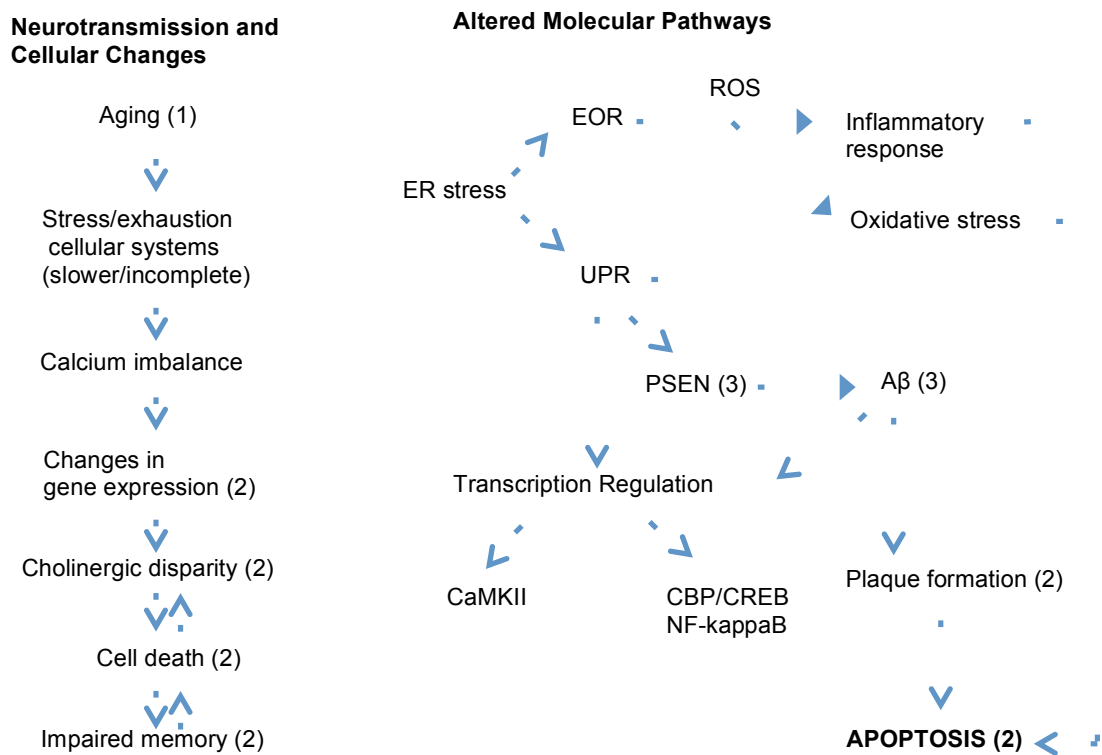
Diferents estudis convergeixen en la idea de què la desregulació del calci està implicada en la sobreexpressió de l'AChE-R, tot i que no ha de ser necessàriament desencadenada pels receptors de l'ACh. Hi ha experiments que demostren la secreció d'AChE-R en talls de *substantia nigra* sobreexcitada. Els efectes dels receptors NMDA sobre l'AChE-R per exemple, són directes, a través de l'acció dels motius CREB del promotor del gen de l'AChE, involucrant la sobrerregulació del gen c-fos, o a través d'altres elements activadors del promotor (com els elements de resposta a glucocorticoides) (Li et al. 2013).

L'AChE-R que es manté a l'espai intracel·lular interactua a través del pèptid ARP amb altres proteïnes senyalitzadores promovent la proliferació cel·lular. *Ex vivo*, el pèptid ARP és més efectiu que el cortisol i igual d'efectiu que el factor de les cèl·lules mare en promoure l'expansió i la diferenciació de les cèl·lules progenitores hematopoètiques en els llinatges mieloide i megacariòcit (Johnson & Moore 2007).



**Fig.14 L'AChE controla el reflex antiinflamatori i la resposta a l'estrès.** A) A l'espai extracel·lular, tant l'AChE-S com l'AChE-R hidrolitzen l'ACh impedit la seva capacitat de bloquejar, a través dels receptors nicotínics  $\alpha 7$ , l'activació del factor NFκB que permet la secreció de citocines proinflamàtòries (bloquegen l'anomenat "reflex antiinflamatori" mediat per l'ACh). B) En condicions normals l'AChE-S és la isoforma predominant i manté un equilibri amb l'ACh, essent l'AChE-R el component minoritari. C) En situacions d'estrès, l'excés d'ACh desestabilitza l'equilibri colinèrgic. D) La substitució de l'AChE-S per l'excés d'AChE-R que es comença a sintetitzar donades les condicions facilita la hidròlisi de l'ACh, canviant el desequilibri cap a l'excés d'AChE (Adaptat de Gilboa-Geffen et al. 2012).

Cal afegir que la variant sinàptica AChE-S intracel·lular es pot trobar en els nuclis de les cèl·lules apoptòtiques formant part de l'apoptosoma. L'excés d'AChE-S podria conduir a l'activació de les vies proteolítiques específiques de les neurones colinèrgiques, les primeres neurones danyades en l'MA. També s'ha demostrat que un excés d'AChE-S promou la sobreproducció d'ACh mimetitzant les condicions de l'estrès fisiològic (Lu et al. 2013). Hi ha estudis que demostren que la variant AChE-S amb extensió de l'extrem amino indueix l'activació de la GSK3β i la hiperfosforilació de la tau (Jing et al. 2013) (Fig.15).



**Fig.15 Canvis en la neurotransmissió. Vies moleculars alterades en l'MA.** Els canvis que es donen en condicions d'estrès porten a la disrupció de l'homeòstasi del calci, afectant l'expressió gènica, i provocant una disparitat colinèrgica que desencadena la mort cel·lular. A nivell molecular, l'estrès provoca la desregulació de les presenilines facilitant la producció de l'A $\beta$  en el reticle endoplasmàtic (ER). El pèptid A $\beta$  es diposita en plaques al voltant de les neurones colinèrgiques, que expressen nivells alts d'AChE. Aquest procés comporta la mort cel·lular colinèrgica. Les respostes de les proteïnes malplegades (UPR, *unfolded protein response*), del reticle endoplasmàtic (EOR, *ER overload response*) i de les espècies reactives de l'oxigen (ROS) provoquen reaccions inflamatòries i més estrès oxidatiu. (1)=factor de risc, (2)=procés que implica l'AChE, (3)=gens amb mutacions que porten a l'MA familiar) (Adaptat de Toiber & Soreq 2005).

#### 4.1.1.3. L'AChE i el processament de l'APP

Estudis recents també indiquen que l'AChE pot modular el processament de l'APP i la producció de l'A $\beta$  (Hicks et al. 2013). Com ja s'ha comentat, el pèptid A $\beta$  és el resultat de l'acció successiva de dos enzims proteolítics, la  $\beta$ -secretasa i la  $\gamma$ -secretasa, sobre l'APP. El component proteolític actiu del complex  $\gamma$ -secretasa és la presenilina 1 (PS1). Mutacions en la PS1 causen

l'aparició precoç de l'MA amb un ritme accelerat de deposicions del pèptid A $\beta$ . Hi ha estudis que demostren que existeix una interacció entre l'AChE i la PS1 per co-immunoprecipitació recíproca (Silveyra et al. 2008). S'ha publicat que la sobreexpressió de l'AChE augmenta els nivells de la PS1, mentre que les cèl·lules transfectades amb siRNA per l'AChE, és a dir, les cèl·lules AChE knock-down tenen els nivells de PS1 disminuïts (Silveyra et al. 2012). Per tant, l'AChE participa en un cicle degeneratiu que potencia el processament amiloidogènic de l'APP. A la vegada, en l'MA, és possible que l'A $\beta$  indueixi un bucle de feedback que porti al processament de l'APP per la via amiloidogènica. Hi ha estudis que indiquen que l'A $\beta_{42}$  pot induir un augment dels nivells de PS1 en cultius de neurones creant un bucle tòxic (Matrone et al. 2008).

#### **4.1.1.4. Interaccions de l'AChE amb els agregats del pèptid A $\beta$**

El 1996 es va descobrir que l'AChE era capaç d'accelerar l'assemblatge del pèptid A $\beta_{40}$  en fibril·les en disminuir el temps de latència d'agregació dels pèptids, i es va suggerir el paper de l'AChE com a xaperona capaç d'induir el canvi de conformació del pèptid A $\beta$  no amiloidogènic a la forma amiloidogènica o confòrmer ric en estructures de fulla plegada  $\beta$  amb tendència a agregar-se (Inestrosa et al. 1996). Aquests resultats suggerien que l'enzim actuava a través de dos mecanismes possibles. En primer lloc, augmentava les llavors necessàries per a la nucleació i en segon lloc, estimulava l'elongació de les fibril·les amiloides (Harper et al. 1997) (Fig.2). Quan l'oligòmer d'A $\beta$  es va avaluar amb el colorant thioflavina-S (ThS) juntament amb l'activitat de l'AChE, els resultats van mostrar que l'enzim estava fortament associat amb els dipòsits amiloides, tal i com descriuen Geula i Mesulam per a les plaques senils en els pacients d'Alzheimer (Geula & Mesulam 1989). Per provar aquesta idea *in vivo*, Brimijoin, Younkin, i Soreq van generar els ratolins doble transgènics per l'APP<sup>swe</sup> i l'AChE humana. L'AChE promovia l'acumulació de les plaques amiloides en els cervells dels ratolins transgènics, donant suport a la noció d'implicació causal de l'AChE en el procés de formació de fibril·les (Rees et al. 2003; Rees et al. 2005). Altres estudis posen de manifest la capacitat de l'AChE per augmentar l'agregació de les proteïnes amiloidogèniques PrP106-

126 (Pera et al. 2006) i PrP82-146 (Pera et al. 2009).

Estudis cinètics demostraven que els valors de la  $K_m$  i la  $V_{m\grave{a}x}$  de l'ACHÉ associada al pèptid  $A\beta$  eren més elevats que els que presentava l'enzim sol (Geula & Mesulam 1989). I els mateixos estudis fets sota diferents condicions de pH mostraven que el complex AChE- $A\beta$  era més resistent a pHs baixos que l'enzim lliure. De forma similar, l'ACHÉ associada al pèptid  $A\beta$  era més resistent a les incubacions amb l'ACh a concentracions altes que l'enzim sol (Alvarez et al. 1998; Inestrosa et al. 2005). Estudis farmacològics del complex AChE- $A\beta$  demostraven que l'ACHÉ en aquestes condicions era més resistent a l'acció dels anticolinesteràsics. Es va observar en els resultats obtinguts amb els inhibidors del lloc actiu de l'enzim tacrina i edrofoní, i amb els blocadors del lloc aniònic perifèric (PAS) propidi i galamina, que es requeria una concentració més alta d'inhibidor per produir el mateix efecte observat amb l'enzim sol. Per tant, l'associació de l'ACHÉ amb les fibril·les d' $A\beta$  fa que canviïn les propietats enzimàtiques de l'ACHÉ, en absència de cap alteració patològica de l'enzim (Inestrosa & Alarcón 1998).

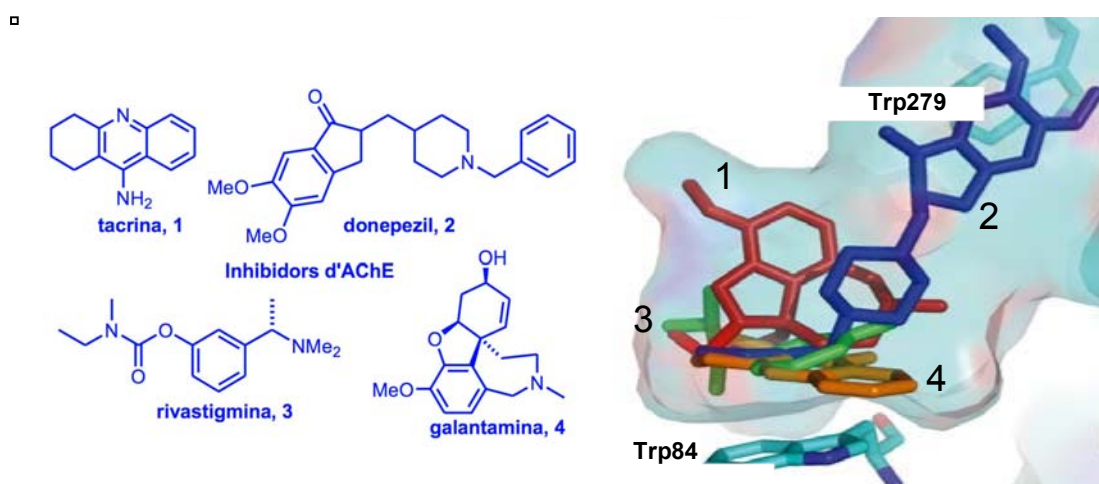
Els experiments d'agregació en presència d'ACHÉ que actuaven tant sobre el lloc actiu com sobre el lloc perifèric de l'enzim, van demostrar que només aquells compostos capaços de bloquejar el lloc perifèric o PAS inhibien l'efecte proagregant de l'ACHÉ. El propidi i la fasciculina, inhibidors selectius del lloc perifèric, frenaven l'efecte agregant de l'ACHÉ sobre el pèptid  $A\beta$  (Bartolini et al. 2003; Inestrosa et al. 2008), i en canvi, l'edrofoní, un inhibidor del lloc actiu de l'ACHÉ, no produïa cap efecte sobre la capacitat de l'ACHÉ d'accelerar el procés d'agregació de l' $A\beta$  (Inestrosa et al. 2008). Es va identificar un pèptid de 3.5 kDa localitzat a prop del lloc perifèric, el qual era capaç de mimetitzar l'efecte proagregant de l'ACHÉ (De Ferrari et al. 2001). Per entendre el mecanisme d'interacció entre l'ACHÉ i el pèptid  $A\beta$ , Vaux et cols. (2008) van estudiar un pèptid de 14 residus anomenat AChE<sub>586-599</sub>, el qual correspon a una regió del domini d'oligomerització de l'extrem C-terminal de l'ACHÉ humana (Jean et al. 2008). La regió que abasta l'AChE<sub>586-599</sub> comparteix homologia amb l' $A\beta$  i presenta una alta propensió a convertir-se en l'estructura no nativa de

fulla plegada  $\beta$ , una propietat associada a l'amiloidogènesi (Greenfield et al. 2008; Belli et al. 2011). Considerant les observacions experimentals i els models d'assemblatge de d'altres sistemes amiloides, es va proposar un model per l'assemblatge de l'AChE<sub>586-599</sub> en el que una cremallera estèrica formada per diverses interaccions específiques (hidrofòbiques, electrostàtiques, catió- $\pi$ , SH-aromàtic, quelació de metalls i polar-polar) mantindria juntes les fulles  $\beta$ . La dissecció del reconeixement molecular específic que porta a l'assemblatge amiloide de l'AChE<sub>586-599</sub> ajuda a entendre aquest procés, diana farmacològica de les malalties amiloidogèniques (Belli et al. 2011).

Tenint en compte que la presència de plaques senils en el cervell de les persones d'edat avançada no necessàriament comporta els símptomes de l'MA, la presència d'AChE en les plaques amiloides podria jugar un paper clau en el desencadenament dels esdeveniments citotòxics que es produeixen al voltant de les plaques madures en l'MA (Alkalay et al. 2013). Assaigs *in vitro* amb cèl·lules PC12 van mostrar que els agregats formats pels complexos AChE-A $\beta$ <sub>40</sub> eren més tòxics que aquells formats només pel pèptid A $\beta$ <sub>40</sub>, i que la neurotoxicitat depenia de la quantitat d'AChE unida als complexos, suggerint d'aquesta manera que l'AChE podria tenir una funció clau en els canvis neurodegeneratius observats en l'MA (Muñoz & Inestrosa 1999). Estudis amb neurones d'hipocamp de rata mostraven que les neurones tractades amb els complexos AChE-A $\beta$  presentaven una ret neuronal molt més interrompuda que aquelles tractades solament amb el pèptid A $\beta$  (Alvarez et al. 1998). Com ja s'ha comentat, els oligòmers i les fibril·les d'A $\beta$  indueixen la desregulació intracel·lular del calci que porta a l'apoptosi a través de la disfunció mitocondrial, mitjançant la interacció directa amb la mitocòndria isolada, o per associació indirecta amb la membrana neuronal. Hi ha estudis que indiquen que el tractament amb els complexos AChE-A $\beta$  afecta més a la diferència de potencial de la membrana mitocondrial que el tractament amb el pèptid A $\beta$  sol (Dinamarca et al. 2010).

## 4.2. Els inhibidors de l'AChE

Ja s'ha comentat anteriorment que els únics fàrmacs aprovats per l'FDA i l'EMA per a l'MA són els inhibidors de l'AChE tacrina, donepezil, rivastigmina i galantamina, i un antagonista dels receptors NMDA del glutamat, la memantina (Fig.16).



**Fig.16** Els IACHe acceptats per l'FDA i l'EMA i el seu mode d'unió amb la TcAChE (tacrina, vermell; donepezil, blau; rivastigmina, verd; galantamina, taronja) (Adaptat de Galdeano 2012).

Estudis de difracció de raigs-X de monocristalls amb *TcAChE* han permès conèixer el seu mode d'unió a l'AChE (Harel et al. 1993; Greenblatt et al. 1999). La tacrina i la galantamina es col·loquen en el centre actiu de l'enzim i duen a terme interaccions no covalents, i per tant reversibles, amb diferents residus propis del centre actiu com el Trp84. La rivastigmina també es col·loca en el centre actiu de l'enzim, però modifica de forma covalent el residu Ser200, l'enzim es regenera més lentament i per tant se'l considera un inhibidor pseudo-reversible. El donepezil és un inhibidor mixt i presenta un mode d'unió clarament diferenciat. La molècula de donepezil ocupa tota la gorja catalítica de l'AChE interaccionant amb residus del centre actiu i de la gorja de l'enzim, i amb el residu Trp279, característic del lloc perifèric (Fig.16). Aquests fàrmacs constitueixen actualment la medicació més efectiva per a la millora a curt

termini (de 6 a 12 mesos) de l'activitat cognitiva i funcional, i presenten perfils de seguretat i tolerabilitat favorables. No obstant, els resultats observats són modestos (només fan efecte a una tercera part dels pacients), presenten efectes secundaris colinèrgics i es contemplan com un tractament merament simptomàtic donat que sembla que no modifiquen el curs de la malaltia, com podrien fer-ho teràpies dirigides al pèptid A $\beta$  o a frenar la fosforilació de la tau.

Per altra banda, estudis realitzats *in vitro* i *in vivo* enfront d'una varietat d'estímuls neurotòxics demostren un efecte neuroprotector per part d'aquests inhibidors, i en especial per part del donepezil. S'ha descrit que presenten efectes protectors davant de l'excitotoxicitat induïda pel glutamat i per l'NMDA (Shen et al. 2010), enfront de la toxicitat induïda per l'A $\beta$  (Noh et al. 2013; H. G. Kim et al. 2014), davant del peròxid d'hidrogen (Huang et al. 2012) i enfront de privació d'oxigen i de glucosa (Akasofu et al. 2008). En un estudi d'MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) en què es comparava el volum dels hipocamps de pacients tractats amb el donepezil durant un any amb el de pacients no tractats, la proporció mitjana d'atrofia hipocampal va resultar ser d'un 3,82% en el grup tractat amb el donepezil enfront del 5,04% del grup control (Hashimoto et al. 2005), evidenciant la capacitat neuroprotectora d'aquest compost i la capacitat per tant de modificar i alentir el progrés de la malaltia. A la vegada, l'activació dels receptors colinèrgics M<sub>1</sub> i M<sub>3</sub>, relacionats amb els processos cognitius i neuroprotectors, ja sigui per part d'agonistes selectius o de forma indirecta per part dels IAcHE, pot estimular el processat no amiloidogènic de l'APP a través de la proteïna quinasa C (PKC), la tirosin-kinasa i la proteïna quinasa mitogen-activada (MAPK) (Davis et al. 2010). I sembla que l'estimulació dels receptors nicotínics subtipus  $\alpha 7$  i  $\alpha 4\beta 2$  indueix l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl2 (Nordberg 2006).

#### **4.2.1. El desenvolupament d'inhibidors de l'AcHE de lloc d'unió dual**

Els descobriments d'Inestrosa (4.1.1.4.), els quals evidencien la interacció directa entre l'enzim AcHE i el pèptid A $\beta$  a través del lloc perifèric de l'enzim, han guiat el disseny d'inhibidors d'AcHE en l'última dècada. L'enzim AcHE



actua de xaperona patològica induint el canvi conformacional de l'A $\beta$  cap a la forma amiloidogènica, i n'accelera el seu procés d'agregació i de formació de fibril·les amiloides. A la vegada també n'augmenta la seva neurotoxicitat (Inestrosa et al. 1996). Aquestes observacions han permès el desenvolupament d'IChE, que a part d'inhibir el metabolisme de l'ACh, són capaços de bloquejar la interacció directa entre l'enzim i el pèptid A $\beta$ , i com a conseqüència la seva agregació i neurotoxicitat. Aquest tipus d'inhibidors que interaccionen simultàniament amb els dos llocs d'unió de l'enzim (el lloc catalític i el lloc perifèric) s'anomenen IChE de lloc d'unió dual (Viayna et al. 2013). Dels quatre IChE comercialitzats, l'únic que presenta un lloc d'unió dual és el donepezil, del qual s'ha descrit un efecte antiagregant del pèptid A $\beta$  *in vitro* del 22% a una concentració de 100  $\mu$ M, que si bé està lluny del percentatge d'inhibició de l'inhibidor específic del lloc perifèric propidi (un 82% d'inhibició a una concentració de 100  $\mu$ M), és clarament superior al percentatge d'inhibició dels inhibidors del centre actiu com la tacrina (un 7% d'inhibició) (Bartolini et al. 2003).

El disseny i el desenvolupament de nous compostos amb aquest mode d'unió es basa en combinar en una mateixa molècula una unitat o fragment estructural d'un inhibidor de l'IChE per a la interacció amb el centre actiu, i una segona unitat del mateix (dimerització molecular) o d'un altre (hibridació molecular) inhibidor per a la interacció amb el lloc perifèric, connectant les dues unitats constituents del dímer o de l'híbrid amb una cadena espaiadora o *linker* de longitud adequada per permetre la interacció simultània amb ambdues zones d'unió de l'enzim. El primer IChE de lloc d'unió dual dissenyat com a tal va ser la *bis(7)*-tacrina, constituït per dues unitats de tacrina connectades per una cadena espaiadora de 7 grups metilens, distància ideal per a la interacció simultània de les dues unitats de tacrina amb els dos llocs d'unió a l'enzim (Pang et al. 1996). La potència inhibidora de la *bis(7)*-tacrina és unes 150 vegades superior a la de la tacrina, i inhibeix l'agregació del pèptid A $\beta$  induïda per l'IChE amb un 68% d'inhibició a 100  $\mu$ M (Bolognesi et al. 2007). Seguint el disseny de la *bis(7)*-tacrina s'han desenvolupat altres famílies estructurals d'IChE de lloc d'unió dual (Cavalli et al. 2008; Muñoz-Torrero 2008; Galdeano

et al. 2010). Són compostos que presenten valors d'IC<sub>50</sub> de rang nanomolar i picomolar, i que són capaços d'inhibir *in vitro* l'agregació de l'Aβ induïda per l'AChE a concentracions d'inhibidor de 100 μM en percentatges elevats. Per combinar les dues activitats, la inhibició enzimàtica i l'antiagregant, s'han d'administrar a uns valors d'IC<sub>50</sub> de rang micromolar.

## **4.2.2. Les huprines i els heterodímers**

### **4.2.2.1. Les huprines**

Amb l'objectiu d'incrementar l'afinitat dels IChE pel lloc actiu de l'enzim, Camps et cols. van iniciar als anys 90, el disseny, la síntesi i l'avaluació farmacològica d'una família d'inhibidors reversibles del centre actiu de l'AChE anomenats huprines. Les huprines combinen a la mateixa molècula el sistema 4-aminoquinolina de la tacrina i el sistema carbocíclic de la (-)-huperzina A (Fig.17). D'entre les més de 30 huprines diferents sintetitzades, les que van demostrar un millor perfil farmacològic van ser les (-)-huprines X i Y (IC<sub>50</sub>=0.32 nM) ambdues amb un clor en la posició 3. Van presentar una constant d'inhibició (K<sub>i</sub>) per l'AChE humana (hAChE) recombinant d'uns 30 pM, posant de manifest que la seva afinitat per l'enzim era fins a 1200 cops superior a la de la tacrina, 180 cops superior a la de la (-)-huperzina A, i 40 cops superior a la del donepezil. A més a més, experiments *ex vivo* van demostrar la capacitat de les huprines per travessar la barrera hematoencefàlica (BHE) i inhibir l'AChE del cervell de rates amb una potència molt superior a la de la tacrina, la (-)-huperzina A i el donepezil (Badia et al. 1998; Camps et al. 2000; Muñoz-Torrero & Camps 2006).

Estudis recents mostren que la huprina X (HX) millora la cognició en ratolins transgènics per l'Alzheimer (Ratia et al. 2013), i presenta efectes neuroprotectors (juntament amb l'HY i l'HZ) enfront del peròxid d'hidrogen en cèl·lules PC12 diferenciades i sense diferenciar (Pera et al. 2013). També s'ha demostrat que és capaç de disminuir els nivells del pèptid Aβ en cervells de ratolins 3xTg-AD, a més d'incrementar els nivells de la sinaptofisina (Hedberg

et al. 2010). *In vitro*, disminueix l'agregació amiloidogènica induïda per l'AChE (Pera et al. 2006) i potencia l'efecte dels receptors nicotínics en sinaptosomes corticals de rata (Roman et al. 2004). Les huprines presenten una acció agonista sobre el receptor M<sub>1</sub> en cervell de rata (Roman et al. 2002; Alcalá et al. 2005).

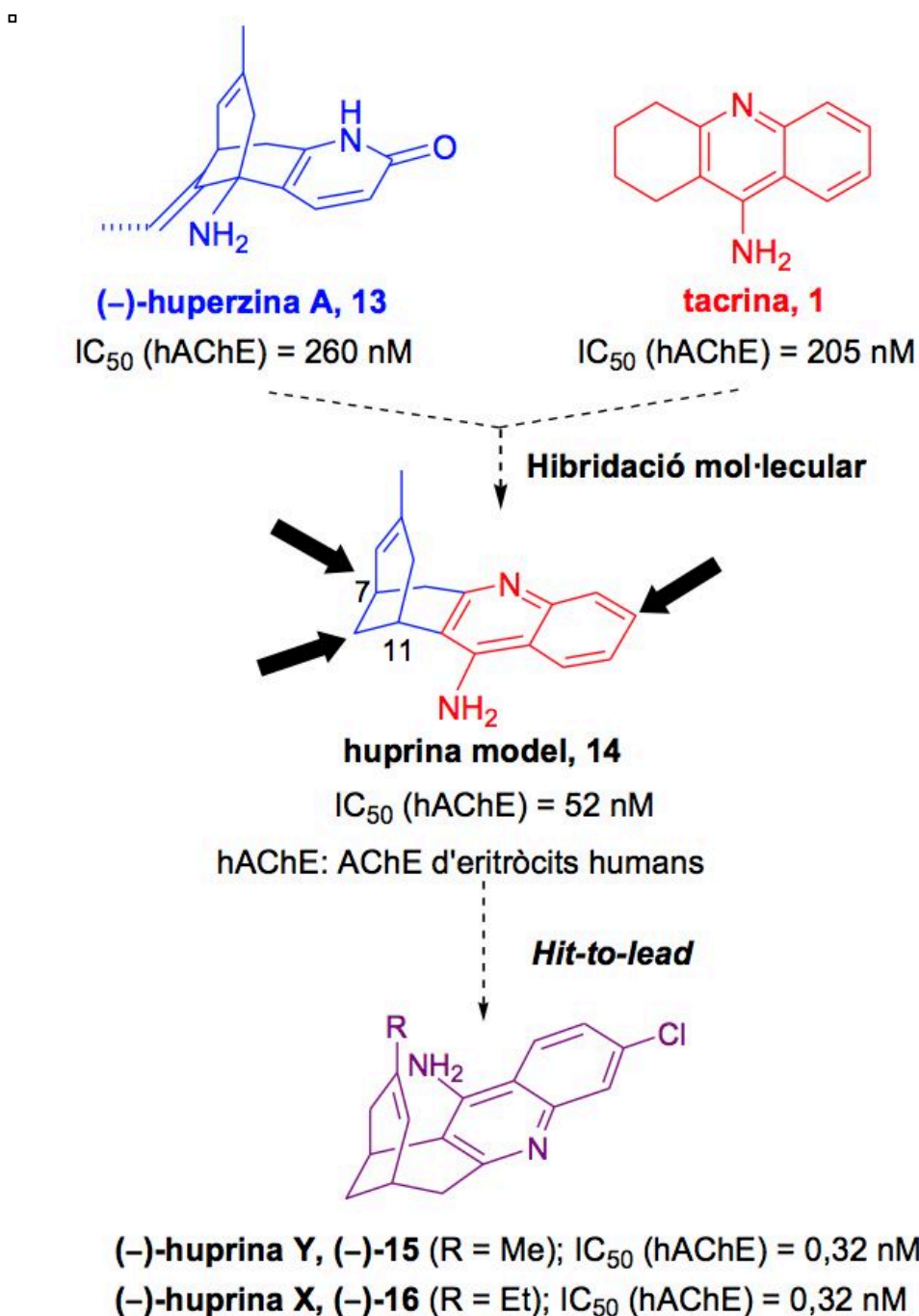
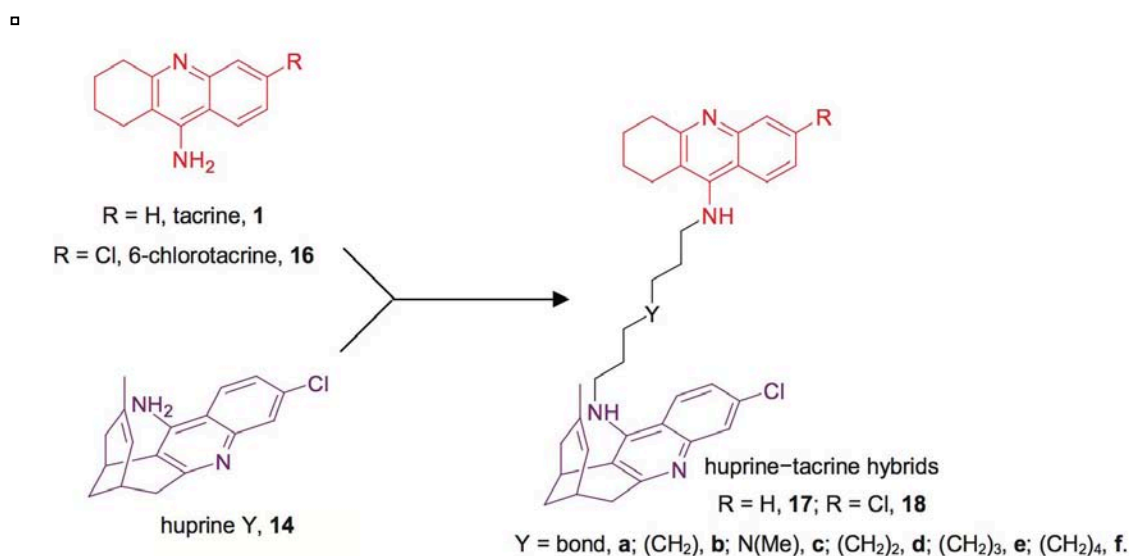


Fig.17 Disseny i farmacomodulació de les huprines (Adaptat de Galdeano 2012).

L'HY atenua les lesions provocades per l'excitotoxicitat del glutamat en cèl·lules granulars de cerebel i les lesions de l'estriat provocades per l'àcid 3-nitropropionic (Canudas et al. 2003).

#### 4.2.2.2. Els heterodímers

Donat que, tal i com s'ha comentat prèviament, l'enzim AChE promou l'agregació del pèptid A $\beta$  a través de la interacció d'aquest amb el seu lloc perifèric, els IACHe de lloc d'unió dual representen una estratègia terapèutica per a l'MA capaç de modificar el curs de la malaltia. Amb l'objectiu d'optimitzar el model de les huprines, es va desenvolupar una nova sèrie d'IACHe de lloc d'unió dual formats per una unitat de la forma racèmica o enantiopura d'huprina Y, com a unitat que interacciona amb el lloc catalític, i una unitat de tacrina o de 6-clorotacrina, com a unitat que interacciona amb el lloc perifèric, connectades per una cadena d'oligometilens o *linker* de diferents longituds (Fig.18).

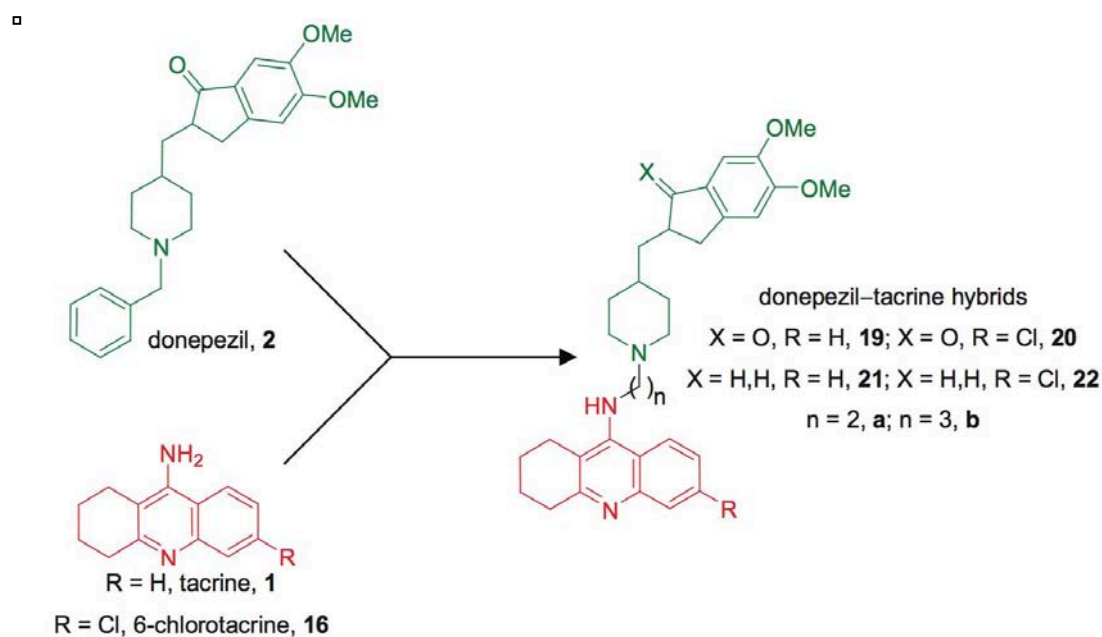


**Fig.18** Disseny dels híbrids huprina Y-tacrina (Adaptat de Viayna 2013).

Estudis cinètics i de modulació molecular realitzats amb aquests híbrids huprinaY-tacrina van presentar uns valors d'inhibició de l'activitat catalítica de

l'hAChE per part d'aquests de rang subnanomolar ( $IC_{50}=0.31-11.5$  nM), i una inhibició *in vitro* de l'agregació de l'A $\beta$  induïda per l'AChE d'entre el 23 i el 67% a una concentració d'inhibidor de 100  $\mu$ M. Aquests compostos també van ser capaços d'inhibir l'activitat catalítica de la BChE humana (hBChE) ( $IC_{50}=24.6-139$   $\mu$ M), de bloquejar l'agregació autoinduïda pel pèptid A $\beta$  (entre un 28 i un 61% d'inhibició amb una concentració d'inhibidor de 10  $\mu$ M), i d'inhibir la BACE-1 ( $IC_{50}=4.9-7.3$   $\mu$ M) (Camps et al. 2005; Galdeano et al. 2012).

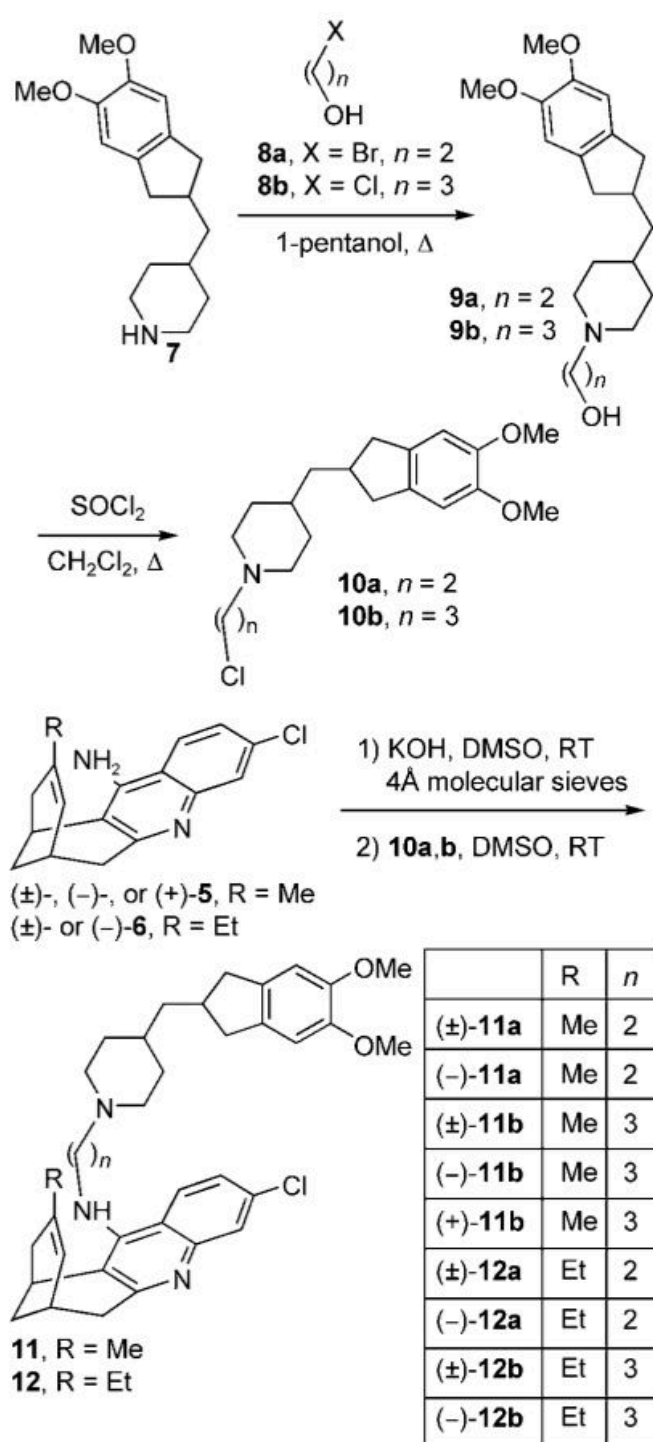
En el 2008 es van desenvolupar una sèrie d'híbrids donepezil-tacrina dissenyats també perquè interaccionessin simultàniament amb el lloc actiu, el lloc perifèric i amb la zona ubicada entre els dos, de l'AChE. Aquests compostos estan formats per una unitat de tacrina o 6-clorotacrina, que ocupa la mateixa posició que la tacrina al lloc actiu de l'AChE, el derivat indanona (o indà) del donepezil, que s'ubica al llarg de la gorja de l'enzim, i el lloc perifèric que és modulats per una cadena espaciadora que connecta els fragments de la tacrina i el donepezil (Fig.19).



**Fig.19** Disseny dels híbrids donepezil-tacrina (Adaptat de Viayna 2013).

Els híbrids donepezil-tacrina també són potents inhibidors de l'hAChE ( $IC_{50}=0.27-5.13$  nM) i de l'hBChE ( $IC_{50}=7.25-88.7$  nM). Sis dels vuit híbrids de la sèrie, en particular els que porten el fragment indà del donepezil, presenten una activitat inhibidora de l'agregació del pèptid A $\beta$  induïda per l'AChE d'entre el 38% i el 66% a una concentració d'inhibidor de 100  $\mu$ M (Camps et al. 2008).

Simultàniament es va desenvolupar una altra sèrie d'heterodímers que combinaven novament el derivat indà de la molècula del donepezil o la meitat 5,6-dimetoxi-2-[(4-piperidinil)metil]indà, amb una unitat de la forma racèmica o enantiopura de la huprina Y o X a través d'una cadena espaciadora de dos o tres metilens. El derivat indà interacciona amb el lloc perifèric i al llarg de la gorja de l'AChE, i les huprines X i Y amb el lloc actiu de l'enzim (Fig.20). L'avaluació farmacològica d'aquests nous compostos va incloure, com en les sèries anteriors, la capacitat inhibidora que presenten enfront de l'hAChE ( $IC_{50}=2.61-49.9$  nM) i l'hBChE ( $IC_{50}=61-419$  nM), davant de l'agregació del pèptid A $\beta$  induïda per l'AChE (27.3-49.8% d'inhibició) o autoinduída (16.3-29.9% d'inhibició) i enfront de la BACE-1 (12.5-30.8% d'inhibició). També es va predir, simulant la BHE amb una membrana artificial, que eren capaços de penetrar dins de l'SNC. Els híbrids donepezil-huprina són potents inhibidors de l'hAChE a la vegada que inhibeixen l'agregació del pèptid A $\beta$  induïda per l'AChE, essent en ambdues activitats més eficaços que el donepezil. També inhibeixen de forma significativa l'hBChE, la BACE-1 i l'autoagregació del pèptid A $\beta$ . D'entre els compostos sintetitzats, el que presenta un millor perfil farmacològic és l'híbrid AVCRI104P3, que inclou una molècula d'huprina Y enantiopura i un *linker* de tres metilens ( $IC_{50}$  de  $5,37\pm 0.3$  nM i de  $88\pm 2.3$  nM per l'hAChE i l'hBChE respectivament;  $44.5\pm 1.8\%$ ,  $28.5\pm 0.4\%$  i  $29.1\pm 2.9\%$  d'inhibició de l'agregació d'A $\beta$  induïda per l'AChE, autoinduída, i d'inhibició de la BACE-1 *in vitro* respectivament) (Viayna et al. 2010).



**Fig.20** Síntesi dels heterodímers donepezil-huprina (Adaptat de Viayna et al. 2010).

En el 2009 es van començar a desenvolupar dues sèries d'inhibidors de l'ACHÉ de lloc d'unió dual compostos per una unitat de 6-clorotacrina, com a part que interacciona amb el lloc actiu de l'enzim, i un derivat de la pirano[3,2-

c]quinolina, inhibidor del lloc perifèric de l'AChE. Presenten una activitat inhibidora de l'hAChE similar a la de la tacrina ( $IC_{50}=7.03-50$  nM), una activitat inhibidora *in vitro* de l'agregació d'A $\beta$  induïda per l'AChE d'entre el 23% i el 46% a una concentració d'inhibidor de 100  $\mu$ M, de l'autoagregació d'A $\beta$  d'entre el 12% i el 49% a una concentració d'inhibidor de 50  $\mu$ M, i de la BACE-1 d'entre el 14% i el 78% a una concentració d'inhibidor de 2.5  $\mu$ M (Camps et al. 2009; Di Pietro et al. 2014).

## **5. MODELS EXPERIMENTALS ANIMALS PER A L'ESTUDI DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER**

Entre els diferents models experimentals amb animals, el ratolí és el més estès i el que fins ara ha proporcionat més informació per a la investigació de l'MA. És un mamífer de mida ideal, ràpida reproducció, fàcil manipulació, baix cost, genoma conegut i manipulable, i amb signes d'envelliment d'aparició primerenca.

### **5.1. Models modificats genèticament**

S'han creat nombrosos models de ratolins genèticament modificats per tal d'avaluar els aspectes neuropatològics de l'MA. Gràcies a aquests ratolins transgènics, s'han pogut reproduir les lesions específiques neurodegeneratives (Taula 1). La majoria d'aquests models es basen en les més de trenta mutacions de l'APP i les gairebé 200 de les PS1/PS2 que s'han identificat i vinculat a l'aparició de l'Alzheimer familiar (FAD) (Cruts et al. 2012), fenotípicament molt similar a l'Alzheimer esporàdic d'aparició tardana. D'acord amb la hipòtesi amiloidogènica, aquestes mutacions augmenten la producció d'A $\beta$ , potencien la formació d'agregats i/o augmenten la relació A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$ .

El primer model que es va desenvolupar va ser el ratolí transgènic PDAPP que sobreexpressa l'APP amb una mutació associada a la FAD (V171F) (Games et al. 1995). És una mutació localitzada al lloc de tall de la  $\gamma$ -secretasa que fa que



augmenti la relació  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  (Borchelt et al. 1996). Un altre model àmpliament estès és el ratolí transgènic 2576 (Tg2576), el qual sobreexpressa l'APP humana amb dos mutacions la K670N i l'M671L, que van ser originàriament identificades en una família sueca amb la FAD (Haass et al. 1995). Aquestes mutacions es troben al lloc de tall de la  $\beta$ -secretasa i provoquen el processament de l'APP per la via amiloidogènica. En general, els ratolins que sobreexpressen l'APP mutada desenvolupen les plaques amiloides, perden sinapsis, plasticitat sinàptica, i presenten dèficits cognitius. La co-expressió del transgen mutat de la PS1 accelera l'aparició de l'MA fins a edats molt més joves, tal i com s'evidencia en el model doble transgènic APP/PS1 (Holcomb et al. 1998). Un quart model a aparèixer va ser el del ratolí triple transgènic (3xTg) que expressa els transgens mutats de la tau, l'APP i la PS1, i per tant també presenta cabdells neurofibril·lars, així com una neurodegeneració molt més severa (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al. 2003). El model de ratolí 3xTg s'explica a l'apartat 5.1.1.

Gràcies als models transgènics s'han clarificat mecanismes fisiològics subjacents a la malaltia, s'han estudiat les modificacions funcionals induïdes per la manipulació genètica o pel tractament químic, i s'ha pogut provar l'eficàcia de nous fàrmacs per revertir els fenotips malalts, essent les proves de comportament amb els assaigs cognitius un dels principals components de la seva utilitat i el seu valor. Els ratolins transgènics per l'APP mutant, desenvolupen una disfunció cognitiva a les edats compreses entre dos i dotze mesos, en funció dels transgens específics. En el model PDAPP, les alteracions de la memòria són evidents després dels sis mesos d'edat en diferents proves de comportament (FC, *Fear Conditioning*; RAWN, *Radial Arm Water Maze*; MWM, *Morris Water Maze*). En el model del ratolí Tg2576, l'aparició de les alteracions en el rendiment van des dels quatre mesos per la prova de l'FC als més de sis mesos per l'RAWN i l'MWM (Saydoff et al. 2013). Els dèficits en les edats més primerenques tendeixen a ser subtils, però progressen a marcades deficiències en edats més avançades. Significativament, les alteracions en el comportament poden ser anteriors a l'acumulació del pèptid  $A\beta$ , fet que posa en relleu la importància de les

espècies solubles en la patogènesi de l'MA.

**Taula 1.** Models de ratolins transgènics per a l'estudi de l'MA (Adaptat de Puzzo et al. 2014).

Model	Description	Outcome	Plaques	NFTs	Neuron loss	Synaptic deficits	Memory deficits	Notes	Example	References
<i>Single transgenic</i>										
APP (Swedish)	Mutations at $\beta$ -secretase cleavage site (aa 670/1)	Enhanced cleavage by $\beta$ -secretase; overall more A $\beta$ (all forms)	YES: 9-12mo	NO	NO	YES	YES	Mostly dense cored plaques, some tau hyperphosphorylation. Synaptic and memory defects generally precede amyloid deposits	Tg2576 (Swedish)	Hsiao et al. (1996) [56]
APP (Indiana, London)	Mutations at gamma-secretase cleavage site (aa 717)	Enhanced cleavage by gamma-secretase; increased A $\beta$ 42:40 ratio	YES: 9-12mo	NO	NO	YES	YES	Higher levels of diffuse amyloid deposits	PDAPP (Indiana)	Games et al. (1995) [55]
APP (Arctic, Dutch, Flemish, Italian)	Mutations within A $\beta$ sequence (aa 692/3)	Enhanced A $\beta$ oligomerization, formation of protofibrils	YES: 9-12mo	NO	NO	YES	YES	Pronounced cerebral amyloid angiopathy	TgAPP <sub>Arctic</sub> , APP <sub>Dutch</sub>	Ronnbäck et al. (2011); Herzig et al. (2004) [57,58]
APP (Japanese)	Mutation within A $\beta$ sequence (aa E693delta - deletion of glutamate 22)	Enhanced A $\beta$ oligomerization with no fibrillization or plaques	NO	NO	YES (>24mo)	YES	YES	Intracellular accumulation of A $\beta$ oligomers from 8mo; includes tau hyperphosphorylation, gliosis	TgAPP (E693)	Tomiyama et al. (2010) [59]
Multiple APP mutations	Combination of single APP FAD mutations	Combination of effects on APP processing/A $\beta$	YES	NO	NO	YES	YES	Increased amyloid pathology over single APP mutation models	TgCRND8, J20	Chishti et al. (2001); Davis et al. (2004) [60,61]
Amyloid- $\beta$ (A $\beta$ )	Human A $\beta$ 40 or 42 fusion protein with BRI	Overexpression and secretion of only A $\beta$ , no extra APP cleavage products	YES: 3mo	NO	NO	YES	YES	Reactive gliosis and amyloid pathology only with A $\beta$ 42 model; similar overexpression level as Tg2576	BRI-A $\beta$ 42	McGowan et al. (2005) [62]
Presenilin-1	FAD point mutations or exon 9 deletion in human PS1	Altered APP cleavage; enhanced A $\beta$ 42:40 ratio	NO	NO	NO	YES	NO	Accelerated neurodegeneration in older mice >13mo; PS2 model also available with rare mutation, not commonly used	PS1 (M146W), PS1(dE9)	Duff et al. (1996) [51]
Tau	Point mutations in human MAPT (FTD mutations)	Increased tau phosphorylation/aggregation	NO	YES (>6mo)	YES	YES	YES	Significant motor defects, brainstem and spinal cord pathology in some strains. Inducible promoter models may be more appropriate for cognitive behavioral studies	JNPL3, MAPT (P301L), MAPT(VLW)	Ramsden et al. (2005); Lim et al. (2001); Terwel et al. (2005) [53-65]
<i>Multi-transgenic</i>										
APP/PS1	Double transgenic (APP FAD mutant overexpression, PS FAD mutant expression or knock-in)	Accelerated phenotype and pathology but minimal neurodegeneration	YES: 3-6mo	NO	NO	YES	YES	Significant hippocampal neuron loss in some subtypes (APP(swe+lon)/PS1)	APP(swe)/PS1(M146L), APP(swe)/PS1(A246E)	Holcomb et al. (1998); Borchelt et al. (1997) [66,67]
APP/Tau	Double transgenic (APP FAD mutant overexpression, tau FTD mutant overexpression)	Accelerated phenotype and pathology but minimal neurodegeneration	YES: 9mo	YES	YES	YES	YES	Increased amyloid deposition compared to Tg2576/reports of high death rate	APP(swe)/MAPT(P301L), APP(swe)/MAPT(VLW)	Lewis et al. (2001); Ribe et al. (2005) [68,69]
APP/PS1/Tau	Triple transgenic; FAD APP and FTD tau transgenes in PS1 FAD knockin	Accelerated phenotype and pathology including NFTs	YES: 3-6mo	YES	YES	YES	YES	Early intraneuronal deposits; plaques precede tangles	3xTgAPP [APP(swe)/PS1(M146V)/MAPT(P301L)]	Oddo et al. (2003) [70]

Les mutacions del gen MAPT (*Microtubule Associated Protein Tau*) s'associen amb la demència familiar relacionada amb la regió frontal del lòbul temporal i amb el parkinsonisme lligat al cromosoma 17. Aquestes mutacions disminueixen la unió de la tau als microtúbuls o augmenten la proporció de la

isoforma 4R-tau, la qual incrementa la susceptibilitat a l'agregació. Aquests models hiperfosforilen l'MAPT i l'acumulen en els cabdells neurofibril·lars. No obstant, molts d'ells, a causa de l'afectació del tronc cerebral i la medul·la espinal, presenten defectes motors dependents de l'edat que impedeixen el seu ús en les proves de comportament. El model 3xTg presenta menys alteracions motores que d'altres models amb el transgen de la tau mutat, el que ha fet possible la seva caracterització en els assaigs cognitius de comportament (Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al. 2003).

### **5.1.1. El model de ratolí triple transgènic (3xTg)**

En el 2003 per tal d'estudiar la interacció entre l'A $\beta$  i la tau, i observar l'efecte que exerceixen sobre la funció sinàptica, es va obtenir un model d'animal triple transgènic (3xTg) portador dels transgens humans PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>swe</sub> i tau<sub>P301L</sub>. Aquest model es va crear mitjançant la microinjecció conjunta de dos transgens de cDNA independents, que codifiquen per als gens humans APP<sub>swe</sub> y tau<sub>P301L</sub> (ambdós subclonats sota el control transcripcional de l'element regulador o promotor Thy1.2) en el pronucli d'una sola cèl·lula embrionària que procedia d'un ratolí *knock-in* (KI) homozigot per al gen PS1<sub>M146V</sub> (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al. 2003).

Aquest model és el primer que desenvolupa de forma progressiva les patologies de l'A $\beta$  i la tau en àrees rellevants de l'MA, mostrant un perfil temporal i anatòmic específic i reproduint el patró característic del cervell humà amb l'MA. S'ha demostrat que la deposició del pèptid A $\beta$  s'inicia mesos abans que la patologia de la tau (Hardy & Selkoe 2002) i els nivells d'expressió dels transgens APP i tau son conseqüents amb aquesta teoria (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al. 2003). Els dipòsits d'A $\beta$  s'inicien en regions corticals, principalment en el còrtex cerebral, després s'estenen cap a regions més posteriors com el còrtex occipital i parietal, i amb l'edat, progressen cap a regions límbiques com l'hipocamp i l'amígdala. L'A $\beta$  intraneuronal es detecta als 3 mesos d'edat en el còrtex cerebral, mentre que els dipòsits extracel·lulars no apareixen fins als 6 mesos, quan l'A $\beta$  intraneuronal ja està àmpliament

estesa. En aquesta edat, a l'hipocamp ja s'observa una acumulació intraneuronal d'A $\beta$  (principalment en neurones piramidals de la regió CA1), però els dipòsits extracel·lulars no apareixen fins als 12 mesos. De forma inversa, els cabdells neurofibril·lars apareixen a la regió CA1 de l'hipocamp als 12 mesos i amb el temps progressen cap a regions corticals (Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al. 2003).

Aquest model també manifesta la disfunció sinàptica pròpia de l'MA, amb dèficits en la potenciació a llarg termini (LTP), relacionada amb la memòria i l'aprenentatge. Es manifesten de forma depenent de l'edat i són previs a la formació de les plaques amiloides i dels cabdells neurofibril·lars (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al. 2003), en concret, es correlacionen amb la sobreexpressió de l'A $\beta$  intraneuronal, observant-se ja als tres mesos d'edat. També hi ha evidències del procés inflamatori que s'associa amb l'MA davant, principalment, de l'acumulació primerenca de l'A $\beta$  intracel·lular. Es sobreexpressen citoquines proinflamatòries tals com el TNF $\alpha$  i paral·lelament hi ha canvis en la micròglia (Mastrangelo & Bowers 2008).

## **5.2. Models no modificats genèticament**

Tot i els avenços realitzats en la investigació de l'MA gràcies als ratolins transgènics, la sobreexpressió de gens relacionats amb la malaltia podria enganyar la interpretació dels resultats derivats d'aquests estudis. Per exemple, els transgens de l'APP i la PS1 podrien afectar altres funcions neuronals a través d'altres mecanismes no necessàriament relacionats amb l'A $\beta$  o l'MA. De fet, tant la ruta com la senyalització de l'APP, així com els seus productes de tall (A $\beta$ , sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$  i AICD) són probablement diferents en la fisiologia transgènica amb gens sobreexpressats i podrien tenir un impacte en el desenvolupament de l'SNC, les funcions sinàptiques i la memòria. Per separar els efectes específics del pèptid A $\beta$  dels altres efectes deguts a la sobreexpressió de l'APP i la PS1, s'utilitzen models en els quals l'A $\beta$  és l'única responsable de les alteracions observades (Taula 2). Atès que tant els oligòmers naturals d'A $\beta$  com els sintètics impedeixen la potenciació neuronal de

llarga durada (LTP) (Puzzo et al. 2005), en infondre'ls directament en els ventricles cerebrals o en l'hipocamp dels animals adults provoquen un model de patologia aguda d'A $\beta$ . Els oligòmers es poden infondre a través de cànules pre-implantades, que en faciliten l'arribada directa i eviten els problemes que pot ocasionar la BHE (Watterson et al. 2013). Els experiments amb aquest model de ratolí han permès mostrar que l'A $\beta$  per ella mateixa és capaç d'alterar els diferents tipus de memòria (l'associativa i la de referència), suggerint la seva importància en la pèrdua de la memòria en general. És un model més econòmic i que requereix menys hores de feina que el model transgènic. A més, és un model que es pot utilitzar amb d'altres animals a part del ratolí (Asle-Rousta et al. 2013).

**Taula 2.** Models de ratolins no transgènics per a l'estudi de l'MA (Adaptat de Puzzo et al. 2014).

Model	Description	Outcome	Plaques	NFTs	Neuron loss	Synaptic deficits	Memory deficits	Notes	Example	References
Acute A $\beta$ injection	Direct infusion of A $\beta$ into the brain (e.g. dorsal hippocampi, lateral ventricles)	Acute local A $\beta$ elevation	NO	NO	NO	YES	YES	A $\beta$ source/preparation/conformation is crucial	Cell-derived A $\beta$ , A $\beta$ dimers from human brain, 200 nM synthetic A $\beta$ oligomers	Walsh et al. (2002); Shankar et al. (2008); Puzzo et al. (2012); Watterson et al. (2013); Fiorito et al. (2013) [21,30,32-34]
Acute tau injection	Direct infusion of tau into the brain (e.g. dorsal hippocampi)	Acute local tau elevation	NO	NO	NO	YES	YES	Different tau isoforms can be used, as well as naturally-derived tau from brain extracts	Tau oligomers from human brain, recombinant tau oligomers	Moe et al. (2008, 2009, 2010, 2010); Lasagna-Reeves et al. (2012) [71,101-104]
Aged animal models	Aged mice, rats, dogs, non-human primates	Natural age-related deficits	YES (dogs, non-human primates)	NO	NO	YES	YES	Exhibit cognitive deficits, brain hypometabolism, cholinergic defects, altered calcium homeostasis, oxidative stress, neophobia	Aged mice (>18-20 months old)	Gallagher et al. (1993); Govner et al (1993) [72,73]
Senescence-accelerated prone mice (SAMP8)	Spontaneously mutated inbred mouse strain	Shortened lifespan and accelerated aging phenotype; elevated levels of endogenous APP and A $\beta$	NO	NO	NO	YES	YES	Some tau hyperphosphorylation along with decreased spine density and synaptic proteins; increased gliosis and oxidative stress	SAMP8	Yagi et al. (1968); Okuma et al. (1998) [74,75]

A partir del descobriment de la presència de la tau en l'LCR tant en individus sans com en malalts d'Alzheimer (en molta més quantitat), es va provar l'efecte dels oligòmers de la proteïna tau en la funció sinàptica i es va descobrir que eren capaços d'alterar l'LTP (Blennow & Zetterberg 2009), a més d'alterar la memòria quan aquests eren directament introduïts en l'hipocamp (Lasagna-Reeves et al. 2012). Aquests estudis demostren el potencial d'ús dels models d'exposició aguda tant a l'A $\beta$  com a la tau per investigar la patogènesi de l'MA i

provar l'efecte de nous fàrmacs.

Els models d'envelliment, com és el cas del ratolí amb senescència accelerada, SAMP8 (*Senescence-accelerated prone mouse strain 8*) (Takahashi 2010), s'utilitzen per caracteritzar els primers canvis neuronals en l'MA primerenca i el deteriorament cognitiu lleu (MCI, *Mild Cognitive Impairment*) en molts casos precursor de l'MA. Aquest model mostra un deteriorament accelerat en l'aprenentatge i la memòria, una acumulació progressiva del dany oxidatiu, un augment de les alteracions de l'A $\beta$  i de la tau hiperfosforilada, i una disminució dels nivells d'ACh. A la vegada, permet determinar alteracions sinàptiques quan encara no existeixen patologies específiques del pèptid A $\beta$  i de la proteïna tau (Woodruff-Pak 2008).

**OBJECTIUS**





D'acord amb el que s'ha comentat anteriorment, les malalties neurodegeneratives, amb especial interès per a l'MA, i el procés d'envelliment, cursen amb el deteriorament i la mort neuronal, essent el sistema colinèrgic un dels principals sistemes afectats. S'ha vist que els anticolinesteràsics milloren els signes i símptomes de la demència, tot i que la seva eficàcia és molt variable. De tota manera, s'ha demostrat que en molts casos, la seva acció no està limitada a inhibir l'activitat catalítica de l'AChE, sinó que també bloquegen l'agregació del pèptid  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) i presenten efectes neuroprotectors.

Així doncs, l'objectiu d'aquesta tesi ha estat estudiar els efectes dels compostos huprina X (HX) i AVCRI104P3, anticolinesteràsics d'ampli perfil farmacològic (antiagregants d' $A\beta$ , inhibidors de la BACE, agonistes nicotínics i muscarínics  $M_1$  i neuroprotectors) i objecte de diferents estudis realitzats en el nostre departament, sobre diferents marcadors dels processos de neurodegeneració i envelliment en diferents models experimentals *in vitro* i *ex vivo*:

- A. ***In vitro* s'ha determinat:** 1) la viabilitat cel·lular amb presència i absència dels inhibidors en cèl·lules de neuroblastoma humà (SH-SY5Y) transfectades amb les isoformes S i R de l'AChE, 2) la influència d'un estímul tòxic sobre la viabilitat cel·lular i 3) la síntesi de l'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE en aquestes mateixes cèl·lules sota la influència dels inhibidors.
- B. ***Ex vivo* s'ha estudiat:** 1) el model de neurotoxicitat induïda per l'àcid kaïníc en ratolins tractats amb l'anticolinesteràsic HX, 2) el model d'envelliment en ratolins de 12 mesos tractats amb l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 i 3) el model de neurodegeneració en ratolins amb l'MA (3xTg-AD) tractats amb l'AVCRI104P3. En tots ells s'ha determinat:

- a. La síntesi de l'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE en l'escorça frontal.

- b. L'expressió o l'activitat de les proteïnes implicades en les vies (anti)apoptòtiques (Bcl2, Akt, GSK3 $\beta$ , p25/p35, caspases 3 i 7) a nivell de l'hipocamp i de l'escorça cerebral.
- c. L'expressió de les proteïnes implicades en la plasticitat sinàptica (sinaptofisina) i la neurogènesi (*doublecortin*), així com en la neuroinflamació (GFAP, Iba1).
- d. En el cas dels animals 3xTg-AD, els nivells dels pèptids A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub> en ambdues regions cerebrals.

## **MATERIAL I MÈTODES**



## 1. MATERIAL

### 1.1. Reactius

Tots els productes químics utilitzats en el present treball van ser de puresa adequada per a l'anàlisi:

Àcid clorhídric 6N (HCl; *Merck*), acetat potàssic (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K; *Merck*), àcid kaínic (*Sigma*), acrilamida/bis 30% solució 37.5:1 (*Bio-Rad*), agar LB (*Sigma*), aigua DEPC (aigua tractada amb dietilpirocarbonat) (*Bio-Rad*), albúmina de sèrum boví (qualitat RIA, fracció V, min. 96%) (BSA; *Sigma*), ampicil·lina en sal sòdica (*Sigma*), bicarbonat sòdic (NaHCO<sub>3</sub>; *Merck*), blau de bromofenol (3',3'',5',5''-tetrabromofenolsulfoneftalíen; *Sigma*), β-mercaptoetanol (2-mercaptoetanol per electroforesis ≥ 98%; *Sigma*), bromur d'etidi (*Sigma*), clorur càlcic (CaCl<sub>2</sub>; *Merck*), clorur potàssic (KCl; *Merck*), clorur sòdic (NaCl; *Merck*), còctel inhibidor de fosfatases (*Sigma*), còctel inhibidor de proteases (*Sigma*), dimetil sulfòxid (DMSO; *Sigma*), DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F12 Ham; *Gibco*), dodecilsulfat sòdic (SDS; *USB*), D(+)sacarosa (*Merck*), estreptomina (*Sigma*), etanol (*Merck*), etilenglicol (*Sigma*), *Fluoprep* (medi de muntatge; *Bio Mérieux*), fosfat potàssic monobàsic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; *Merck*), fosfat sòdic dibàsic dihidratat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; *Merck*), fosfat sòdic monobàsic dihidratat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; *Merck*), glicerol 99+% (*Sigma*), glicina per electroforesi mín. 99% (*Sigma*), glutamina (*Sigma*), hidròxid sòdic (NaOH; *Merck*), isopantà (2-metilbutà; *SIGMA*) isopropanol (*Merck*), kanamicina sulfat (*Invitrogen*), *kit caspase-Glo-3/7 Assay* (*Promega*), *kit ELISA human Amyloid Beta40/42 brain* (*Millipore*), *kit d'extracció Pure Link RNA Mini*, *kit d'extracció Qiagen Plasmid Maxi kit* (*Qiagen*), *kit DNA-free* i *kit EXPRESS One-Step SYBR GreenER* (*Invitrogen*), *kit Miniprotean 3 Cell* (*kit d'electroforesi i transferència; Bio-rad*), llet desnatada en pols (*Sveltesse*), medi LB (Miller's LB Base; *Invitrogen*), medi SOC (*Sigma*), MEM solució d'aminoàcids no essencials (*Sigma*), metanol (amb gradient de qualitat per cromatografia en fase líquida) (*Merck*), MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoli bromur] (*Sigma*), penicil·lina (*Sigma*), paraformaldehid (*Sigma*), peròxid d'hidrogen 30% p/v

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; *Sigma*), persulfat amònic 10% (APS; *Sigma*), *Polyjet* (*Polysciences*), *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (*Bio-Rad*), reactius *ECL* (reactius de detecció de *Western Blot*; *Amersham*), reactiu *Bradford* conc. (*Bio-Rad Protein Assay*; *Bio-Rad*), reactiu *Hoechst* (*Sigma*), sèrum fetal boví (*Cultek*), *TEMED* (N,N,N',N'-tetrametilendiamina aprox. 99%; *Sigma*), *Tissue-Tek* (*Sakura Firetek*), tripsina-EDTA (*Sigma*), tritonX-100 (*Sigma*), *TRIS* (tris-hidroximetilaminometà ultrapur d'MB Grade; *Amersham*), *tween-20* (monolaurato de polioxietileno; *Sigma*).

## 1.2. Equips i programes informàtics

Equips i programes informàtics utilitzats:

Centrífuga (*Sorvall Rc-6*), criòstat (*Leica CM30505*), espectrofotòmetre (*Perkin Elmer Lambda 2*), *GeneSnap* i *GeneTools* (els programes per revelar i calcular les bandes de les membranes de WB), *Genetic Analyzer 3130xl* (*Applied Biosystem*), homogeneïtzador (*Polytron*), *ImageJ* (el programa per a l'anàlisi de les imatges), luminòmetre/espectrofotòmetre de microplaques (*Perkin Elmer VICTOR 3*), material de cultiu (*TTP*), membrana de nitrocel·lulosa 0.45 µm (*Whatman, Protran*), microcentrífuga (*Spin Plus*), microscopi de fluorescència *Eclipse 80i* (*Nikon*) [filtres: DAPI(λ=340-380, UV), FITC (λ=465-495, verd) i G-2A (λ=528-553, vermell)], minigels de 7x8 cm d'1.5 mm de grossor (*Bio-rad*), minipintes d'1.5 mm de grossor de 15 pous (*Bio-Rad*), paper de cromatografia *Whatman n° 3 MM Chr* (*Whatman, Portran*), *NanoDrop Spectrophotometers* (*Thermo scientific*), portaobjectes gelatinats i cobreobjectes (*VCR*), *Sigma Plot v.10* (el programa per a l'anàlisi estadístic), sistema *RT-Biorad CFX96* (el sistema per quantificar el DNA), termociclador (*Bio-Rad*), termòmetre ASTM (-80°C a +20°C; *AFORA*), *Trans-blot Turbo Transfer System* (*Bio-Rad*).

## 1.3. Fàrmacs

Els fàrmacs donepezil, huprina X ((±)-12-amino-3-clor-9-etil-6,7,10,11-tetrahidro-7,11- metaciclooctà[b]quinolina clorhidrat) (IC<sub>50</sub>=0.75 nM) i

AVCRI104P3 ((±)-3-clor-12-[(3-{4-[(5,6-dimetoxiindà-2-il)-metil]-piperidin-1-il}propil)amino]-6,7,10,11-tetrahidro-9-etil-7,11-metaciclooctà [b]quinolina)) (IC<sub>50</sub>=5.37 nM), una de les formes racèmiques amb més activitat entre els heterodímers huprina Y-donepezil, van ser sintetitzats pel laboratori de Química Farmacèutica del Dr. Pelayo Camps i el Dr. Diego Muñoz-Torrero de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Per als estudis *in vitro* les solucions patrons dels fàrmacs es van preparar a una concentració igual a 1 mM, i es van dissoldre en aigua bidestil·lada estèril al 45% d'etanol. La concentració d'etanol en els diferents assaigs va ser sempre inferior al 0.05%. Per als estudis *in/ex vivo* es van dissoldre els fàrmacs en solució salina al 0.9% i es van administrar d'acord amb les dosis discutides en l'apartat de mètodes. El volum administrat no va ser mai superior a 10 ml/kg.

#### 1.4. Encebadors

Les reaccions en cadena de la polimerasa es van realitzar amb els encebadors humans descrits per Shani Ben-Ari et cols. (Ben-Ari et al. 2006) i els encebadors de ratolí descrits per Moral-Naranjo et cols. (Moral-Naranjo et al. 2010):

<i>mRNA</i>	<i>Forward primers</i>	<i>Reverse primers</i>
AChE-S humà	CTTCCTCCCCAAATTGCTC	TCCTGCTTGCTGTAGTGGTC
AChE-R humà	CTTCCTCCCCAAATTGCTC	GGGGAGAAGAGAGGGGTTAC
Ndufc1 humà	GTAGTGCTGCGCTCGTTTT	GTTAGGTTTGGCATTGACTGG
AChE-S ratolí	ATTTTGCCCGCACAGGGGAC	CGCCTGGTCCAGAGTATCGGT
AChE-R ratolí	ATTTTGCCCGCACAGGGGAC	CCCCACTCCATGCGCCTAC
βActina ratolí	AGAAAATCTGGCACACACC	GGGGTGTGAAGGTCTCAA

#### 1.5. Anticossos

Les reaccions immunològiques es van realitzar mitjançant la utilització dels següents anticossos:

Anticossos primaris: anti-Akt (WB, 1:1000, policlonal de conill; *Sigma*, SAB4500007), anti-pAkt(Ser473) (WB, 1:1000, monoclonal de conill; *Sigma*, SAB4300334), anti- $\beta$ Actina (WB, 1:10000, monoclonal de ratolí; *Sigma*), anti-Bcl2 (WB, 1:1000, policlonal de ratolí; *Bd biosciences*, 610538), anti-GSK3 $\beta$  (27C10) (WB, 1:1000, monoclonal de conill; *Cell Signaling*, 9315), anti-pGSK3 $\beta$  (Ser9) (WB, 1:1000, policlonal de conill; *Cell Signaling*, 9336), anti-p35 (C-19) (WB, 1:1000, policlonal de conill; *Santa Cruz*, sc-820), anti-Sinaptofisina (SY38) (WB, 1:2000, monoclonal de ratolí; *Dako*), anti-Doublecortin (IF, 1:2000, policlonal de conill; *Abcam*, Ab18723), anti-GFAP (IF, 1:3000, policlonal de conill; *Dako*, Z0334) i anti-Iba1 (IF, 1:200, policlonal de cabra; *Abcam*, Ab5076).

Anticossos secundaris: anti-mouse (WB, 1:5000, IgG de cabra conjugat a peroxidasa; *Bd biosciences*), anti-rabbit (WB, 1:2000, IgG de cabra conjugat a peroxidasa; *PIERCE*), Cy3 (cianina) anti-rabbit (IF, 1:400, IgG de burro; *Jackson*, 711-165-152;) i Alexa Fluor 488 anti-goat (IF, 1:400, IgG de burro; *Jackson*, 705-545-003).

## 1.6. Plasmidis

Es van utilitzar els plasmidis d'expressió amb cDNA humà clonat dels gens de les isoformes S i R de l'AChE sota el control del promotor de citomegalovirus (CMV), utilitzats per Shani Ben-Ari et cols. i cedits per la Dra. Hormona Soreq, i el plasmidi reporter GFP (*Green Fluorescent Protein*) com a control per valorar l'eficiència de la transfecció. La sobreexpressió dels diferents transcrits va ser confirmada per qRT-PCR i immunoblot.

## 1.7. Línies cel·lulars

Per a la realització dels experiments *in vitro* amb cèl·lules transfectades es va utilitzar la línia cel·lular SH-SY5Y (*ATCC*, CRL-2266), cèl·lules humanes de neuroblastoma derivades de tumors malignes avançats del sistema simpàtic adrenèrgic ganglial. Es van cultivar a 37°C en una atmosfera humidificada que contenia CO<sub>2</sub> al 5%.



El medi de creixement va ser:

DMEM/F12	82.6% (v/v)
sèrum fetal boví inactivat	15% (v/v)
glutamina 0.2 M	1.2% (v/v)
aminoàcids no essencials	1.2% (v/v)
100 U/ml de penicil·lina	
100 U/ml d'estreptomicina.	

Tots els experiments relacionats amb el cultiu cel·lular es van desenvolupar sota condicions estrictes d'esterilitat i amb el material autoclavat.

### **1.8. Animals d'experimentació**

Els estudis dels diferents efectes dels anticolinesteràsics *in/ex vivo* es van realitzar a partir de tres models experimentals en ratolí: el model de neurotoxicitat amb l'àcid kaínic, el model de 12 mesos (edat mitjana) i el model triple transgènic per l'Alzheimer.

Per als experiments amb l'àcid kaínic es van utilitzar 30 ratolins mascle C57BL/6 de vuit setmanes d'edat.

Per al model de ratolí d'edat mitjana es van fer servir 20 ratolins mascle no transgènics (NTg) de la soca 126/Sv x C57BL/6 de 12 mesos d'edat.

Per als experiments amb ratolins modificats genèticament es van utilitzar 20 ratolins mascle triple transgènics homozigots per als gens PS1, APP<sup>swe</sup> i tau (3xTg-AD) també de 12 mesos d'edat. Els ratolins es van escollir en funció dels estats neuropatològics descrits anteriorment (Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al. 2003), on a partir dels 6 mesos d'edat s'observen dipòsits d'A $\beta$  intraneuronal i s'inicien els extracel·lulars en el còrtex i l'hipocamp, i els dèficits sinàptics i colinèrgics. Els genotips van ser confirmats per PCR i *Southern Blot* a partir de les biòpsies de les cues dels ratolins a l'Institut Karolinska (Suècia).

Els animals del mateix genotip van ser establats durant tot l'experiment amb un màxim de 5 animals per cada caixa, en gàbies de plàstic estàndards del tipus *Macrolon IV* (35x35x19 cm). Les condicions ambientals de manteniment del laboratori van ser les estàndards: cicles de 12 hores de llum i 12 hores de fosc començant a les 8:00h, temperatura de 22±2°C amb una humitat relativa constant del 60±10%. El menjar i l'aigua es van subministrar *ad libitum* durant el transcurs de tot l'experiment. També es va controlar diàriament la supervivència, els signes de malaltia i/o la pèrdua de pes.

El desenvolupament d'aquest projecte va ser realitzat d'acord amb la legislació espanyola per a la "Protecció dels animals d'ús experimental i altres finalitats científiques" i d'acord amb la Directiva del Consell de la Comunitat Europea (86/609/EEC).

## 2. MÈTODES

A fi i efecte d'assolir els objectius del nostre estudi es van realitzar els següents abordatges experimentals:

### *In vitro:*

a. Estudi dels efectes produïts pels anticolinesteràsics HX i AVCRI104P3 en cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb els gens de les isoformes S i R de l'AChE.

### *In/ex vivo:*

a. Estudi dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic HX en el model de neurotoxicitat amb l'àcid kaínic a dosi única en ratolins C57BL/6.

b. Estudi dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 en ratolins 126/Sv x C57BL/6 de 12 mesos.

c. Estudi dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 en ratolins triple transgènics per l'Alzheimer (PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>swe</sub>, tau<sub>P301L</sub>) de 12 mesos.

D'acord amb aquest plantejament a continuació es descriuen tots els mètodes experimentals utilitzats:

## **2.1. Estudi dels efectes produïts pels anticolinesteràsics HX i AVCRI104P3 en cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb els gens de les isoformes S i R de l'AChE**

Per poder estudiar l'efecte dels anticolinesteràsics en cèl·lules transfectades, en primer lloc es van obtenir els plasmidis per a posteriorment dur a terme la transfecció.

### **2.1.1. Obtenció dels plasmidis i transfecció cel·lular**

#### **a) Obtenció dels plasmidis**

Per introduir el DNA plasmídic a les colònies d'*E.coli* cal fer-les competents. Amb aquesta finalitat les membranes de les cèl·lules bacterianes es permeabilitzen amb  $\text{CaCl}_2$  (Mandel & Higa 1970).

Es va picar una colònia d'*E.coli* (provinent de les soques DH5 $\alpha$  o BL21) amb la punta d'una micropipeta i es va deixar créixer en 5 ml de medi LB (25 g/l H<sub>2</sub>O destil·lada, pH 7.0 $\pm$ 0.2) tota la nit (ON) a 37°C en agitació (en un tub de centrifuga de 15 ml). L'endemà es van transferir 150  $\mu$ l del cultiu hipersaturat d'*E.coli* a un altre tub amb 5 ml de medi LB, i aquest es va deixar créixer durant 1 hora i 30 minuts a 37°C amb l'objectiu d'obtenir un cultiu fresc en creixement exponencial, condicions òptimes per a la transformació. Passat aquest temps, es van centrifugar els bacteris a 1500 g durant 5 minuts a 4°C. Es va eliminar el sobrenedant i el pellet es va resuspendre en 2.5 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM. La suspensió es va deixar en gel 30 minuts i es va tornar a centrifugar en les mateixes condicions anteriors. Se'n va eliminar el sobrenedant i el pellet es va resuspendre en un volum de 0.5 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM a 4°C. Les cèl·lules poden estar en gel varies hores sense que se'n vegi afectada l'eficiència, fins i tot pot augmentar. Amb un volum de 500  $\mu$ l de cèl·lules *E.coli* competents es poden

realitzar 5 transfeccions. En tot moment es va treballar al costat del fogó de Bunsen en condicions estèrils i amb material autoclavat.

L'entrada dels plasmidis a les cèl·lules competents o transformació de les cèl·lules es va realitzar per xoc tèrmic.

El plasmidi (1 µg de DNA), que es manté en sec en paper de filtre, es va dipositar en un *eppendorf* i es va eluir en 50 µl de tampó d'elució (EDTA 1 mM, Tris 10 mM, pH 8.0). Es va deixar a 4°C durant tota la nit (ON). L'endemà es va afegir 1 µl del DNA eluït a un volum de 100 µl de cèl·lules competents. La barreja es va deixar en gel 30 minuts, es va escalfar 2 minuts a 42°C i es va refredar al bany de gel 2 minuts més. La mescla es va dipositar en un *eppendorf* amb 400 µl de medi SOC, medi que s'utilitza en l'etapa final de la transformació cel·lular per obtenir l'eficiència de transformació màxima, i es van deixar incubar durant 1 hora a 37°C en agitació. En tot moment es va treballar al costat del fogó de *Bungsen* en condicions estèrils i amb material autoclavat.

#### *Preparació de les plaques de petri amb agar selectiu.*

Per seleccionar les cèl·lules transformades es van fer créixer en agar LB selectiu per l'ampicil·lina, antibiòtic pel qual els plasmidis de les isoformes S i R de l'ACHÉ incorporats conferien resistència.

Es van preparar 100 ml d'agar LB (35 mg agar/ml H<sub>2</sub>O destil·lada) amb 0.1 g de glucosa, per fer el que es coneix com a medi *Lennox Agar*. Es va deixar bullir la mescla fins a la seva completa dissolució, es va autoclavar (121°C, 15 minuts) i un cop fred (sense deixar que gelatinitzés) se li va afegir l'antibiòtic (50 µg/ml agar). Per placa de petri estèril de 100 mm<sup>2</sup> es van col·locar 25 ml de l'agar selectiu.

Les cèl·lules transformades es van centrifugar a 12.000 g durant 1 minut, se'n va aspirar el medi SOC i el pellet restant (100 µl aprox.) es va plaquejar en una placa d'agar selectiu totalment gelatinitzada. Com a control negatiu es va

preparar una placa amb 100  $\mu$ l de cèl·lules competents no transformades (sense plasmidi). Es van incubar ON a 37°C. L'endemà es va picar una colònia d'*E.coli* transformada amb una punta de micropipeta i el volum agafat es va dipositar en un tub amb 5 ml de medi LB amb l'antibiòtic de resistència (0.05  $\mu$ g/ml medi). Es van deixar a l'incubador 24 hores a 37°C en agitació. En tot moment es va treballar al costat del fogó de Bunsen en condicions estèrils i amb material autoclavat.

Passades les 24 hores, les cèl·lules transformades es van centrifugar a 5000 g durant 20 minuts per fer baixar els bacteris. Se'n va eliminar el medi per decantació i a continuació es va procedir a l'extracció i a la quantificació del DNA plasmídic.

Per a l'extracció del DNA es van seguir les instruccions del *kit Qiagen Plasmid Maxi* i es van utilitzar els reactius proporcionats pel mateix. El mètode es basa en el protocol de lisi alcalina de la paret bacteriana descrit per Birnboim et cols. (Birnboim & Doly 1979). La concentració de DNA es va determinar per espectrofotometria mesurant l'absorbància de la mostra a 260 nm i tenint en compte que una unitat de densitat òptica a 260 nm ( $DO_{260}$ ) correspon a 50  $\mu$ g/ml de DNA de cadena doble (dsDNA). La puresa del DNA es va calcular a partir de la relació  $DO_{260/280}$ .

## **b) Transfecció cel·lular**

Un cop obtinguts els plasmidis amb els gens de l'ACHE-S, l'ACHE-R i la GFP es va procedir a la seva transfecció en cèl·lules SH-SY5Y utilitzant el polímer biodegradable comercial anomenat *Polyjet*. La transfecció assolida va ser igual o superior a l'obtinguda amb la lipofectamina, utilitzant la GFP com a plasmidi control de la transfecció.

Les transfeccions es van realitzar en plaques de 6, 12 o 24 pous segons els requeriments experimentals posteriors.

En el cas de les plaques de 6 pous es van cultivar les cèl·lules a una concentració de 800.000 cèl·lules/pou i es van deixar 24 hores a l'incubador a fi i efecte d'assolir el 70% de confluència. Una hora abans de la transfecció es va eliminar el medi de cultiu i es va afegir 1 ml de medi sense sèrum. A continuació es va afegir la solució dels plasmidis amb el reactiu *Polyjet* en les següents condicions:

- 1) Solució A. Consta d'1 µg de DNA plasmídic (el volum a afegir depèn de la concentració a la qual es té el DNA) més 50 µl de medi sense sèrum.
- 2) Solució B. Consta de 3 µl de *Polyjet* més 50 µl de medi sense sèrum. Cal mesclar-ho bé.

A la solució A s'hi va afegir la B de forma ràpida i de cop. Es va mesclar ràpidament de forma suau i es va deixar 15 min a temperatura ambient (TA). Passat aquest temps, es van afegir els 100 µl (A+B) al mil·lilitre de medi de cultiu sense sèrum que contenia el pou. Els 100 µl han de quedar repartits de forma homogènia per tot el pou.

Les cèl·lules es van deixar 18 hores a l'incubador (37°C) per tal que tingués lloc la transfecció. Passat aquest temps, es va retirar el medi de transfecció i es va substituir per medi de cultiu.

Aquest sistema de transfecció es basa en l'embolcallament del DNA per lípids catiónics que faciliten l'entrada del DNA a la cèl·lula fins al nucli. Un cop al nucli, els plasmidis utilitzen la maquinària de la cèl·lula per expressar els gens clonats.

### **2.1.2. Estudis de viabilitat cel·lular**

Amb l'objectiu final d'avaluar el possible efecte neuroprotector dels anticolinesteràsics huprina X i AVCRI104P3 en cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb les isoformes S i R de l'AChE, en primer lloc es van dur a terme estudis de viabilitat cel·lular sobre aquestes cèl·lules per descartar

possibles efectes neurotòxics o neurogènics provocats pels fàrmacs, així com per determinar l'efecte de les isoformes S i R sobre la supervivència cel·lular. Posteriorment es va estudiar la viabilitat cel·lular davant del peròxid d'hidrogen per avaluar la resposta de les variants S i R enfront d'un estrès oxidatiu agut.

Les cèl·lules es van sembrar (200.000 cèl·lules/ml, 1 ml/pou, 24 pous), a les 24 hores es van transfectar i 24 hores més tard es van iniciar els experiments.

Per als estudis de viabilitat es van dissoldre els fàrmacs en el medi de cultiu i es van afegir a les concentracions de  $10^{-6}$  M i  $10^{-7}$  M (donat que en estudis anteriors havien estat les concentracions no tòxiques més eficaces). Els temps d'incubació van ser de 24 i 48 hores. Els experiments es van realitzar en presència de donepezil com a control positiu. Transcorreguts els temps d'incubació, les cèl·lules es van rentar amb el tampó fosfat salí (PBS) prèviament autoclavat (Taula 3) i es van realitzar els assaigs de viabilitat cel·lular per colorimetria a partir del reactiu MTT.

**Taula 3.** Composició del PBS.

PBS (Phosphat Buffered Saline) pH 7.4

NaCl	0.137 M
KCl	0.0027 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.002 M
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.01 M

Per avaluar el comportament de les isoformes S i R davant del peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es van realitzar tres corbes de concentració-resposta (100-500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), una per a cada isoforma, i una control per a les cèl·lules no transfectades, amb un temps d'exposició al peròxid de dues hores. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es va afegir al medi de cultiu a les diferents concentracions estudiades, les quals es van preparar a partir d'una solució mare al 30% p/v. Després de les dues hores d'incubació, les cèl·lules es van rentar amb el PBS i es van realitzar els assaigs de viabilitat cel·lular igual que en el cas anterior.

La viabilitat cel·lular es va determinar per espectrofotometria amb base al canvi de color que es produeix quan el reactiu MTT es redueix a formazan. Els mitocondris actius de les cèl·lules són capaços de dur a terme aquesta reacció, essent la quantitat de formazan formada directament proporcional al nombre de cèl·lules vives. Per realitzar l'assaig, es va retirar el medi i es va afegir l'MTT dissolt en medi de cultiu (0,5 mg/ml, 100 µl/pou). Es van deixar incubar les cèl·lules durant 30 minuts perquè tingués lloc la reacció, i a continuació, es van eliminar les restes de medi i es va dissoldre el formazan resultant en el dissolvent DMSO (50 µl/pou). La quantitat relativa de formazan es va determinar a partir de la diferència d'absorbàncies a les longituds d'ona ( $\lambda$ ) de 595 nm i 620 nm utilitzant l'espectrofotòmetre Multiskan (*Labsystems multiskan MS, type 325*).

Els percentatges de supervivència de les cèl·lules transfectades amb les isoformes S i R es van calcular en relació amb els grups control negatius (absència de transfecció i de fàrmac en el primer cas i absència de peròxid en el segon cas).

### **2.1.3. Determinació dels nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE per qRT-PCR**

Prèviament a la determinació dels nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE, com en el cas anterior, es van transfectar les cèl·lules, es van deixar créixer durant 24 hores i transcorregut aquest temps es van afegir els fàrmacs HX, AVCRI104P3 i donepezil al medi de cultiu a la concentració de  $10^{-6}$  M. Les cèl·lules es van deixar incubar en presència dels anticolinesteràsics durant 24 hores i posteriorment es va procedir a la lisi cel·lular.

*Extracció i quantificació d'RNA a partir de cultius cel·lulars.*

L'extracció de l'RNA dels lisats cel·lulars es va realitzar mitjançant el *Mini kit* d'extracció d'RNA *Pure Link (Invitrogen)*. Després d'aspirar el medi de cultiu, les cèl·lules es van rentar amb PBS, i a continuació se'ls hi va afegir el tampó



de lisi proporcionat pel *kit* a l'1% de  $\beta$ -mercaptoetanol (300  $\mu$ l tampó/pou, 24 pous). El tampó de lisi conté isotiocianat de guanidina, una sal cotròpica capaç de protegir l'RNA de les RNases endògenes. Es van rascar els pous de les plaques amb un rasclat per tal de desenganxar les cèl·lules, i els lisats es van traspasar a tubs estèrils lliures d'RNases. L'RNA es va aïllar, rentar i eluir amb el material proporcionat pel *kit* i seguint les instruccions del mateix. Es va obtenir un volum final d'RNA de 50  $\mu$ l per mostra.

Del volum obtingut se'n van fer dues alíquotes, una de 40  $\mu$ l i l'altra de 10  $\mu$ l. La de 40  $\mu$ l es va congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  per posteriors experiments, i la de 10  $\mu$ l es va tractar amb desoxiribonucleasa (DNasa) per eliminar possibles restes de DNA genòmic. El DNA genòmic afecta la quantificació de l'activitat transcripcional, ja que durant la reacció de la PCR s'amplifica juntament amb el cDNA. Per realitzar el tractament amb la DNasa es va utilitzar el *kit DNA-free (Invitrogen)*. Seguint les instruccions del *kit*, per cada  $\mu$ g i fins a 10  $\mu$ g d'RNA de mostra, es va afegir 1  $\mu$ l del tampó DNasa I 10x i 1  $\mu$ l de la DNasa I (1 U/ $\mu$ l). Les mostres es van deixar incubar 15 minuts a temperatura ambient (TA). La DNasa I es va inactivar amb l'addició d'1  $\mu$ l d'EDTA 25 mM per cada 10  $\mu$ l de mostra i la posterior incubació durant 10 minuts a  $65^{\circ}\text{C}$ .

Dels 10  $\mu$ l tractats, 2  $\mu$ l es van fer servir per a la quantificació i l'anàlisi de qualitat de l'RNA. El volum restant, a la dilució adequada, es va utilitzar per a la PCR. La concentració d'RNA es va determinar per espectrofotometria mesurant l'absorbància de les mostres a 260 nm i tenint en compte que una unitat de densitat òptica de 260 nm correspon a 40  $\mu$ g/ml d'RNA. La puresa de l'RNA es va calcular a partir de la relació  $\text{DO}_{260/280}$ . Es va utilitzar l'aparell *NanoDrop Spectrophotometers (Thermo scientific)* i el programa *Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystem)*.

*Reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa inversa en temps real (qRT-PCR).*

En la qRT-PCR un bri d'mRNA es retrotranscriu a DNA complementari (cDNA)

mitjançant la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. El resultat s'amplifica en una PCR en temps real que permetrà detectar i quantificar l'activitat transcripcional dels gens d'interès valorant absoluta o relativament la quantitat de DNA generat.

La qRT-PCR es va dur a terme mitjançant el *kit EXPRESS One-Step SYBRGreenER*, que proporciona els reactius necessaris per realitzar la transcripció inversa i la PCR en un sol pas (*SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal* i *SuperScript Mix for One-Step SYBR GreenER*), els encebadors dels gens d'interès (0.4 µl/encebador, 10 µM) i les mostres d'RNA (5 µl/mostra, 2 ng/µl) obtingudes a partir de l'extracció descrita anteriorment i diluïdes amb aigua DEPC fins a la concentració requerida. La reacció va tenir lloc en una placa de 96 pous i de cada mostra se'n van fer duplicats. Com a control negatiu, per descartar la contaminació amb DNA genòmic, es van afegir mostres sense retrotranscriptasa. La manipulació de l'RNA es va dur a terme en condicions asèptiques a 4°C i lliure d'RNases amb material estèril doblement autoclavat.

Els encebadors que es van utilitzar van ser els descrits per Shani Ben-Ari et cols., i com a gen control es va seleccionar l'*Ndufc1* (NADH deshidrogenasa ubiquinona subunitat C1 mitocondrial):

<i>mRNA</i>	<i>Forward primers</i>	<i>Reverse primers</i>
AChE-S humà	CTTCCTCCCCAAATTGCTC	TCCTGCTTGCTGTAGTGGTC
AChE-R humà	CTTCCTCCCCAAATTGCTC	GGGGAGAAGAGAGGGGTTAC
<i>Ndufc1</i> humà	GTAGTGCTGCGCTCGTTTT	GTTAGGTTTGGCATTGACTGG

La placa es va dipositar en el termociclador (*Bio-Rad*). La síntesi de cDNA es va realitzar en una primera fase de 5 minuts a 50°C. La PCR es va dur a terme en 40 cicles de dues etapes, l'etapa de desnaturalització de 15 segons a 95°C i l'etapa d'hibridació/extensió d'1 minut a 60°C. La temperatura d'hibridació es va decidir en funció de les temperatures de fusió ( $T_m$ ) dels encebadors.

### Identificació i quantificació de les còpies de cDNA

Per a la detecció de l'amplificació es va utilitzar el colorant fluorogènic *SYBRGreen*, que s'uneix a tot el DNA de doble cadena format durant l'amplificació. El colorant *SYBRGreen* absorbeix la llum a una longitud d'ona de 494 nm i emet fluorescència a 521 nm. L'amplificació d'un gen concret produeix un increment de la quantitat de fluorescència amb cada cicle d'amplificació que es detecta amb sensors i queda registrat en una corba de fluorescència la magnitud de la qual, en cada un dels cicles, depèn del nombre de còpies teòriques existents d'un determinat gen en la mostra inicial. Així la PCR en temps real permet fer un seguiment de la reacció d'amplificació durant el temps. Aquesta reacció, abans de saturar-se, segueix una fase lineal durant la qual es poden determinar les diferències d'expressió entre els diferents grups experimentals. La quantificació de l'expressió dels gens es va fer mitjançant el sistema *RT-Biorad CFX96*.

Els resultats, expressats en cicles ( $C_T$ ), van ser normalitzats amb la quantitat del gen control (*Ndufc1*), i linealitzats mitjançant la fórmula  $2^{-C_T}$  segons el mètode descrit per Kenneth J. Livak et cols. (Livak & Schmittgen 2001).

## **2.2. Estudi dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic HX en el model de neurotoxicitat amb l'àcid kaínic en ratolins C57BL/6**

### **2.2.1. Disseny experimental i tractament farmacològic**

Es van fer tres grups de ratolins mascle C57BL/6 (10 animals per grup). Un grup va ser tractat amb una solució al 0,9% de NaCl (10 ml/kg, i.p.) durant 21 dies. El segon grup va rebre el mateix tractament que el primer i en les mateixes condicions, però un dia més tard de l'última administració de NaCl se li va punxar una dosi única d'àcid kaínic (28 mg/kg, i.p.). El tercer grup es va tractar amb la huprina X (0,08 mg/kg, i.p.) durant 21 dies, i un dia més tard també va rebre una dosi única d'àcid kaínic (28 mg/kg, i.p.) (Crespo-Biel et al. 2007).

Després de l'administració de l'àcid kaínic, per verificar la inducció de neurotoxicitat provocada pel mateix, es va observar la conducta dels animals cada 30 minuts, fins a 4 hores després, avaluant-se la severitat de les crisis epilèptiques provocades per l'àcid d'acord amb una escala arbitrària: absència de convulsions (0), una convulsió (1), 2-5 convulsions (2), 6-10 convulsions (3), més de 10 convulsions o una crisi tònico-clònica severa (4) i mort (5) (Mulle et al. 1998).

Els animals van ser sacrificats a les 48 hores de l'administració de l'àcid kaínic (Crespo-Biel et al. 2007). Posteriorment se'ls hi va extreure el cervell separant-ne l'hipocamp, el còrtex (parietal) i el còrtex frontal. Els còrtexs frontals de 6 ratolins de cada grup es van utilitzar per a l'estudi dels nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'AChe per qRT-PCR. Els hipocamps i els còrtexs parietals es van fer servir per avaluar l'expressió de determinades proteïnes (anti)apoptòtiques mitjançant la tècnica del *Western blot* (WB), així com per determinar l'activitat de les caspases 3 i 7. Els quatre cervells restants de cada grup es van dividir en dos meitats, una es va utilitzar per estudiar les proteïnes implicades en la neuroinflamació i la neurogènesi per immunohistoquímica (IHQ) i l'altra també es va fer servir per als experiments de WB. La mortalitat va ser del 10%. La dissecció del cervell i l'obtenció de les diferents regions es va dur a terme a una temperatura de 4°C i posteriorment es van emmagatzemar a -80°C. El pes mig del teixit dels còrtexs va ser de  $74 \pm 3.16$  mg, el dels hipocamps de  $32 \pm 3.16$  mg, i el dels còrtexs frontals de  $34 \pm 2.85$  mg.

### **2.2.2. Determinació dels nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'AChe per qRT-PCR**

#### *Extracció i quantificació d'RNA a partir de còrtex de ratolí.*

L'extracció de l'RNA del còrtex frontal dels ratolins es va realitzar mitjançant el *Mini kit* d'extracció d'RNA *Pure Link* (Invitrogen). Tot el teixit del còrtex frontal de les mostres es va traspasar en tubs d'homogeneïtzació segons les indicacions del *kit*. A cada tub es van afegir 600 µl del tampó de lisi

proporcionat pel *kit* a l'1% de  $\beta$ -mercaptoetanol (el volum de tampó a afegir depèn del pes del teixit i ve indicat a les instruccions del *kit*). Les mostres es van homogeneïtzar amb el *Polytron* a 70 V, 5 segons, dos cops. L'RNA es va aïllar del teixit, es va rentar i es va eluir seguint el protocol del *kit*. Del volum final d'RNA obtingut (50  $\mu$ l/mostra aprox.), 2  $\mu$ l es van destinar a la quantificació i a l'anàlisi de qualitat. El volum restant es va congelar a -80°C i es va utilitzar per a la PCR a la dilució adequada.

*Reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa inversa en temps real (qRT-PCR).*

La qRT-PCR es va dur a terme seguint la mateixa metodologia discutida en l'apartat 2.1.3. En aquest cas, els encebadors pels gens de l'AChE-S i l'AChE-R i pel gen de la  $\beta$ Actina, corresponent al control intern, van ser els descrits per Moral-Naranjo et cols.:

<i>mRNA</i>	<i>Forward primers</i>	<i>Reverse primers</i>
AChE-S ratolí	ATTTTGCCCGCACAGGGGAC	CGCCTGGTCCAGAGTATCGGT
AChE-R ratolí	ATTTTGCCCGCACAGGGGAC	CCCCACTCCATGCGCCTAC
$\beta$ Actina ratolí	AGAAAATCTGGCACACACC	GGGGTGTGAAGGTCTCAA

### 2.2.3. Determinació de l'expressió de les proteïnes Bcl2, pAkt/Akt, pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ , sinaptofisina i p25/p35 per *Western blot (WB)*

*Obtenció de proteïnes a partir de còrtex i hipocamp de ratolí.*

Per a l'obtenció dels extractes proteics a partir del còrtex i l'hipocamp dels ratolins, el teixit va ser homogeneïtzat (*Polytron*, 70 V, 5 segons, dos cops) en tampó d'homogeneïtzació (Taula 4) a una proporció d'1:10 (p/v) juntament amb els inhibidors de les proteases i les fosfatases, quedant el teixit a una concentració de 0.1 g/ml. Els homogenats es van centrifugar a 12.000 g durant 10 minuts, i els sobrenedants (100-300  $\mu$ l/mostra), que contenen la major part

dels extractes proteics solubles, van ser al·licotats i emmagatzemats al congelador de -80°C. Tot el procés es va realitzar íntegrament a 4°C.

**Taula 4.** Composició del tampó d'homogeneïtzació.

Tampó d'homogeneïtzació

Tritó X-100	1.5% (v/v)
EDTA pH 8.0	1 mM
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
Glicerol	10% (v/v)
DTT	1 mM
Inhibidors de les proteases i les fosfatases	1% (v/v) (s'afegeixen abans d'utilitzar el tampó)

*Quantificació proteica: mètode de Bradford.*

El contingut proteic soluble es va quantificar mitjançant el mètode de *Bradford* (Bradford 1976). El mètode es va dur a terme seguint les indicacions del fabricant del reactiu de *Bradford* (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*), utilitzant com a proteïna patró l'albumina sèrica bovina (BSA). A partir d'una recta patró es va valorar l'absorbància de les mostres amb l'espectrofotòmetre *Perkin Elmer Lambda 2* a 595 nm.

*Preparació de les mostres per a l'electroforesi.*

Un cop determinat el contingut proteic de les mostres, es van diluir amb aigua destil·lada fins a una concentració de 5 µg/µl i es van bullir durant 5 minuts amb el tampó de càrrega (Taula 5). El tampó de càrrega conté el reactiu β-mercaptoetanol, que desnatura les proteïnes en reduir els ponts disulfur de les mateixes, SDS, que s'uneix als polipèptids desnaturalitzats carregant-los negativament, i glicerol, que proporciona pes a la mostra. El tampó de càrrega es va afegir a la mostra en proporció 1:1 (v/v).

**Taula 5.** Composició del tampó de càrrega.

Tampó de càrrega per a proteïnes

Tris pH 6.8	0.277 M
SDS	4.5% (p/v)
Glicerol	45% (v/v)
Blau de bromofenol	<0.015% (p/v) (punta d'espàtula, per fer visible la mostra)
$\beta$ -mercaptoetanol	10% (v/v)

Les mostres es van deixar refredar 10 minuts a TA.

*Separació electroforètica de proteïnes en gels de poliacrilamida-SDS (SDS-Page).*

L'electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS és una tècnica de separació de proteïnes segons el seu pes molecular.

Les mostres, després de tractar-les amb el tampó de càrrega es carreguen en gels de poliacrilamida-SDS. L'aplicació d'un camp elèctric en aquestes condicions fa que la migració de les proteïnes cap a l'elèctrode positiu es faci d'acord amb el seu pes molecular.

Preparació dels gels de poliacrilamida-SDS:

Els gels consten de dues fases que es corresponen a dos gels diferents, l'*stacking* o gel superior, que serveix per concentrar les proteïnes, i el *running*, *resolving*, o gel inferior, que serveix per separar les proteïnes i la mida del seu porus es decideix en funció dels pesos moleculars dels polipèptids a resoldre. El tamany del porus depèn del percentatge d'acrilamida que conté el gel i oscil·la entre el 5% i el 15% per a proteïnes d'alt i baix pes molecular respectivament.

Els gels es van preparar a partir de dues solucions, una pel *running* (A) i l'altra per l'*stacking* (B). Per fer la solució A es van barrejar tots els components de la mescla (acrilamida, tris-HCl i SDS) en les proporcions indicades en la Taula 6,

afegint els reactius persulfat amònic (APS) i TEMED al final, donat que inicien i catalitzen la reacció de polimerització del gel. La solució A es va dipositar entre dos vidres paral·lels fixats en un suport de gels i es va deixar gelatinitzar durant 20 minuts a TA. A continuació es va preparar i afegir la solució B, i seguidament es va col·locar una pinta de 15 carrils i d'1.5 mm de grossor per marcar els pous on carregar les mostres. La solució es va deixar polimeritzar durant 20 minuts.

**Taula 6.** Composició de les solucions A i B.

Solució A: Gel inferior separador (*resolving gel*) (7.5 ml/gel aprox.)

Acrilamida	7.5-10% (v/v)
Tris-HCl pH 8.8	0.375 M
SDS	0.25% (p/v)
Persulfat amònic 10% (p/v)	0.075% (v/v)
TEMED	0.15% (v/v)

Solució B: Gel superior concentrador (*stacking gel*) (3.5 ml/gel aprox.)

Acrilamida	5.1% (v/v)
Tris-HCl pH 6.8	0.0325 M
SDS	0.1% (p/v)
Persulfat amònic 10% (p/v)	0.1% (v/v)
TEMED	0.01% (v/v)

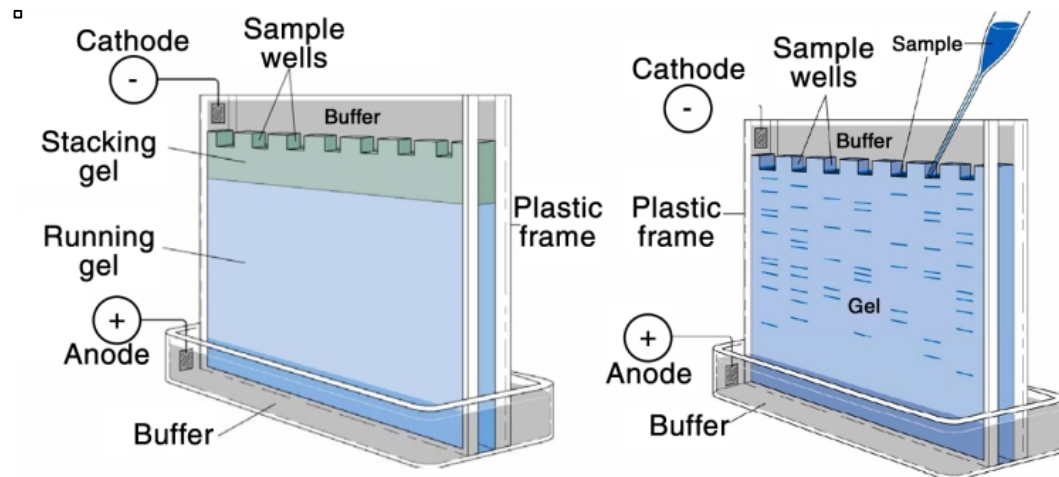
Per a l'electroforesi, els gels es van dipositar en una cubeta amb dos elèctrodes plena de tampó d'electroforesi (Taula 7). Es van carregar les mostres amb una xeringa *Hamilton* (20 µl mostra/pou a una concentració de 2.5 µg proteïna/µl) i es van fer córrer a 120 V fins que el front de l'electroforesi, marcat pel compost blau de bromofenol, va arribar a l'extrem inferior del gel (1-2 hores). Com a patró de pes molecular de les proteïnes es va afegir en un dels pous dels extrems el *Precision Plus Protein Standards Dual Color* de *Bio-Rad*, que avarca pesos moleculars d'entre 10 i 250 kDa (Fig.21).



**Taula 7.** Composició del tampó d'electroforesi.

Tampó d'electroforesi

Tris	0.25 M
Glicina	1.9 M
SDS	1% (p/v)



**Fig.21** Cubeta d'electroforesi vertical (Adaptat

d'[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=isotacoforesis&lang=2](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=isotacoforesis&lang=2)).

*Immunotransferència (Western blot), revelat i anàlisi de proteïnes.*

Les mostres proteiques, un cop separades mitjançant el gel de poliacrilamida-SDS, es transfereixen a membranes sòlides per tal de que posteriorment puguin ser identificades per anticossos específics.

Transferència:

Es va col·locar el gel de poliacrilamida-SDS en contacte amb la membrana de nitrocel·lulosa i entre quatre peces de paper *Whatman* (dues per banda) humides en tampó de transferència (Taula 8).

Per dur a terme la transferència es va utilitzar l'aparell *Trans-Blot Turbo-Transfer System* de *Bio-Rad* (25 V, 1 A, 30 min), sistema que aplica un camp

elèctric perpendicular que va des del gel, que es troba encarat al càtode (-), a la membrana, encarada a l'ànode (+).

**Taula 8.** Composició del tampó de transferència.

Tampó de transferència

Tris	0.25 M
Glicina	2 M
Metanol	20% (v/v)

Finalitzada la transferència es va deixar la membrana en solució tampó T-TBS (Taula 9) al 5% de llet en pols desnatada per a la seva saturació (1 hora, TA, agitació). Després de tres rentats amb el T-TBS (5 min, TA, agitació) la membrana es va incubar amb els anticossos primari i secundari.

**Taula 9.** Composició del T-TBS.

T-TBS (*Tris-Buffered Saline 0.2% Tween 20*)

NaCl	0.150 M
Tris-HCl pH 7.5	0.025 M
Tween 20	0.2%

Immuno-detecció

Les tècniques d'immuno-detecció es basen en la interacció específica antigen-anticòs. Posteriorment es realitza la detecció del complex antigen-anticòs primari mitjançant un anticòs secundari específic d'espècie que s'uneix al primari i en permet la visualització.

Els anticossos es van preparar en T-TBS seguint les indicacions de la casa comercial a les dilucions especificades en la Taula 10. Les incubacions amb els anticossos primaris van ser *overnight* (ON) a 4°C i en agitació (exceptuant la  $\beta$ Actina que es va incubar durant 3 hores a TA). Després de dos rentats amb el T-TBS (5 min, TA, agitació) les membranes es van incubar amb els anticossos secundaris 1 hora a TA en agitació. Després de tres rentats amb el T-TBS (5 min, TA, agitació) es van revelar les membranes.

**Taula 10.** Dilucions dels anticossos utilitzats.

<i>Anticòs 1ri</i>	<i>Dil·lució</i>	<i>Anticòs 2ri</i>	<i>Dil·lució</i>
Akt1 (Sigma)	1:1000	Rabbit (PIERCE)	1:2000
pAkt1(Ser473) (Sigma)	1:1000	Rabbit (PIERCE)	1:2000
Bcl2 (Bd Biosciences)	1:1000	Mouse (Bd Biosciences)	1:5000
GSK3 $\beta$ (Cell Signaling)	1:1000	Rabbit (PIERCE)	1:2000
pGSK3 $\beta$ (Ser9) (Cell Signaling)	1:1000	Rabbit (PIERCE)	1:2000
p35(C-19) (Santa Cruz)	1:1000	Rabbit (PIERCE)	1:2000
Sinaptofisina (Dako)	1:2000	Mouse (Bd Biosciences)	1:5000
$\beta$ Actina (Sigma)	1:10000	Mouse (Bd Biosciences)	1:5000

### Revelat i anàlisi

La visualització de les proteïnes immuno-detectades es va realitzar per quimioluminescència. Els anticossos secundaris es troben conjugats amb la peroxidasa de rave (HRP, *horseradish peroxidase*). Aquest enzim catalitza la reacció d'oxidació del luminol en presència de peròxid d'hidrogen i en condicions alcalines, passant-lo d'un estat relaxat a un estat excitat inestable, que en recuperar-se emet un tipus de llum que pot ser detectada per una pel·lícula fotogràfica o per càmeres CCD (*charge-coupled device* o dispositiu de càrrega acoblada), que capten una imatge digital del *Western blot*.

Les senyals de quimioluminescència es van detectar en exposar la membrana de nitrocel·lulosa, prèviament incubada amb els anticossos corresponents, a la mescla dels dos reactius *ECL* (*enhanced chemiluminescence*) (1:1). La membrana es va incubar amb 2 ml d'*ECL* durant 1 minut en agitació. Seguidament es va revelar de forma automàtica a través del programa *GeneSnap*. Després d'un temps d'exposició de la membrana en absència de llum, es detecta i s'enregistra la fluorescència en una imatge digital. El temps d'exposició varia en funció de l'anticòs, oscil·lant sempre entre 30 segons i 20 minuts. La llum que es genera en aquesta reacció de quimioluminescència amplificada presenta un màxim d'intensitat als 5-20 minuts, i a partir d'aquest màxim comença a decaure lentament, presentant una semivida d'aproximadament 60 minuts.

Amb el programa *GeneTools* es van quantificar per densitometria les bandes específiques de les imatges enregistrades. Als resultats obtinguts se'ls hi va restar el seu *background* o soroll de fons, i posteriorment van ser normalitzats amb la densitat òptica de la  $\beta$ Actina o control intern.

#### **2.2.4. Determinació de l'activitat de les caspases 3/7 en el còrtex per luminescència**

Mitjançant el *kit caspase-Glo 3/7 Assay* de *Promega* es va determinar l'activitat de les caspases 3 i 7 en els extractes proteics del còrtex dels ratolins procedents dels diferents grups de tractament.

L'assaig es basa en la capacitat luminògena de l'aminoluciferina en ser catalitzada per la luciferasa. Les caspases 3 i 7 alliberen l'aminoluciferina del complex Z-DEVD-aminoluciferina permetent que es produeixi la reacció anterior. La senyal luminescent arriba al seu màxim en aproximadament 1 hora i se'n manté varies.

L'assaig es va dur a terme d'acord amb les instruccions descrites en el *kit*. En una placa de 96 pous es va dipositar la mostra (100  $\mu$ g/20  $\mu$ l per pou) i el reactiu del *kit* (el complex Z-DEVD-aminoluciferina amb la luciferasa). Les mostres es van afegir per triplicat. La luminescència es va mesurar amb el luminòmetre de microplaques *Perkin Elmer VICTOR 3*. A partir dels 40 minuts de reacció es van fer lectures cada 20 minuts durant un període de dues hores. Per als càlculs es van utilitzar les mitges dels valors de les tres lectures amb més luminescència.

#### **2.2.5. Determinació de l'expressió dels marcadors de gliosi i neurogènesi en l'hipocamp per immunohistoquímica (IHQ): GFAP, Iba1 i DCX**

Per als experiments d'immunohistoquímica (IHQ), un cop extrets els cervells i abans de ser emmagatzemats a  $-80^{\circ}\text{C}$ , es va seguir un procés de congelació amb isopentà. Els cervells es van fixar en paraformaldehid (PFA) al 4% en

tampó fosfat (TP) 0.1 M (Taula 11) en un volum 20 cops superior al seu durant 24 hores a 4°C. Després de dos rentats amb el TP 0.1 M de 20 minuts a 4°C per eliminar el fixador, els cervells es van submergir en una solució de sacarosa al 30% en TP 0.1M durant 48 hores a 4°C. Passat aquest temps es van treure de la solució de sacarosa, es van eixugar bé amb un paper de cel·lulosa per eliminar-ne l'excés, i es van dipositar dins d'una flamera de metall plena d'isopentà (2-metilbutà) durant 2 minuts a una temperatura que oscil·lava entre els -50 i el -40°C. Per mantenir la temperatura es va treballar en neu carbònica i sota la campana en tot moment. A continuació es van guardar les mostres en paper de plata refredat prèviament i es van emmagatzemar a -80°C.

**Taula 11.** Composició del tampó fosfat 0.1 M (TP).

Tampó fosfat 0.1 M (TP) pH 7.4

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05 M
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05 M

El tipus de tècnica immunohistoquímica que es va utilitzar va ser la flotació lliure. Es van tallar al criòstat sèries paral·leles de seccions sagitals del cervell dels ratolins de 20 µm de gruix. Els talls es van dipositar en una placa de 24 pous que contenia solució *antifreeze* (Taula 12) pel seu posterior emmagatzematge a -20°C. De cada cervell es va obtenir una mitjana de 200 talls repartits en 10 pous.

Es van seleccionar els talls on l'hipocamp era més visible, es van dipositar en una placa de 24 pous, i es van rentar tres vegades amb el tampó fosfat salí (PBS) (Taula 3) (1.6 ml/pou, 20 min, TA, agitació) i una vegada amb PBS al 0.3% de tritó (PBS-T) (1.6 ml/pou, 7 min, TA, agitació). Els talls es van pre-incubar amb el PBS-T al 0.5% de BSA per reduir el marcatge inespecífic (1.6 ml/pou, 45 min, TA, agitació). Les incubacions amb els anticossos primaris diluïts en PBS-T al 0.1% de BSA (Taula 12) es van realitzar ON a 4°C en agitació (0.8 ml/pou) o d'acord amb les especificacions de la casa comercial. Després de tres rentats amb el PBS-T (1.6 ml/pou, 10 min, TA, agitació) els

talls es van incubar amb els anticossos secundaris diluïts en PBS-T al 0.1% de BSA (Taula 13) durant 1 hora a TA en agitació (0.6 ml/pou). Abans del muntatge es van fer tres rentats amb el PBS i tres amb el PB (PBS sense les sals NaCl i KCl) (1.6 ml/pou, 10 min, TA, agitació).

Com a control negatiu, per poder valorar l'autofluorescència del teixit, es van utilitzar talls sense anticòs primari.

Com a marcador nuclear es va utilitzar el reactiu de *Hoechst* que facilita la identificació de les àrees a analitzar i la distinció entre el nucli i el citoplasma. Aquest es va afegir directament als pous 30 minuts abans de finalitzar la incubació amb l'anticòs secundari a una concentració final d'1 µg/ml.

**Taula 12.** Composició de la solució *antifreeze*.

Solució *antifreeze*

PBS	30%
Etilenglicol	40%
Glicerol	30%

Les dilucions del anticossos utilitzats s'especifiquen en la taula següent:

**Taula 13.** Dilucions dels anticossos utilitzats.

<i>Anticòs 1ri</i>	<i>Dil·lució</i>	<i>Anticòs 2ri</i>	<i>Dil·lució</i>
GFAP ( <i>Dako</i> )	1:3000	Cyn3 ( <i>Jackson</i> ) (rabbit)	1:400
Iba1 ( <i>Abcam</i> )	1:200	Alexa Fluor 488 ( <i>Jackson</i> ) (goat)	1:400
Doublecortin ( <i>Abcam</i> )	1:2000	Cyn3 ( <i>Jackson</i> ) (rabbit)	1:400

Posteriorment es van muntar sis talls de cervell a cada portaobjecte, es van deixar assecat i finalment es van cobrir de medi de muntatge *Fluoprep* i d'un cobreobjecte.

Les preparacions es van observar al microscopi de fluorescència a 10 i 20 augments amb els corresponents filtres en funció de les longituds d'ona dels marcatges fluorescents dels anticossos secundaris (Cy3 en vermell i Alexa

Fluor 488 en verd) i del reactiu *Hoechst* (llum ultravioleta o UV). Per cada anticòs es va determinar i fixar la sensibilitat òptima.

Les imatges es van analitzar mitjançant el programa lliure *ImageJ*. Per als càlculs es van agafar les mitjanes (amb els *backgrounds* restats) de les densitats òptiques de les imatges dels 6 talls de cada preparació per separat. Els talls del cervell de cada preparació eren d'un animal diferent.

### **2.3. Estudi dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 en ratolins 126/SV x C57BL/6 de 12 mesos**

#### **2.3.1. Disseny experimental i tractament farmacològic**

Es van fer dos grups de ratolins mascle 126/Sv x C57BL/6 (10 animals per grup). El primer grup o el grup control es va tractar amb una solució al 0,9% de NaCl (10 ml/kg, i.p.) durant 21 dies. Al segon grup se li va administrar l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 (0.6  $\mu$ mol/kg, i.p.) també durant 21 dies. Un dia després de l'última dosi els animals van ser sacrificats per decapitació. Es van dissecar els cervells i se'n van extreure les regions del còrtex i de l'hipocamp, sempre a una temperatura de 4°C. Un cop pesat el teixit es va emmagatzemar a -80°C. El pes mig del teixit dels còrtexs va ser de 84 $\pm$ 3.16 mg, el dels hipocamps de 39 $\pm$ 3.16 mg i el dels còrtexs frontals de 29 $\pm$ 2.85 mg.

En aquest estudi es van determinar en els diferents grups de tractament:

- els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHé en el còrtex frontal,
- l'expressió de les proteïnes Bcl2, pAkt/Akt, pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ , sinaptofisina i p25/p35 en l'hipocamp i el còrtex parietal,
- l'activitat de les caspases 3/7 en el còrtex parietal i
- l'expressió dels marcadors de gliosi GFAP i Iba1, així com de neurogènesi DCX en l'hipocamp.

Les metodologies aplicades van ser les descrites en els apartats 2.1.3./2.2.2.,

2.2.3., 2.2.4. i 2.2.5., respectivament.

## **2.4. Estudi dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 en ratolins triple transgènics (3xTg) per l'Alzheimer (PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>SWE</sub>, tau<sub>P301L</sub>) de 12 mesos**

### **2.4.1. Disseny experimental i tractament farmacològic**

Amb els ratolins transgènics es va procedir de la mateixa manera que en l'apartat anterior (2.3.1.). El pes mig del teixit dels còrtexs va ser de  $86 \pm 9.49$  mg, el dels hipocamps de  $35 \pm 3.16$  mg i el dels còrtexs frontals de  $29 \pm 2.53$  mg.

En aquest estudi es van determinar els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE en el còrtex frontal, l'expressió de les proteïnes Bcl2, pAkt/Akt, pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ , sinaptofisina i p25/p35 tant en l'hipocamp com en el còrtex, l'activitat de les caspases 3/7 en el còrtex, i els marcadors de gliosi (GFAP i Iba1) i de neurogènesi (DCX) en l'hipocamp, en els diferents grups de tractament. Les metodologies aplicades van ser les discutides en els apartats 2.1.3./2.2.2., 2.2.3., 2.2.4. i 2.2.5., respectivament.

A diferència dels models anteriors, en aquest cas també es va analitzar l'expressió dels pèptids A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub> en les seves dues formes, la soluble i la insoluble, tal i com es descriu a continuació.

### **2.4.2. Determinació de l'expressió dels pèptid A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub> en l'hipocamp i el còrtex per ELISA (*Enzyme linked immunoabsorbent assay*)**

Per mesurar l'expressió dels pèptids A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub> presents en l'hipocamp i el còrtex es va utilitzar el *kit ELISA human Amyloid Beta40/42 brain* de Millipore. L'extracció i la quantificació proteica es va realitzar d'acord amb l'apartat 2.2.3.

Seguint les instruccions del *kit* i en una microplaca de 96 pous recoberta amb l'anticòs monoclonal específic per a les proteïnes A $\beta$ <sub>40</sub> o A $\beta$ <sub>42</sub>, es van afegir 50



µl de cada mostra per triplicat.

Les concentracions dels pèptids A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub> es van calcular a partir de les absorbàncies obtingudes a 450 nm i 590 nm (espectrofotòmetre *Perkin Elmer Lambda 2*) i es van expressar en pg/mg de proteïna. L'assaig presenta una sensibilitat d'entre 16 i 500 pg/ml i accepta volums iguals o inferiors a 50 µl.

## **2.5. Tractament de les dades i anàlisi estadístic**

Els resultats s'han expressat com la mitjana  $\pm$  l'error estàndard de la mitjana (EEM) dels valors obtinguts d'almenys tres experiments independents.

Per analitzar les diferències entre els grups experimentals s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra i per a mostres desaparellades d'acord amb el plantejament experimental. Per comprovar les mitjanes de més de dos grups de tractament s'ha utilitzat la prova de l'anàlisi de la variança (ANOVA) d'un factor. Un valor de  $p < 0.05$  s'ha considerat significatiu.



## **RESULTATS**



## **1. AVALUACIÓ DELS EFECTES PRODUÏTS PELS INHIBIDORS DE L'ACHÉ AVCRI104P3 I HX EN CÈL·LULES SH-SY5Y TRANSFECTADES AMB ELS GENS DE LES ISOFORMES S I R DE L'ACHE**

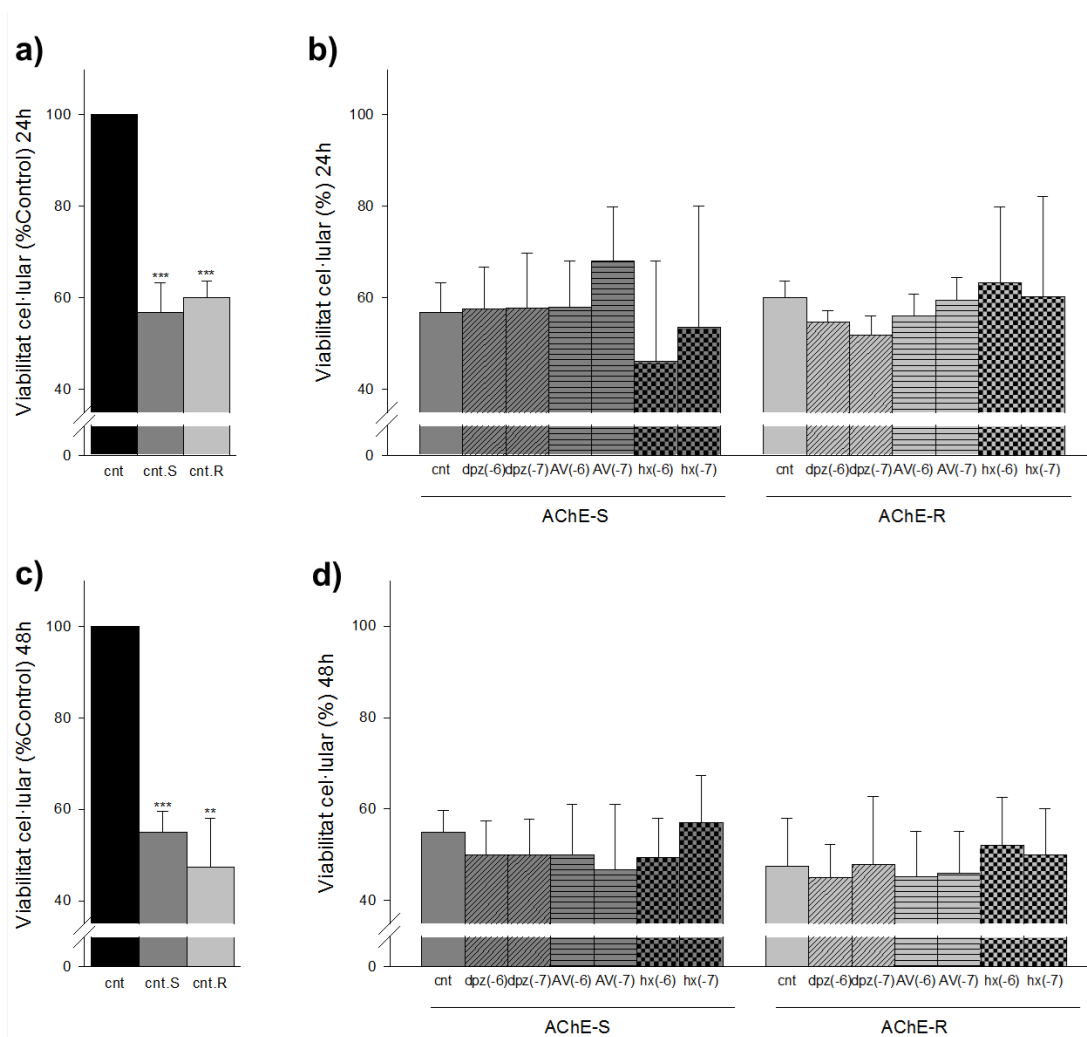
Tal i com s'ha comentat abans, s'ha descrit que les isoformes S i R de l'ACHÉ són modulables pels IACHÉ. L'ACHÉ-S s'associa a un increment de la neurotoxicitat, mentre que l'ACHÉ-R sembla estar relacionada amb els processos de neuroprotecció i reparació. Per avaluar l'efecte dels anticolinesteràsics davant de les dues isoformes, es van transfectar cèl·lules de neuroblastoma humà (SH-SY5Y) amb l'ACHÉ-S i l'ACHÉ-R, i es van tractar amb els fàrmacs AVCRI104P3 i HX. Com a control positiu es va afegir el donepezil (Zimmermann 2013).

### **1.1. Efecte de les isoformes S i R de l'ACHÉ i dels IACHÉ sobre la viabilitat cel·lular**

En primer lloc, es va avaluar l'efecte de les isoformes S i R sobre la supervivència cel·lular, comparant la viabilitat de les cèl·lules transfectades (S, R) amb la de les no transfectades durant 24 i 48 hores. Tal com es mostra a la figura 22a i 22c, les cèl·lules que sobreexpressaven les isoformes S i R van presentar una mortalitat significativament superior respecte a les que no les sobreexpressaven, tant a les 24 hores (S: 43%,  $p < 0.001$ ; R: 40%,  $p < 0.001$ ) com a les 48 hores (S: 45%,  $p < 0.001$ ; R: 53%,  $p < 0.01$ ). L'excés d'ACHÉ, per tant, va disminuir la supervivència cel·lular sense diferenciar entre el tipus d'isoforma (Fig.22a i 22c).

Simultàniament, es va analitzar l'efecte dels anticolinesteràsics donepezil, AVCRI104P3 i HX sobre les cèl·lules transfectades. Els fàrmacs es van estudiar a les concentracions de  $10^{-6}$  M i  $10^{-7}$  M durant un període d'incubació de 24 i 48 hores. En determinar la viabilitat cel·lular, aquesta no es va veure modificada amb la presència dels IACHÉ respecte als grups control de les

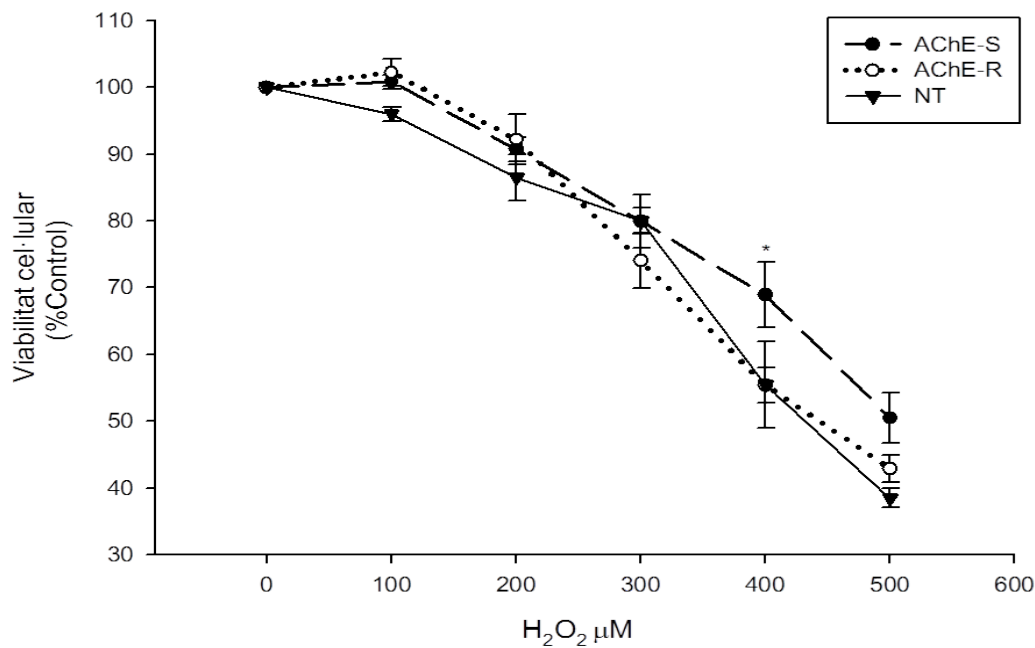
isoformes S i R, descartant-se per tant, un possible efecte neurotòxic per part d'aquests inhibidors en aquestes condicions experimentals (Fig.22b i 22d).



**Fig.22 Efecte de les isoformes S i R de l'AChE i dels IChE donepezil (dpz), AVCR104P3 (AV) i huprina X (hx) a les concentracions de 10<sup>-6</sup> M i 10<sup>-7</sup> M durant un període d'incubació de 24h (a,b) i 48h (c,d) sobre la viabilitat cel·lular en cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb les isoformes de l'AChE. Els valors són les mitjanes ± EEM dels percentatges de viabilitat amb relació al valor control (100%) de tres experiments realitzats per triplicat. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra i per a mostres desaparellades: \*\*p < 0.01 vs. cnt., \*\*\*p < 0.001 vs. cnt.; cnt=control; S=AChE-S; R=AChE-R.**

En segon lloc, es va avaluar el comportament de les isoformes S i R davant del peròxid d'hidrogen realitzant les corresponents corbes de concentració-

resposta vs. una corba control. Es van determinar les concentracions de peròxid necessàries per induir una mortalitat del 50%, i aquestes van ser de 543  $\mu\text{M}$ , 453  $\mu\text{M}$  i 442  $\mu\text{M}$  per a les cèl·lules transfectades amb la isoforma S, la isoforma R i per a les cèl·lules control (no transfectades), respectivament. La figura 23, mostra que solament a la concentració de 400  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  es van observar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre les cèl·lules transfectades amb la isoforma S (69%) i la resta de grups (56%).



**Fig.23** Corbes que mostren la relació entre la concentració d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{M}$ ) i el percentatge de viabilitat de les cèl·lules transfectades amb les isoformes S i R de l'AChE i de les cèl·lules no transfectades (NT). Els valors que es mostren són les mitjanes  $\pm$  EEM dels percentatges de viabilitat de tres experiments realitzats per triplicat. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades: \* $p < 0.05$  vs. AChE-R i vs. NT.

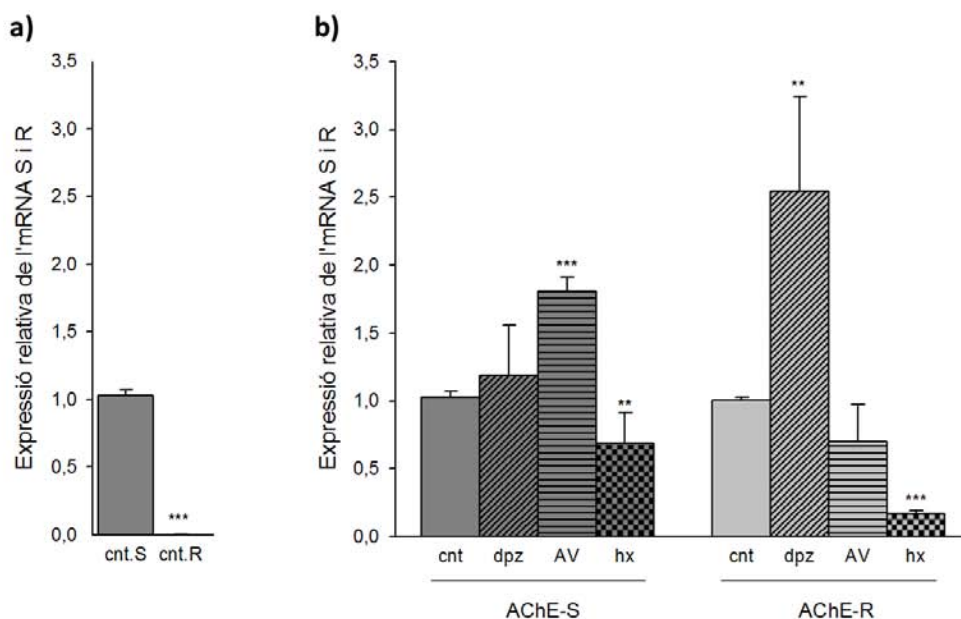
## 1.2. Efecte dels IChE sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'ChE

Per dur a terme aquest estudi, i donat que no s'havien observat diferències en la viabilitat cel·lular, ni entre les diferents concentracions de fàrmacs ni entre els temps d'incubació d'aquests, es va decidir utilitzar la concentració més elevada durant el mínim temps d'exposició. Així, els IChE donepezil, AVCRI104P3 i HX es van incubar a una concentració de  $10^{-6}$  M durant 24 hores. Posteriorment, es va procedir a la lisi cel·lular, l'extracció i l'anàlisi qRT-PCR de l'RNA d'ambdues variants, i l'avaluació dels possibles canvis deguts al tractament amb els anticolinesteràsics.

Prèviament a l'estudi amb els fàrmacs, es van comparar els nivells basals d'mRNA d'ambdues isoformes, i tal i com està descrit en la bibliografia (Perrier et al. 2005), els nivells d'mRNA-S ( $1.03 \pm 0.04$ ) van ser molt superiors als d'mRNA-R ( $0.005 \pm 0.0007$ ,  $p < 0.001$ ), concretament, 200 vegades superiors (Fig.24a).

En avaluar l'efecte dels diferents IChE enfront de les dues isoformes, es van observar resultats diversos per a cada compost. Tal i com mostra la figura 24b, el donepezil va augmentar els nivells d'mRNA-R (154%,  $p < 0.01$ ) sense alterar els nivells d'S. En canvi l'AVCRI104P3, si bé no va modificar significativament els nivells d'mRNA-R, si que va incrementar els d'S de forma significativa (76%,  $p < 0.001$ ). Pel que fa a l'HX, aquesta va disminuir tant l'mRNA-S (33%,  $p < 0.01$ ) com l'mRNA-R (83%,  $p < 0.001$ ).





**Fig.24 (a) Expressió relativa de l'mRNA de les isoformes S i R de l'AChe respecte a l'mRNA-S (b) Efecte dels anticolinesteràsics donepezil, AVCR104P3 i HX sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R en cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb ambdues variants.** Les barres representen els resultats de la mesura comparativa dels cicles d'expressió de l'mRNA de les isoformes obtinguts per qRT-PCR. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM dels duplicats de 3 experiments de mínim quatre mostres per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades: \*\*p<0.01 vs. cnt., \*\*\*p<0.001 vs. cnt.S. i vs. cnt.; cnt=control; dpz=donepezil ( $10^{-6}$  M); AV=AVCR104P3 ( $10^{-6}$  M); hx=hupirina X ( $10^{-6}$  M); S=AChE-S; R=AChE-R.

## 2. AVALUACIÓ DELS EFECTES PRODUÏTS PER L'INHIBIDOR DE L'AChe HX EN EL MODEL DE NEUROTOXICITAT AMB L'ÀCID KAÍNIC EN RATOLINS C57BL/6

L'objectiu d'aquest abordatge experimental va ser el d'analitzar l'efecte *in/ex vivo* de l'anticolinesteràsic HX enfront de l'administració d'un neurotòxic, tal com l'àcid kaínic (KA), en ratolins C57BL/6 com a model de degeneració neuronal, donat que estudis previs, *in vitro* i *in vivo*, havien demostrat el caràcter neuroprotector d'aquest anticolinesteràsic.

L'HX (0.08 mg/kg, i.p) es va administrar durant 21 dies, i 24 hores més tard els ratolins van rebre una dosi única d'àcid kaínic de 28 mg/kg (i.p.). Els ratolins van ser observats durant 4 hores a fi i efecte d'identificar i quantificar les convulsions i canvis de comportament entre els diferents grups experimentals. La severitat de les crisis epilèptiques va ser classificada d'acord amb una escala arbitrària: absència de convulsions (0), una convulsió (1), 2-5 convulsions (2), 6-10 convulsions (3), més de 10 convulsions o una crisi tònico-clònica severa (4) i mort (5) (Mulle et al. 1998). No es van observar diferències en el nombre de convulsions o de morts amb el pre-tractament amb l'HX (Taula 14).

**Taula 14.** Severitat de les crisis epilèptiques després de l'administració de l'àcid kaínic segons l'escala de Mulle i cols. (1998). Puntuació obtinguda en l'escala de severitat de les convulsions/ratolins per grup de tractament. ka=àcid kainic; hx=huprina X; n=número de ratolins.

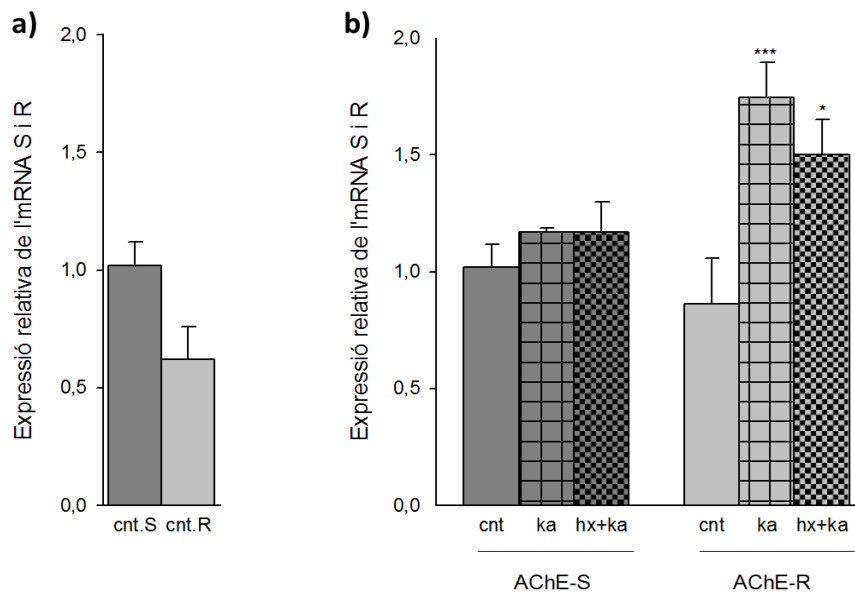
Grups de tractament	Índex de convulsions	n
ka	11±2.6	10
hx+ka	9.8±2.4	10

Els animals van ser sacrificats 48 hores després de l'administració de l'àcid kaínic. Se'ls hi va extreure el còrtex (parietals), el còrtex frontal i l'hipocamp, i es van emmagatzemar a -80°C.

Es van estudiar: (1) els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE en el còrtex frontal (regió cerebral on es produeix de forma majoritària l'*splicing* alternatiu de l'AChE (Livneh et al. 2010)), (2) els nivells d'expressió i l'activitat d'una sèrie de proteïnes implicades en l'apoptosi i en la supervivència cel·lular tant en el còrtex com en l'hipocamp, i (3) la presència de determinades proteïnes relacionades amb l'astrogliosi, la microgliosi i la neurogènesi en l'hipocamp, una de les estructures més afectades en la fisiopatologia dels processos neurodegeneratius, i on s'ha descrit l'existència de noves neurones (Aimone et al. 2014).

## 2.1. Efecte de l'HX sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE en el còrtex frontal

Tal i com es mostra a la figura 25b, els nivells d'mRNA-R es van duplicar amb l'administració del KA (104%,  $p < 0.001$ ), essent l'increment un 30% inferior en el grup dels ratolins pre-tractats amb l'HX (74%,  $p < 0.05$ ). En canvi, els nivells d'mRNA-S no van presentar modificacions entre els diferents grups experimentals.



**Fig.25 (a) Expressió relativa de l'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE respecte a l'mRNA-S (b) Efecte de l'HX sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R en el còrtex frontal de ratolins tractats amb l'àcid kaïníc.** Les barres representen els resultats de la mesura comparativa dels cicles d'expressió de l'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE obtinguts per qRT-PCR. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM dels duplicats de 3 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades: \* $p < 0.05$  vs. cnt., \*\*\* $p < 0.001$  vs. cnt.; cnt=control (sèrum fisiològic 0.9%); ka=àcid kaïníc (28 mg/kg); hx=huprina X (0.08 mg/kg).

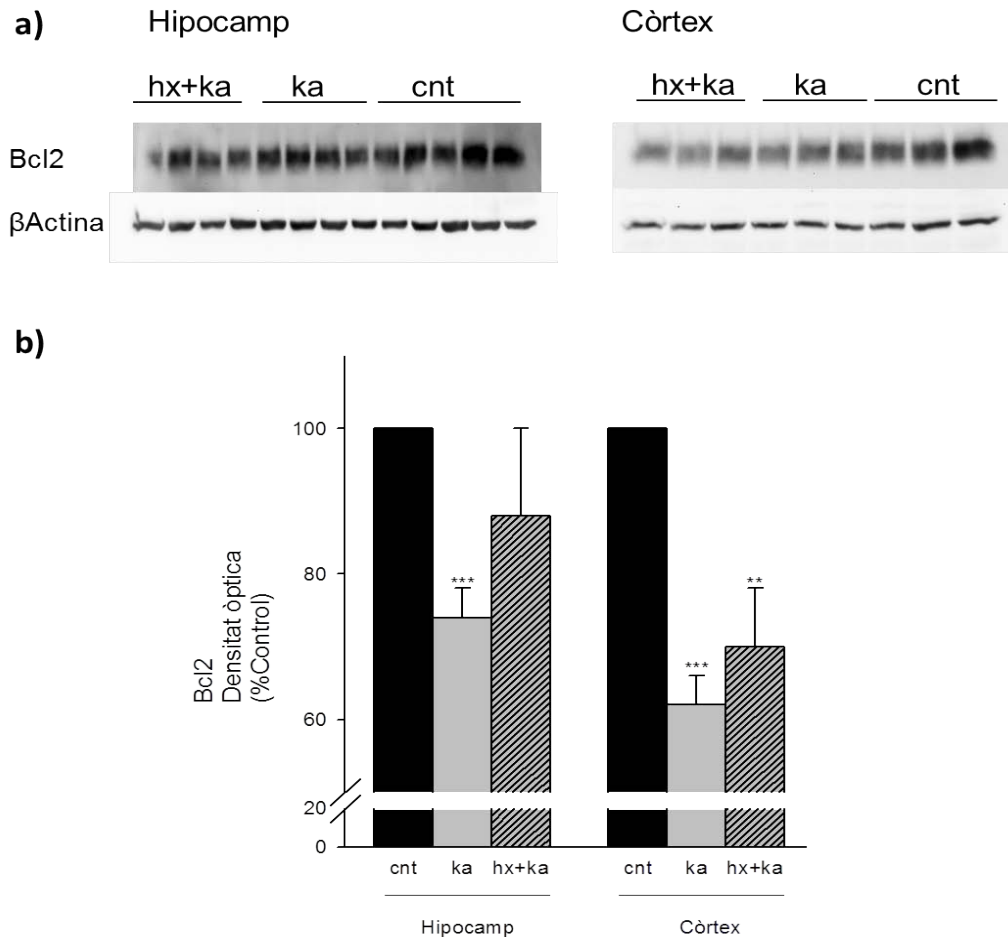
Prèviament a l'estudi dels efectes del KA i de l'HX sobre les isoformes de l'AChE, es van comparar els nivells basals d'mRNA d'ambdues variants. Tot i que no es van observar diferències significatives entre les dues isoformes, els nivells d'mRNA-S van ser un 38% superiors als d'mRNA-R (Fig.25a).

## **2.2. Efecte de l'HX sobre l'expressió de les proteïnes implicades en l'apoptosi i la supervivència cel·lular en l'hipocamp i el còrtex**

Els nivells de la proteïna antiapoptòtica Bcl2, de les formes fosforilades i no fosforilades de l'Akt i la GSK3 $\beta$ , de la sinaptofisina, dels activadors de la Cdk5, i l'activitat de les caspases 3/7, van ser determinats en l'hipocamp i el còrtex dels tres grups experimentals: ratolins control, ratolins tractats amb l'àcid kaínic i ratolins tractats amb el fàrmac HX i l'àcid kaínic.

### **- Bcl2**

La importància de la Bcl2 recau en el seu paper antiapoptòtic, essent una de les principals proteïnes inhibidores de la via intrínseca de la mort cel·lular programada en impedir l'alliberació del citocrom C de la mitocòndria. Tal i com es mostra a la figura 26b, l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl2 va disminuir significativament tant en l'hipocamp (26%,  $p < 0.001$ ) com en el còrtex (38%,  $p < 0.001$ ) dels ratolins tractats amb l'àcid kaínic respecte als controls. Els animals als quals se'ls hi havia administrat prèviament l'anticolinesteràsic HX, van presentar una lleugera tendència a la recuperació dels nivells control d'aquesta proteïna, recuperació més pronunciada en l'hipocamp que en el còrtex, tot i que no va ser significativa (Fig.26b).

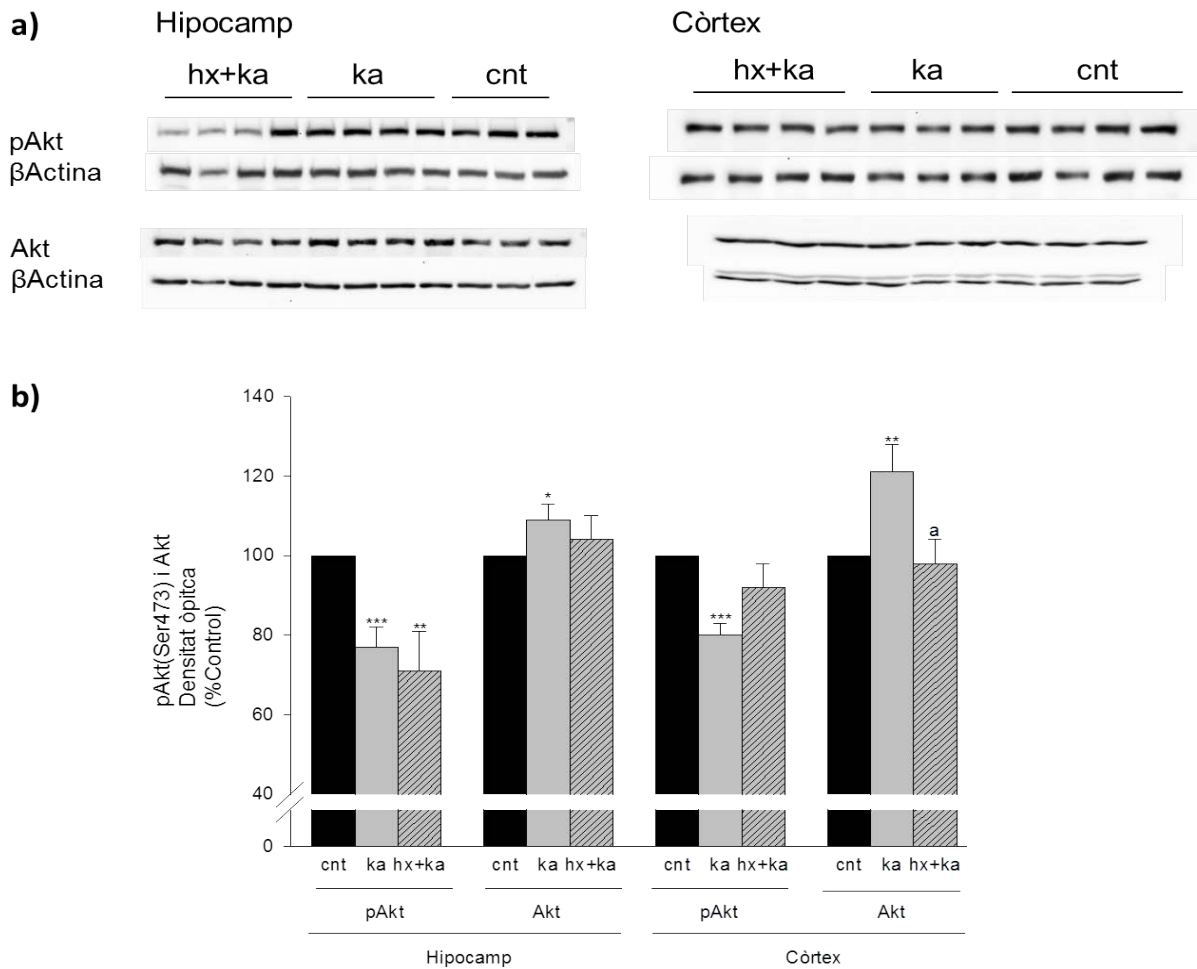


**Fig.26 Efecte de l'HX sobre la Bcl2 en l'hipocamp i el còrtex dels ratolins tractats amb l'àcid kaïníc.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la Bcl2. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de Bcl2. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra i per a mostres no aparellades: \*\* $p < 0.01$  vs. cnt., \*\*\* $p < 0.001$  vs. cnt.; cnt=control (sèrum fisiològic 0.9%); ka=àcid kaïníc (28 mg/kg); hx=huprina X (0.08 mg/kg).

### - pAkt(Ser473)/Akt

Pel que fa a la proteïna Akt, aquesta forma part de la via de senyalització i supervivència de la PI3K/Akt. L'Akt en ser fosforilada per la quinasa PI3K inhibeix diferents proteïnes apoptòtiques com la Bad i d'altres que formen part de la família FOXO, així com la proteïna GSK3 $\beta$ , implicada en la fosforilació de la tau. A la figura 27b s'observa un descens significatiu de l'expressió de la forma fosforilada de l'Akt del grup KA respecte al grup control, tant en

l'hipocamp (23%,  $p < 0.001$ ) com en el còrtex (20%,  $p < 0.001$ ). En analitzar les mostres dels ratolins tractats prèviament amb l'HX, no es va obtenir cap canvi significatiu en l'expressió de la pAkt en l'hipocamp, mentre que en el còrtex, el tractament previ amb el fàrmac va mostrar una tendència a restablir els nivells control, tot i que no significativa (Fig.27b).



**Fig.27 Efecte de l'HX sobre la pAkt(Ser473) i l'Akt en l'hipocamp i el còrtex dels ratolins tractats amb l'àcid kaïníc.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la pAkt(Ser473) i l'Akt. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de pAkt(Ser473) i l'Akt. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra i per a mostres no aparellades: \* $p < 0.05$  vs. cnt., \*\* $p < 0.01$  vs. cnt., \*\*\* $p < 0.001$  vs. cnt., <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. ka.

Pel que fa a la forma no fosforilada, es va observar un augment del 21% ( $p < 0.01$ ) en el còrtex dels ratolins tractats amb el KA, increment que es va revertir amb l'administració prèvia del fàrmac (98%,  $p < 0.05$ ). En l'hipocamp, l'expressió de la proteïna va variar molt poc entre els grups experimentals, augmentant un 9% ( $p < 0.05$ ) amb el tractament amb el KA i disminuint de forma insignificant amb l'administració de l'HX (Fig.27b).

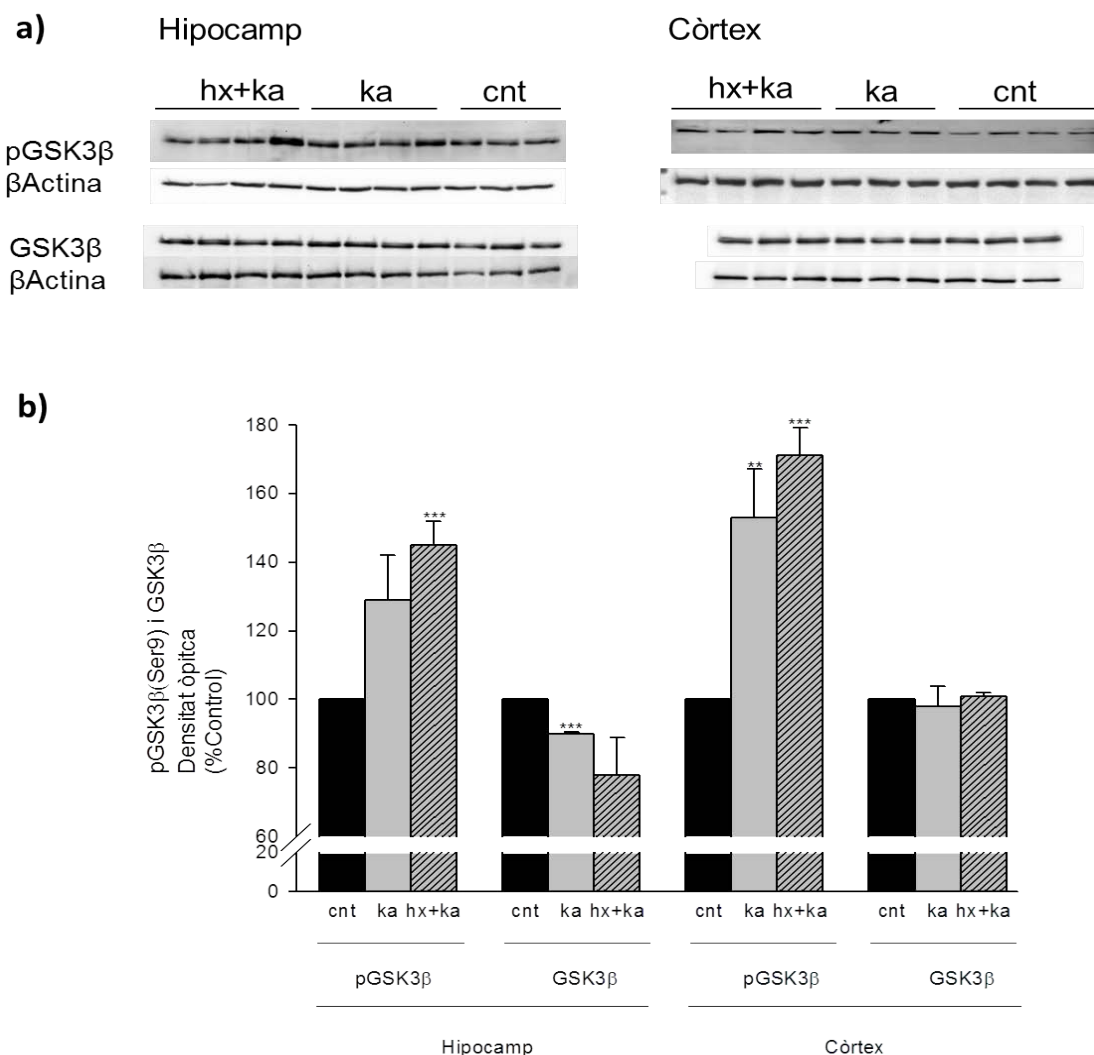
### - pGSK3 $\beta$ (Ser9)/GSK3 $\beta$

Una de les funcions més importants de la quinasa GSK3 $\beta$  és la regulació de l'apoptosi, n'amplifica la via intrínseca mitocondrial en activar-ne diversos factors. A la vegada, és una de les principals quinases involucrades en la fosforilació aberrant de la proteïna tau. També s'ha demostrat la fosforilació de l'APP per la GSK3 $\beta$ , fet que contribueix al processament amiloidogènic d'aquesta.

La figura 28b indica, que tant a nivell de l'hipocamp com a nivell del còrtex, hi va haver un augment de l'expressió de la pGSK3 $\beta$  del grup KA respecte al grup control, un increment del 29% i el 53% respectivament, essent aquest últim estadísticament significatiu ( $p < 0.01$ ). Aquest augment no es va veure modificat respecte al grup KA en els animals tractats prèviament amb l'anticolinesteràsic.

Pel que fa a la forma no fosforilada o activa, aquesta va disminuir la seva expressió en l'hipocamp després de l'administració de l'àcid kaínic (10%,  $p < 0.001$ ), efecte que es va incrementar encara més amb el tractament previ amb l'HX. En el còrtex, no es van observar canvis entre els grups de tractament (Fig.28b).

La relació pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  va augmentar amb l'administració de l'àcid kaínic, passant d'1 a 1.5 en l'hipocamp i a 1.6 en el còrtex. Amb el pre-tractament amb el fàrmac, la relació va ser d'1.8 i 1.7 en l'hipocamp i en el còrtex respectivament.



**Fig.28 Efecte de l’HX sobre la pGSK3β (Ser9) i la GSK3β en l’hipocamp i el còrtex dels ratolins tractats amb l’àcid kainic.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d’expressió de la pGSK3β(Ser9) i la GSK3β. (b) Representació de l’anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de pGSK3β(Ser9) i la GSK3β. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana ± EEM de 3-4 experiments d’entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l’anàlisi estadística s’ha aplicat la prova t de Student per a una mostra i per a mostres no aparellades: \*\*p<0.01 vs. cnt., \*\*\*p<0.001 vs. cnt.

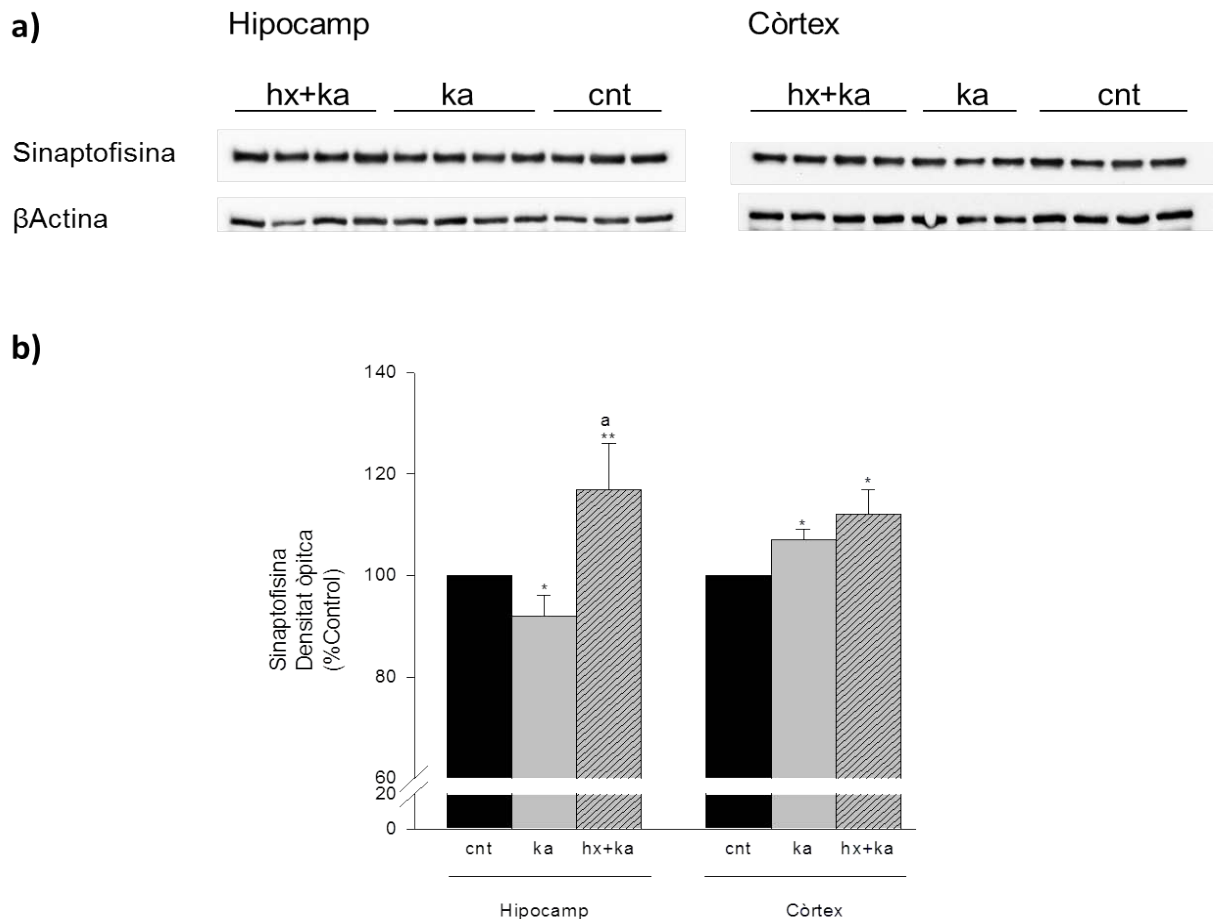
### - Sinaptofisina

La glicoproteïna sinaptofisina, que es troba en les vesícules pre-sinàptiques i participa en la remodelació i la plasticitat sinàptica, va disminuir lleugerament la seva expressió amb l’administració del KA en l’hipocamp (8%, p<0.05), efecte que va quedar més que revertit amb el pre-tractament amb l’HX, la qual en va



augmentar els nivells per sobre dels valors tant del grup control (17%,  $p < 0.05$ ) com del grup tractat amb el KA (27%,  $p < 0.01$ ) (Fig.29b).

Pel que fa al còrtex, si bé es va observar un lleuger increment de l'expressió de la sinaptofisina amb el tractament amb el fàrmac, aquest no va ser estadísticament significatiu (Fig.29b).



**Fig.29 Efecte de l'HX sobre la sinaptofisina en l'hipocamp i el còrtex dels ratolins tractats amb l'àcid kaïníc.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la sinaptofisina. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de sinaptofisina. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra i per a mostres no aparellades: \* $p < 0.05$  vs. cnt., \*\* $p < 0.01$  vs. cnt., <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. ka.

### **- p25/p35**

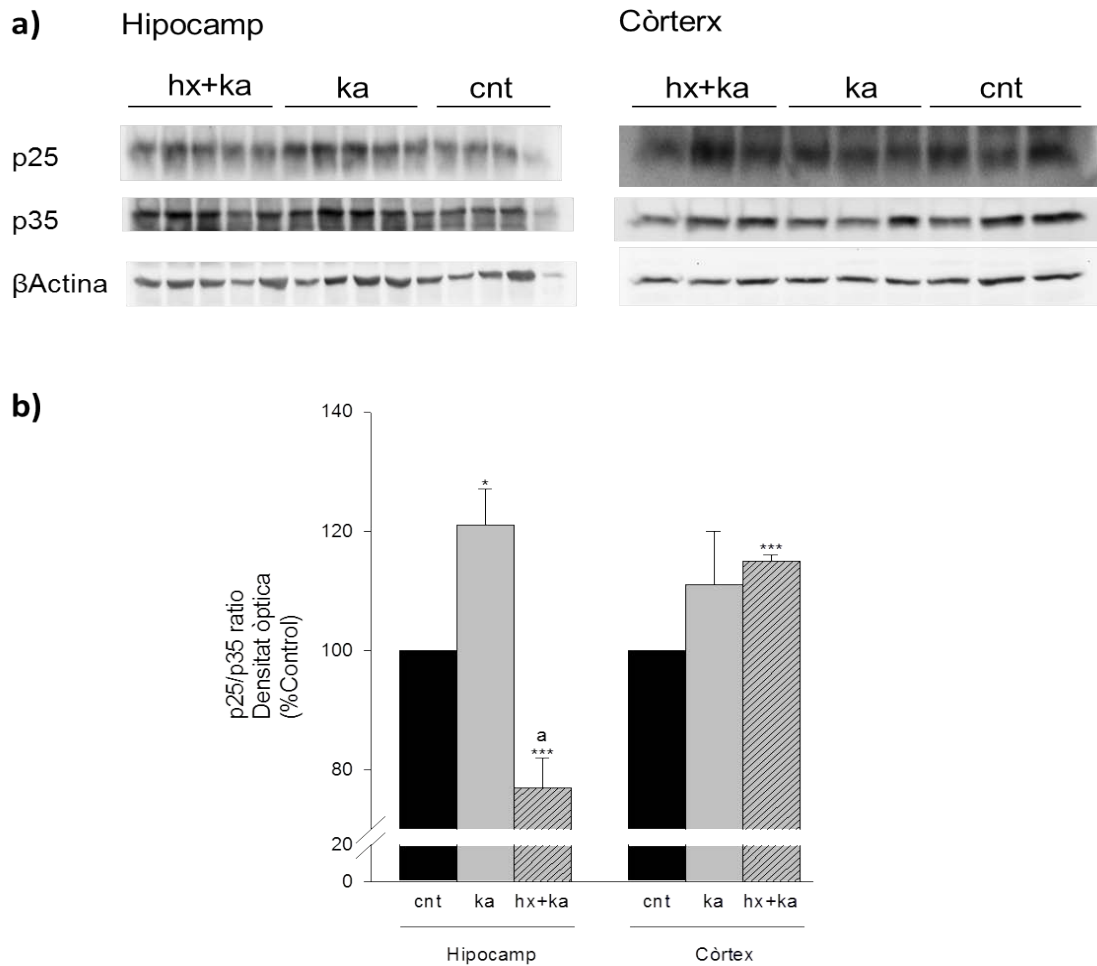
Els factors p25 i p35 són co-activadors de la quinasa Cdk5. En condicions normals, la Cdk5 és activada pel factor p35 i intervé en processos com la migració neuronal i el creixement axonal. En condicions patològiques o d'excés de  $Ca^{2+}$  intracel·lular, la calpaina trenca el factor p35 a p25, que sobreactiva la Cdk5 induint la mort neuronal. El complex p25-Cdk5 també hiperfosforila diferents proteïnes associades als microtúbuls del citoesquelet com per exemple la tau.

La figura 30b mostra com la relació p25/p35 va augmentar amb el tractament amb l'àcid kaínic, i de forma més marcada en l'hipocamp que en el còrtex, un 21% ( $p < 0.05$ ) i un 11% respectivament. En la regió de l'hipocamp, l'expressió de la p25/p35 del grup pre-tractat amb l'HX, va disminuir significativament per sota del valor tant del grup control (23%,  $p < 0.001$ ) com del grup tractat amb el KA (44%,  $p < 0.05$ ). En el còrtex, la presència de l'anticolinesteràsic no va modificar la relació p25/35 respecte al grup KA (Fig.30b).

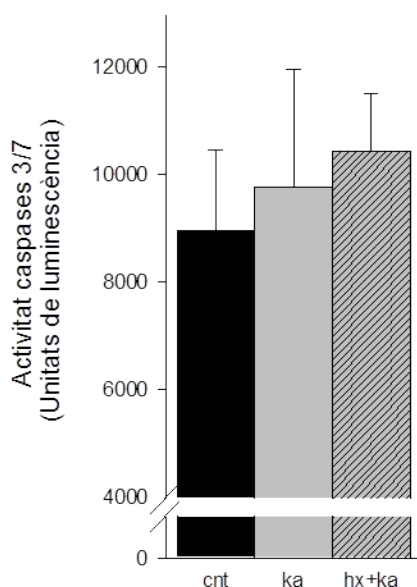
### **- Activitat de les caspases 3/7 en el còrtex**

Les caspases 3 i 7 són caspases efectores o executores responsables de processar una gran varietat de substrats cel·lulars alterant així el funcionament de la cèl·lula, fet que condueix a la mort cel·lular.

L'activitat de les caspases 3 i 7 es va determinar en el còrtex dels ratolins per luminescència. Un cop analitzats els resultats, no es van observar diferències significatives, ni degudes a l'administració de l'àcid kaínic, ni al tractament conjunt amb el fàrmac i el KA (Fig.31).



**Fig.30 Efecte de l'HX sobre la relació p25/p35 en l'hipocamp i el còrterx dels ratolins tractats amb l'àcid kaïníc.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió dels activadors p25 i p35. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica de la relació p25/p35. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra i per a mostres no aparellades: \* $p < 0.05$  vs. cnt., \*\*\* $p < 0.001$  vs. cnt., <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. ka.



**Fig.31 Efecte de l'HX sobre l'activitat de les caspases 3/7 en el còrtex dels ratolins tractats amb l'àcid kaïníc.** Quantificació de l'activitat de les caspases 3/7 per luminescència. Les barres representen els resultats obtinguts en unitats de luminescència directament proporcionals a l'activitat de les caspases 3/7. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM dels triplicats de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadístic s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades.

### 2.3. Efecte de l'HX sobre l'expressió dels marcadors de gliosi i neurogènesi en l'hipocamp

#### - GFAP i Iba1

La gliosi s'associa amb qualsevol procés d'estrès cel·lular o dany neuronal, i com a tal, pot desencadenar la mort cel·lular, ja sigui per processos apoptòtics o necròtics. A la vegada, hi ha estudis que demostren la implicació i la regulació per part del sistema colinèrgic de la resposta immunitària innata, donat l'augment dels nivells d'expressió de l'enzim AChE en les cèl·lules de la microglia activada (Vezzani et al. 2011).

En aquest estudi, a partir de talls de cervell de ratolins i per immunohistoquímica, es van analitzar al gir dentat, els canvis d'expressió dels factors GFAP i Iba1, marcadors d'astrogliosi i microgliosi respectivament, i se'n van avaluar els efectes produïts per l'àcid kaïníc i l'anticolinesteràsic HX. La proteïna àcida fibril·lar de la glia o GFAP forma els filaments del citoesquelet de les cèl·lules gials (astròcits i cèl·lules de Schwann). Les cèl·lules gials

s'encarreguen del manteniment del funcionament neuronal i per tant, en cas de dany neuronal s'activen. El factor inflamatori d'al·loingert 1 o Iba1 s'expressa específicament a la micròglia (o macròfags de l'SNC). L'activació de la micròglia a causa de la inflamació augmenta la síntesi de la proteïna Iba1 i permet diferenciar els macròfags activats dels que no ho estan.

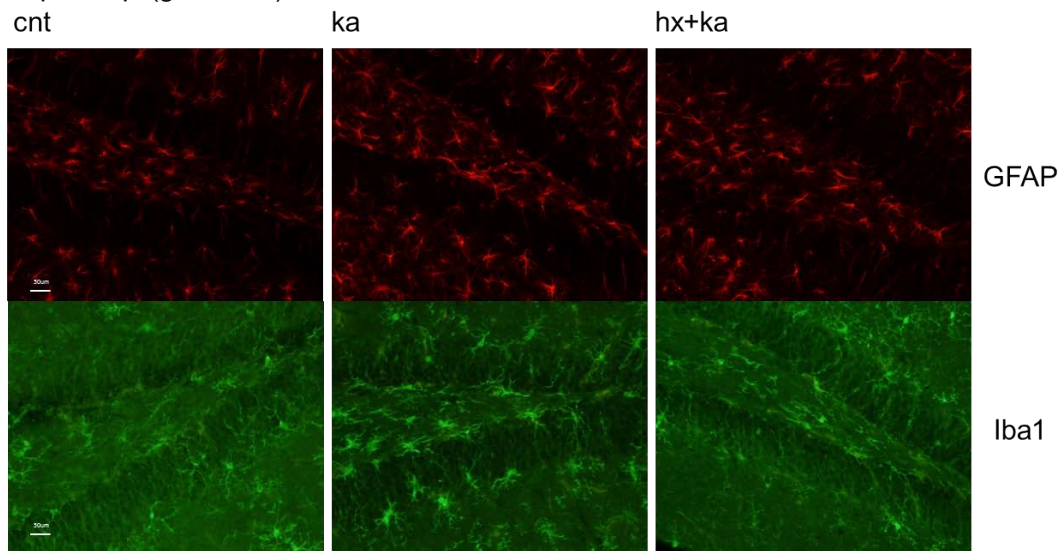
Tal i com es mostra a la figura 32b l'expressió de la GFAP, calculada a partir de la densitat òptica de la imatge, va augmentar un 15% ( $p < 0.001$ ) en l'hipocamp dels ratolins tractats amb l'àcid kaínic respecte al grup control. En comparar el grup de ratolins als quals se'ls hi havia administrat el fàrmac amb el grup KA, no s'observaren modificacions. La figura 32b també mostra els canvis d'expressió de la proteïna Iba1. La proteïna va augmentar un 73% ( $p < 0.001$ ) en l'hipocamp dels ratolins tractats amb el KA respecte al grup control, increment que es va revertir en un 68% ( $p < 0.001$ ), és a dir, gairebé totalment, en aquells animals tractats prèviament amb l'HX (Fig.32b).

#### **- DCX**

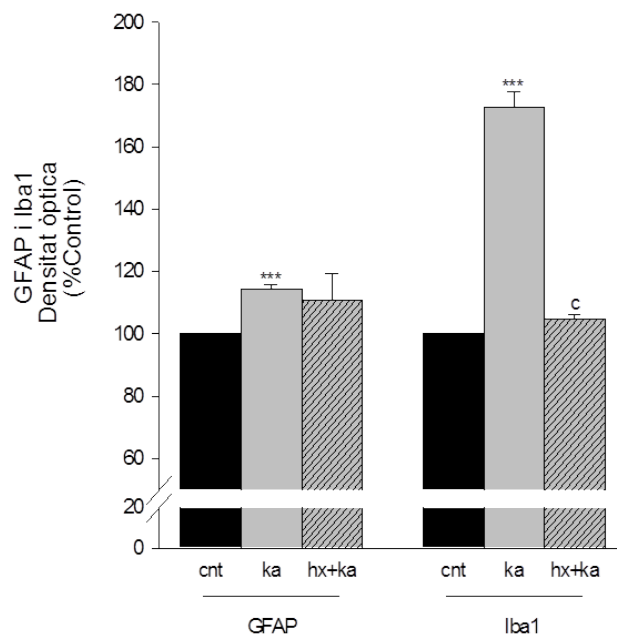
La *doublecortin* o DCX és una proteïna associada als microtúbuls del citoesquelet que s'expressa en les cèl·lules precursoras de les neurones i en les neurones immadures, tant en les estructures embrionàries com en les estructures corticals adultes. També s'anomena proteïna de migració neuronal i s'utilitza com a marcador de neurogènesi.

La figura 33b mostra una disminució significativa de l'expressió de la proteïna DCX en els animals tractats amb el KA (26%,  $p < 0.05$ ). També s'observa que l'administració prèvia del fàrmac HX no va ser capaç de revertir aquest efecte (Fig.33b).

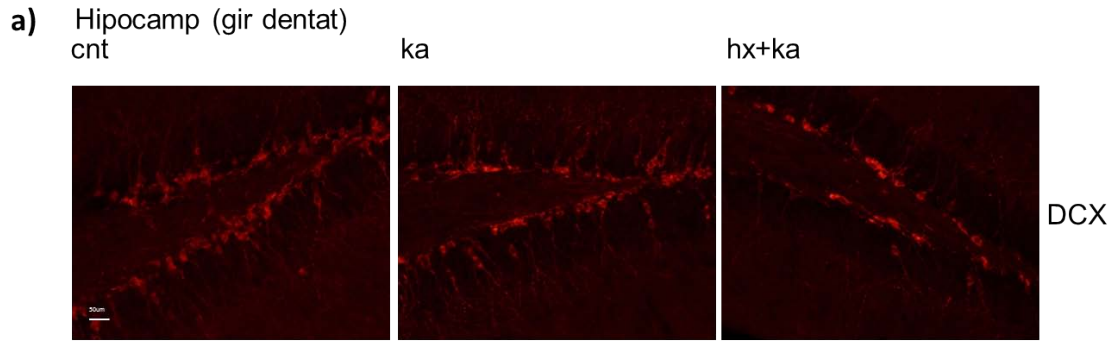
## a) Hipocamp (gir dentat)



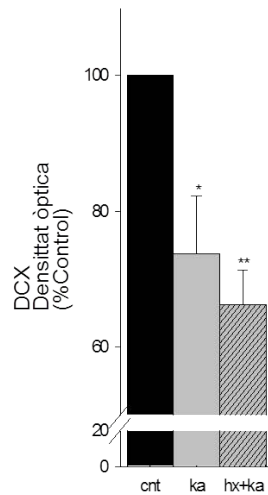
## b)



**Fig.32 Efecte de l'HX sobre la GFAP i l'Iba1 en l'hipocamp (gir dentat) dels ratolins tractats amb l'àcid kaïníc** (a) Imatges representatives del microscopi de fluorescència del gir dentat marcat amb els anticossos GFAP (vermell) i Iba1 (verd), marcadors d'astrogliosi i microgliosi respectivament. Barra d'escala: 50 μm. (b) Anàlisi semiquantitativa dels nivells de GFAP i Iba1. Les barres representen els resultats de la quantificació de la densitat òptica de les imatges obtingudes per immunofluorescència (IF). Els resultats són la mitjana ± EEM de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra i per a mostres no aparellades: \*\*\* $p < 0.001$  vs. cnt., <sup>c</sup> $p < 0.001$  vs. ka.; cnt=control (sèrum fisiològic 0.9%); ka=àcid kaïníc (28 mg/kg); hx=hupirina X (0.08 mg/kg).



b)



**Fig.33 Efecte de l'HX sobre la DCX en l'hipocamp (gir dentat) dels ratolins tractats amb l'àcid kaïníc** (a) Imatges representatives del microscopi de fluorescència del gir dentat marcat amb l'anticòs DCX (vermell), marcador de neurogènesi. Barra d'escala: 50  $\mu$ m. (b) Anàlisi semiquantitativa dels nivells de DCX. Les barres representen els resultats de la quantificació de la densitat òptica de les imatges obtingudes per IF. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra i per a mostres no aparellades: \* $p < 0.05$  vs. cnt., \*\* $p < 0.01$  vs. cnt.

### **3. AVALUACIÓ DELS EFECTES PRODUÏTS PER L'INHIBIDOR DE L'ACHÉ AVCRI104P3 EN RATOLINS 126/SV x C57BL/6 DE 12 MESOS**

Considerant els diferents resultats observats prèviament amb les huprines en animals de mitjana edat, es van desenvolupar, tal com s'ha comentat en la introducció, nous compostos amb acció dual a fi i efecte d'estudiar si amb aquesta doble acció, s'observaven canvis i/o millores en la resposta als anticolinesteràsics.

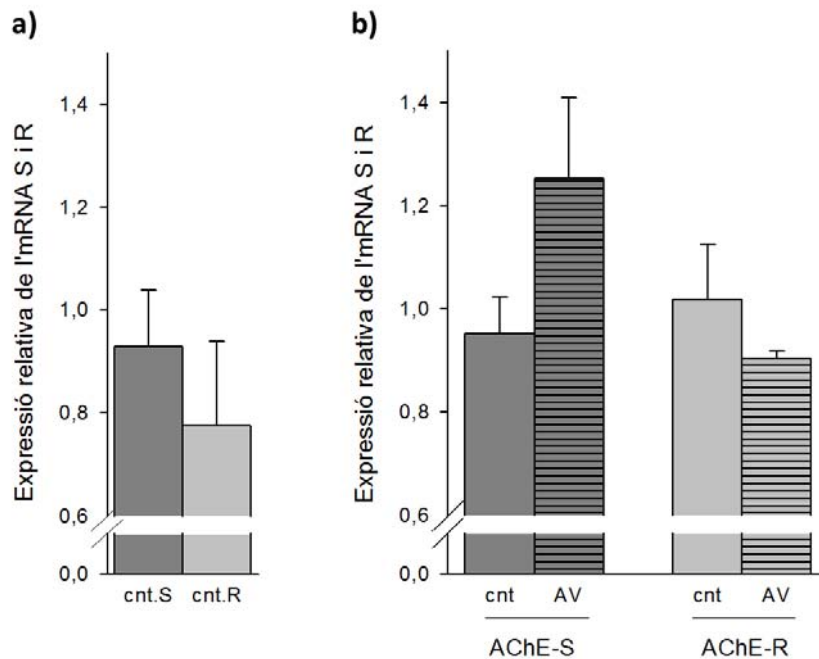
Així, en el present treball, es va avaluar l'efecte de l'heterodímer de lloc d'unió dual AVCRI104P3 a nivell bioquímic en animals de mitjana edat. Els paràmetres analitzats van ser els mateixos que en el cas del model de neurotoxicitat induïda per l'àcid kaïníc. Prèviament, mitjançant estudis de comportament, s'havia avaluat la capacitat de memòria i aprenentatge d'aquests animals, on es va observar que l'AVCRI104P3 la millora de forma significativa.

#### **3.1. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHÉ en el còrtex frontal**

Abans d'estudiar els canvis en l'expressió de l'mRNA de les isoformes S i R provocats per l'administració del fàrmac, igual que en els models previs, se'n van avaluar els seus nivells basals. En aquest cas, els nivells d'mRNA-S van ser només un 16% superiors als d'mRNA-R (Fig.34a).

En avaluar l'efecte del fàrmac sobre l'mRNA de les variants acetilcolinesteràsiques no es van veure diferències significatives entre els grups de tractament, malgrat la tendència a l'alça dels nivells d'mRNA-S (25%) amb l'administració de l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 (Fig.34b).



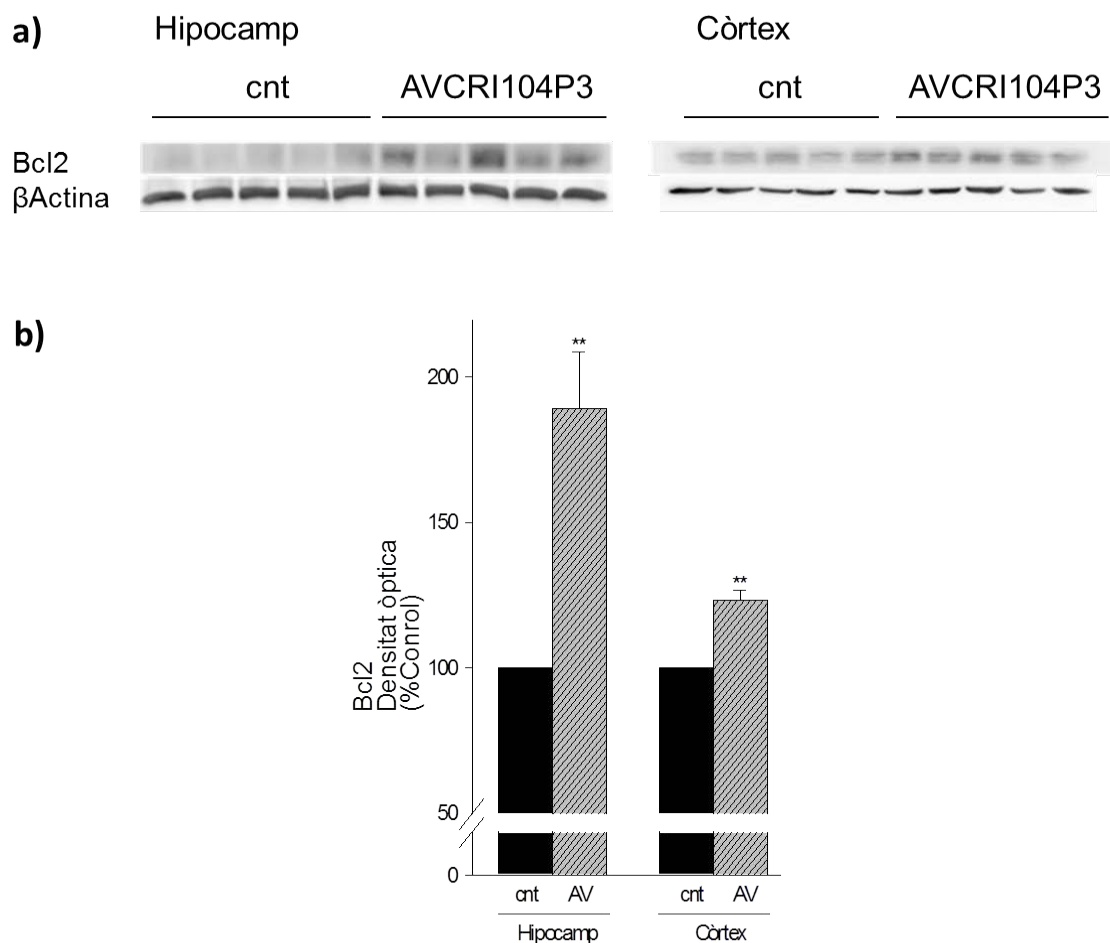


**Fig.34 (a) Expressió relativa de l'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHE respecte a l'mRNA-S (b) Efecte de l'AVCRI104P3 sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R en el còrtex frontal de ratolins de 12 mesos.** Les barres representen els resultats de la mesura comparativa dels cicles d'expressió de l'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHE obtinguts per qRT-PCR. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM dels duplicats de 3 experiments de 6 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades. cnt=control (sèrum fisiològic 0.9%); AV=AVCRI104P3 (0.6  $\mu$ mol/kg).

### 3.2. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'expressió de les proteïnes implicades en l'apoptosi i la supervivència cel·lular en l'hipocamp i el còrtex

#### - Bcl2

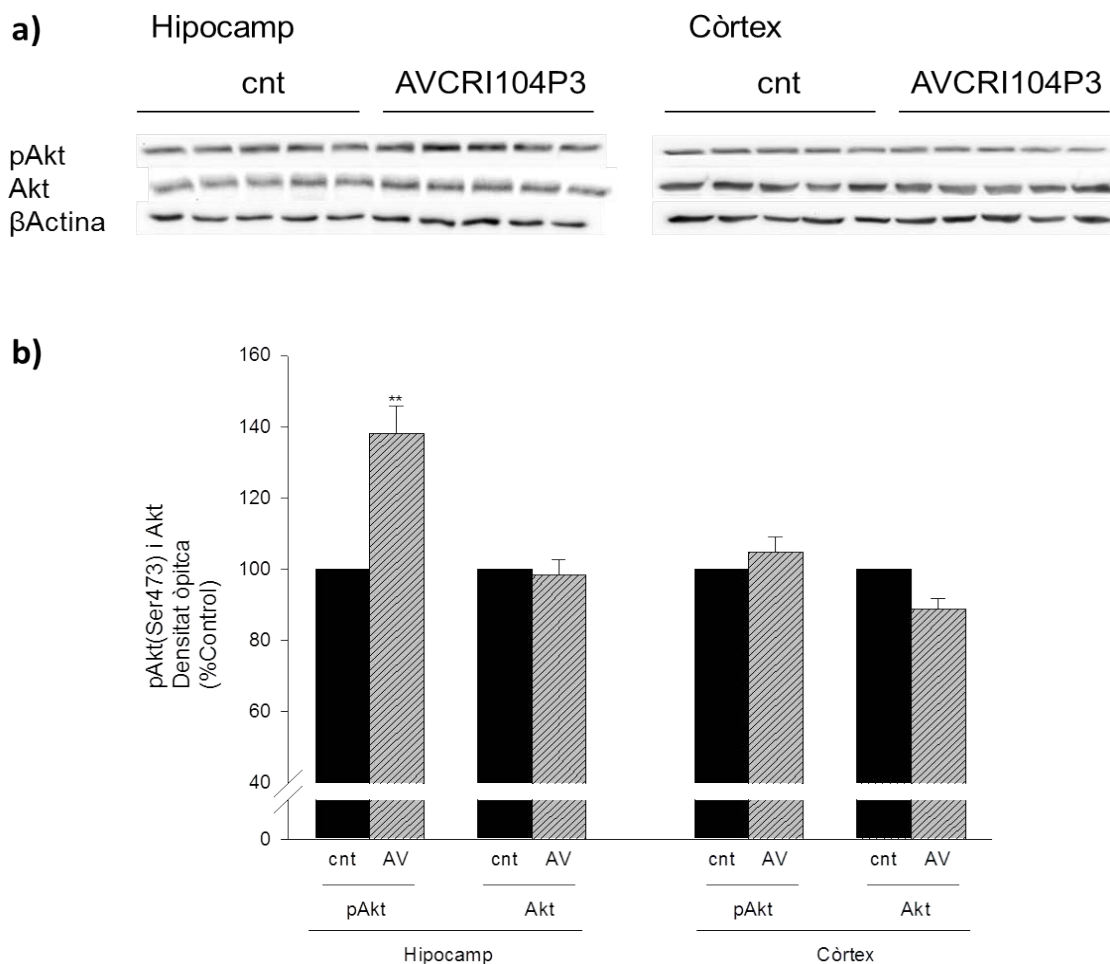
En estudiar l'efecte de l'heterodímer AVCRI104P3 sobre la proteïna antiapoptòtica Bcl2, aquesta va augmentar la seva expressió amb el tractament amb el fàrmac tant en l'hipocamp (89%,  $p < 0.01$ ) com en el còrtex (23%,  $p < 0.01$ ) (Fig.35b).



**Fig.35 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la Bcl2 en l'hipocamp i el còrtex de ratolins de 12 mesos.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la Bcl2. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de Bcl2. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra: \*\* $p < 0.01$  vs. cnt.; cnt=control (sèrum fisiològic 0.9%); AV=AVCRI104P3 (0.6  $\mu$ mol/kg).

#### - pAkt(Ser473)/Akt

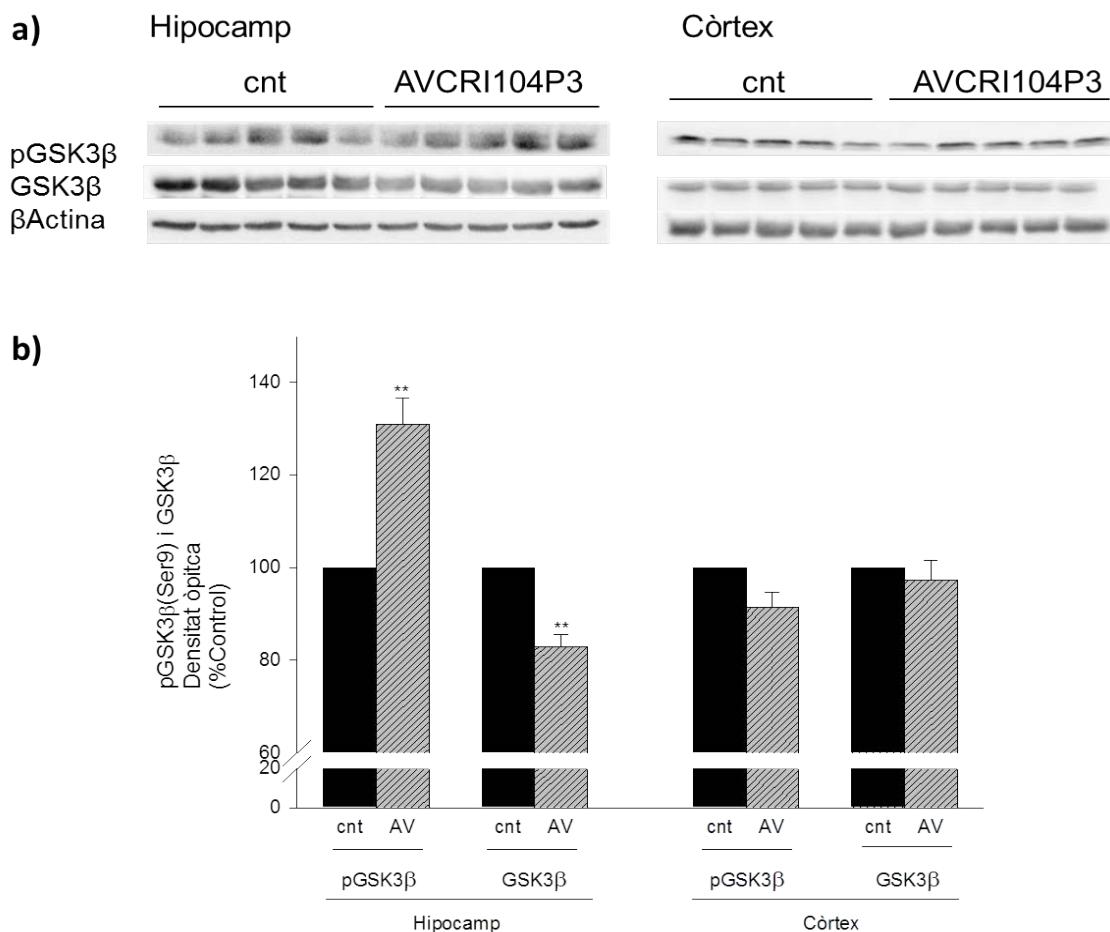
Pel que fa a les formes fosforilades i no fosforilades de l'Akt, tal i com s'observa a la figura 36b, els animals tractats amb el fàrmac AVRCI104P3 van presentar un augment de l'expressió de la pAkt en l'hipocamp (38%,  $p < 0.01$ ). A la vegada, la relació de les mitges pAkt/Akt es va incrementar tant en l'hipocamp com en el còrtex amb l'administració de l'anticolinesteràsic (Fig.36b).



**Fig.36 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la pAkt(Ser473) i l'Akt en l'hipocamp i el còrtex de ratolins de 12 mesos.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la pAkt(Ser473) i l'Akt. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de pAkt(Ser473) i Akt. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra: \*\* $p < 0.01$  vs. cnt.

#### - pGSK3 $\beta$ (Ser9)/GSK3 $\beta$

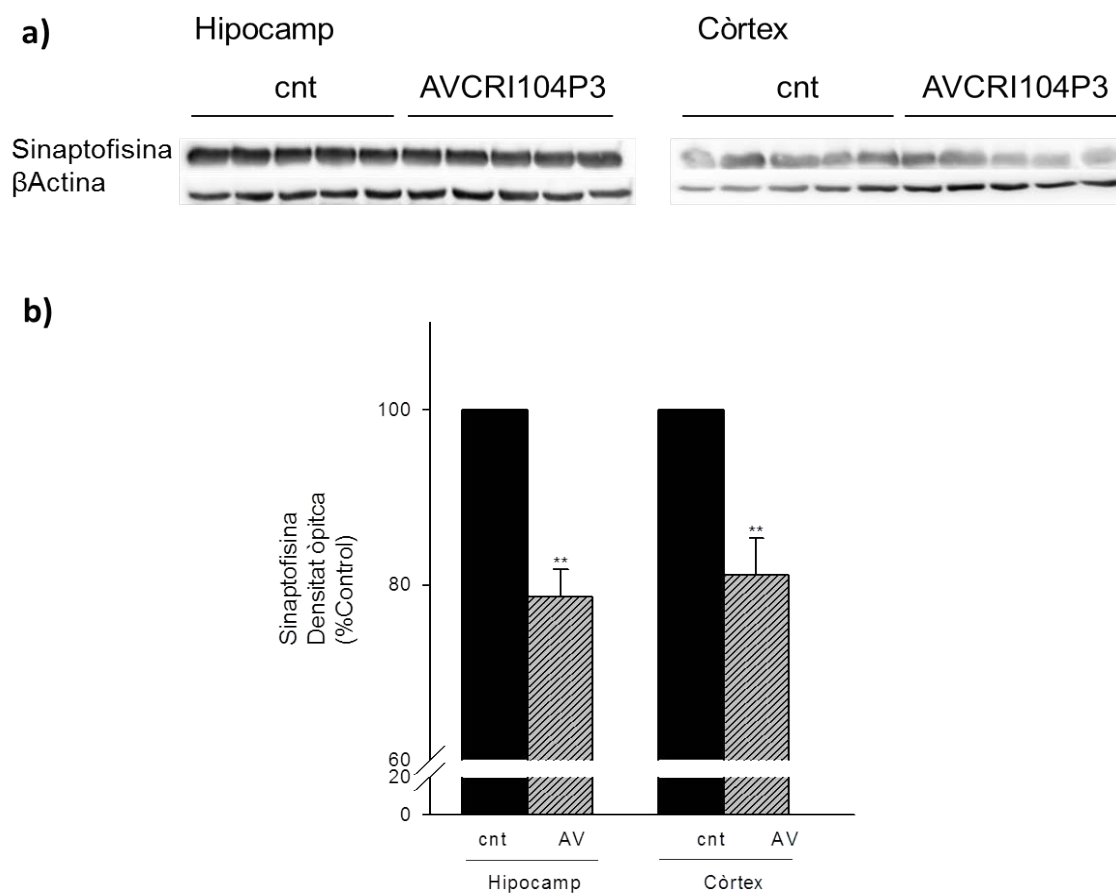
Amb referència a la quinasa reguladora del metabolisme del glucogen, la figura 37b mostra un augment significatiu de la forma pGSK3 $\beta$  (31%,  $p < 0.01$ ) i una disminució també significativa de la forma GSK3 $\beta$  (17%,  $p < 0.01$ ) en l'hipocamp, com a resposta al tractament amb l'AVCRI104P3. En canvi, no s'observen modificacions en els nivells d'aquesta quinasa en el còrtex (Fig.37b).



**Fig.37 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la pGSK3 $\beta$ (Ser9) i la GSK3 $\beta$  en l'hipocamp i el còrtex de ratolins de 12 mesos.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la pGSK3 $\beta$ (Ser9) i la GSK3 $\beta$ . (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de pGSK3 $\beta$ (Ser9) i GSK3 $\beta$ . Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra: \*\* $p < 0.01$  vs. cnt.

### - Sinaptofisina

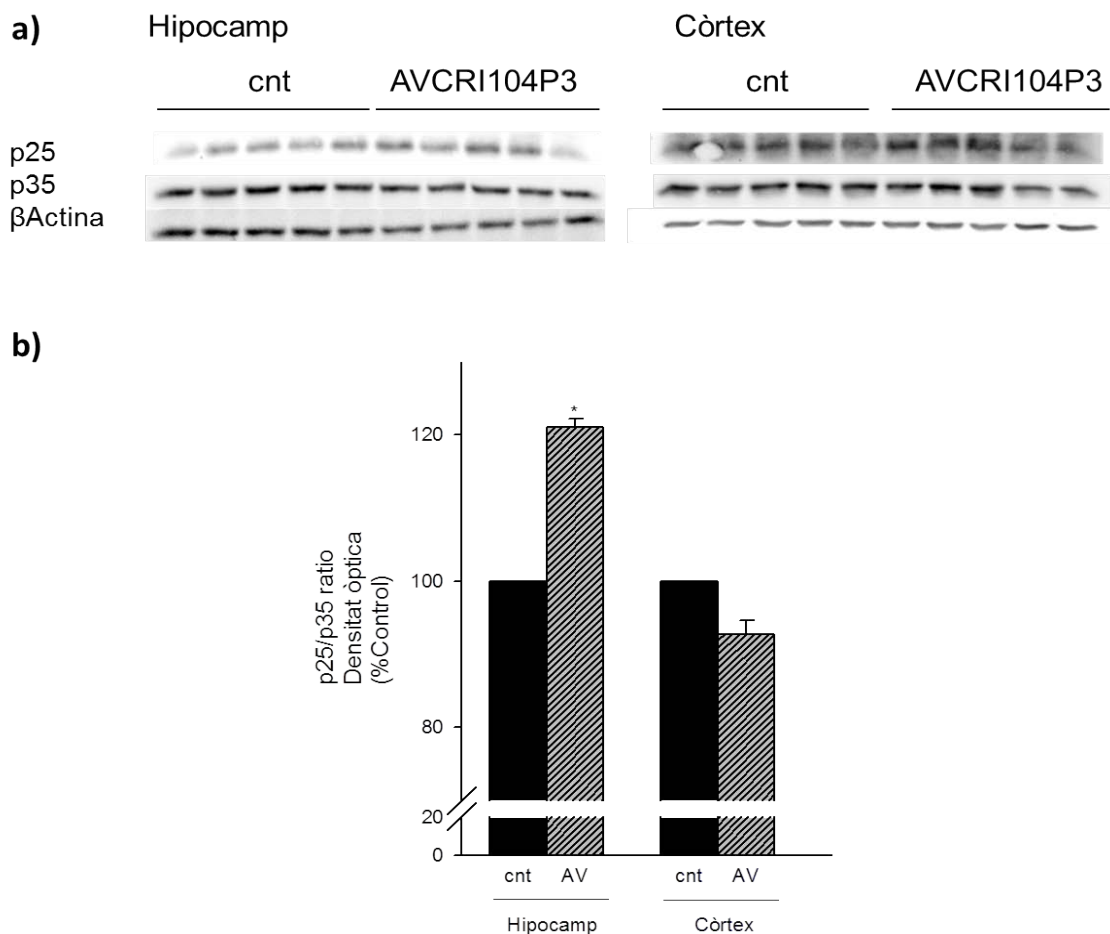
Amb relació a l'expressió del marcador de sinapsis, la sinaptofisina, els resultats obtinguts a partir dels WBs van mostrar una disminució significativa dels nivells d'aquesta proteïna tant en l'hipocamp (21%,  $p < 0.01$ ) com en el còrtex (19%,  $p < 0.01$ ) amb l'administració de l'anticolinesteràsic (Fig.38b).



**Fig.38 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la sinaptofisina en l'hipocamp i el còrtex de ratolins de 12 mesos.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la sinaptofisina. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de sinaptofisina. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra: \*\* $p < 0.01$  vs. cnt.

### - p25/p35

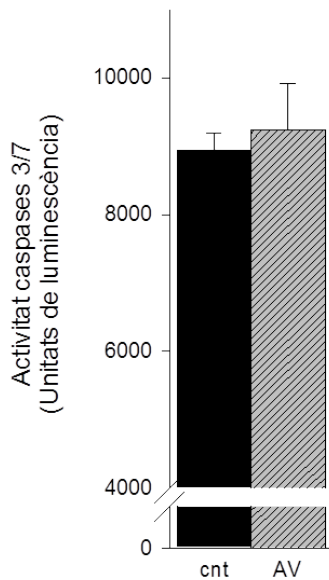
En determinar l'expressió dels co-activadors de la Cdk5 es va observar que a nivell de l'hipocamp la relació p25/p35 augmentava de forma significativa en aquells ratolins tractats amb l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 (21%,  $p < 0.05$ ). A nivell del còrtex no es van observar canvis significatius (Fig.39b).



**Fig.39 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la relació p25/p35 en l'hipocamp i el còrtex de ratolins de 12 mesos.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la relació p25/p35. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de la relació p25/p35. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra: \* $p < 0.05$  vs. cnt.

#### - Activitat de les caspases 3/7 en el còrtex

En estudiar l'activitat de les caspases efectores 3 i 7, els resultats van demostrar que el fàrmac no modifica de forma significativa l'activitat del grup control (Fig.40).



**Fig.40 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'activitat de les caspases 3/7 en el còrtex de ratolins de 12 mesos.** Quantificació de l'activitat de les caspases 3/7 per luminescència. Les barres representen els resultats obtinguts en unitats de luminescència directament proporcionals a l'activitat de les caspases 3/7. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM dels triplicats de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadístic s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades.

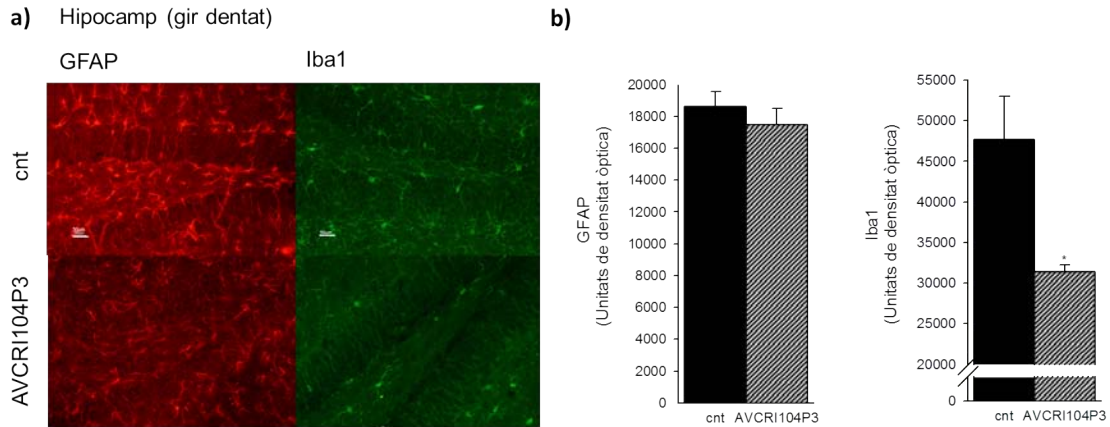
### 3.3. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'expressió dels marcadors de gliosi i neurogènesi en l'hipocamp

#### - GFAP i Iba1

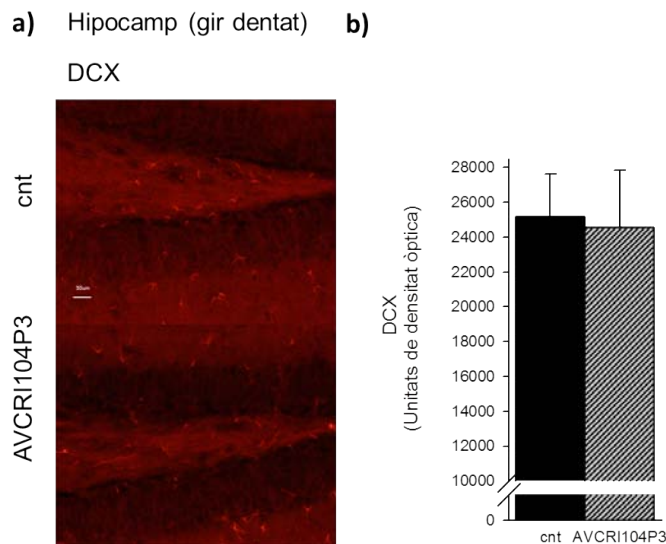
L'expressió dels marcadors de neuroinflamació GFAP i Iba1, determinada per immunohistoquímica en condicions basals i en presència de l'anticolinesteràsic AVCRI104P3, no es va veure modificada en el cas del marcador d'astrogliosi i va disminuir un 34% ( $p < 0.05$ ) respecte al control pel que fa al marcador de microgliosi (Fig.41b).

#### - DCX

En aquest estudi, la proteïna DCX, que com ja s'ha comentat es troba als microtúbuls del citoesquelet de les neurones immadures i s'utilitza com a marcador de neurogènesi, no es va veure modificada amb la presència del fàrmac (Fig.42b).



**Fig.41 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la GFAP i l'Iba1 en l'hipocamp (gir dentat) de ratolins de 12 mesos** (a) Imatges representatives del microscopi de fluorescència del gir dentat marcat amb els anticossos GFAP (vermell) i Iba1 (verd), marcadors d'astrogliosi i microgliosi respectivament. Barra d'escala: 50  $\mu$ m. (b) Anàlisi semiquantitativa dels nivells de GFAP i Iba1. Les barres representen els resultats de la quantificació de la densitat òptica de les imatges obtingudes per immunofluorescència (IF). Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades: \* $p < 0.05$  vs. cnt.; cnt=control (sèrum fisiològic 0.9%); AVCRI104P3 (0.6  $\mu$ mol/kg).



**Fig.42 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la DCX en l'hipocamp (gir dentat) de ratolins de 12 mesos** (a) Imatges representatives del microscopi de fluorescència del gir dentat marcat amb l'anticòs DCX (vermell), marcador de neurogènesi. Barra d'escala: 50  $\mu$ m. (b) Anàlisi semiquantitativa dels nivells de DCX. Les barres representen els resultats de la quantificació de la densitat òptica de les imatges obtingudes per IF. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades.



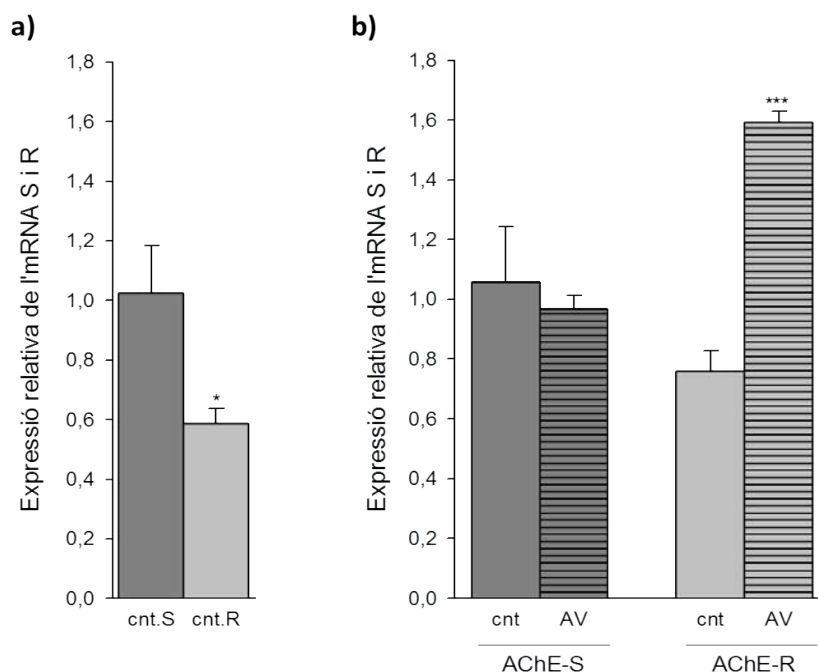
#### **4. AVALUACIÓ DELS EFECTES PRODUÏTS PER L'INHIBIDOR DE L'ACHÉ AVCRI104P3 EN RATOLINS TRIPLE TRANSGÈNICS (3xTg) PER L'ALZHEIMER (PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>SWE</sub>, TAU<sub>P301L</sub>) DE 12 MESOS**

En el quart model experimental s'ha estudiat l'efecte de l'AVCRI104P3 sobre el procés neurodegeneratiu associat als ratolins 3xTg per l'Alzheimer. En aquest cas es van realitzar els mateixos estudis bioquímics descrits en els apartats anteriors, i a més a més, es van analitzar els nivells d'A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub> soluble i insoluble tant en l'hipocamp com en el còrtex.

##### **4.1. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHÉ en el còrtex frontal**

En analitzar els nivells d'mRNA de les isoformes S i R en el còrtex frontal dels ratolins 3xTg per l'Alzheimer, es va observar que el tractament amb el fàrmac AVCRI104P3 augmentava significativament l'mRNA-R (109%,  $p < 0.001$ ). Els nivells d'mRNA-S no es van veure modificats amb l'administració de l'anticolinesteràsic (Fig.43b).

Pel que fa als nivells basals d'mRNA, els de la isoforma S van ser superiors en un 41% als de la isoforma R ( $p < 0.05$ ) (Fig.43a).



**Fig.43 (a) Expressió relativa de l'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHe respecte a l'mRNA-S (b) Efecte de l'AVCRI104P3 sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R en el còrtex frontal de ratolins 3xTg per l'Alzheimer.** Les barres representen els resultats de la mesura comparativa dels cicles d'expressió de l'mRNA de les isoformes S i R de l'ACHe obtinguts per RT-PCR. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM dels duplicats de 3 experiments de 6 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades: \* $p < 0.05$  vs. cnt.S., \*\*\* $p < 0.001$  vs. cnt.; cnt=control (sèrum fisiològic 0.9%); AV=AVCRI104P3 (0.6  $\mu\text{mol/kg}$ ).

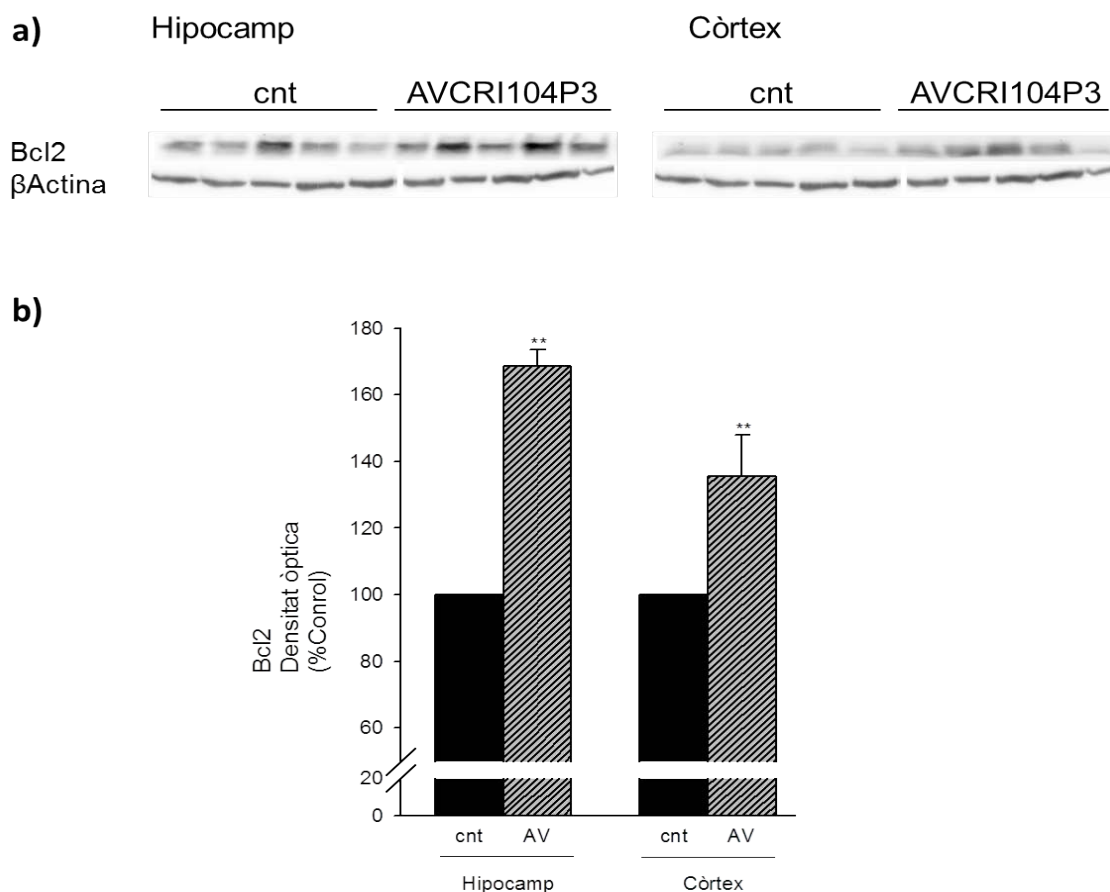
## 4.2. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'expressió de les proteïnes implicades en l'apoptosi i la supervivència cel·lular en l'hipocamp i el còrtex

### - Bcl2

Com s'ha dit anteriorment, la proteïna Bcl2 participa en la inhibició de la via intrínseca de l'apoptosi, essent una de les principals proteïnes antiapoptòtiques estudiades.

En determinar la seva presència en els cervells dels ratolins 3xTg es va observar que el fàrmac AVCRI104P3 n'augmentava els nivells tant en

l'hipocamp (69%,  $p < 0.01$ ) com en el còrtex (36%,  $p < 0.01$ ) (Fig.44b), en concordança amb els resultats obtinguts prèviament amb els ratolins no transgènics.

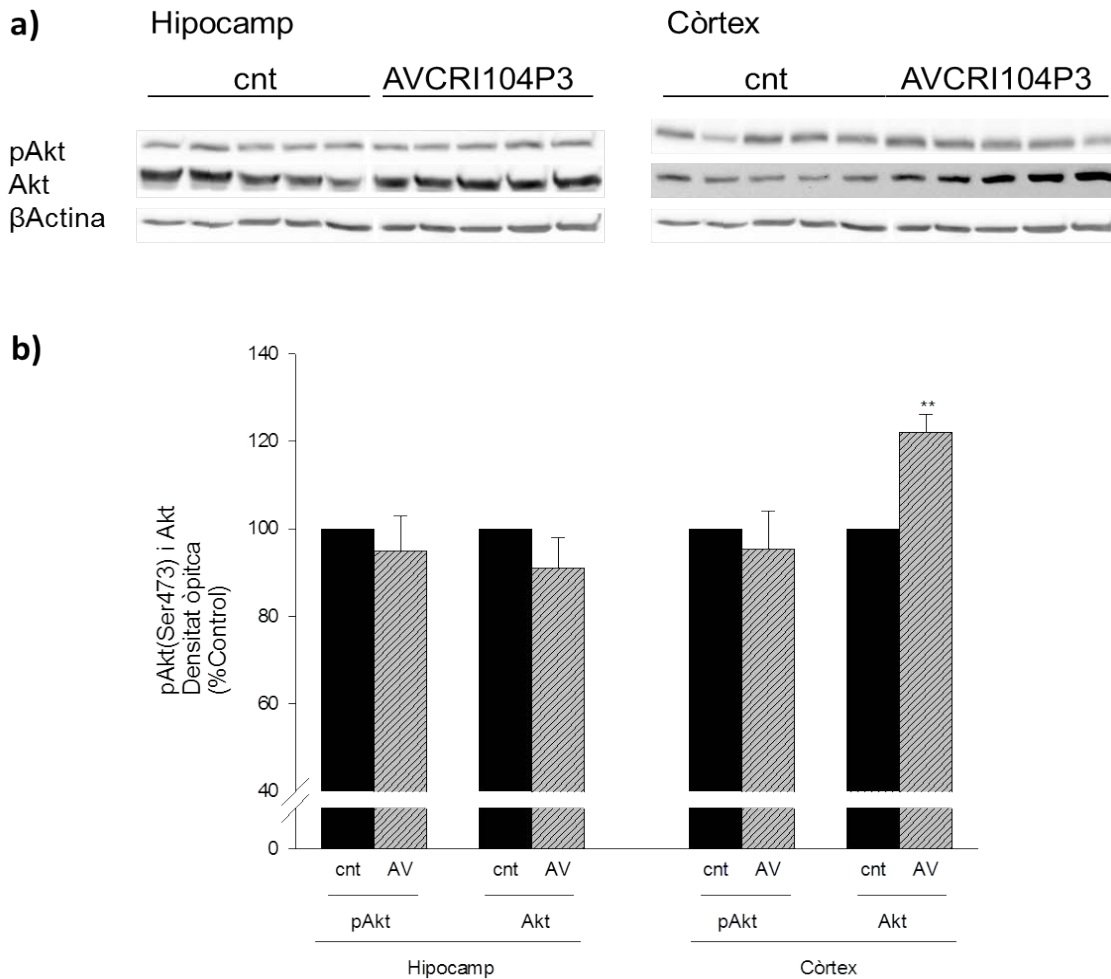


**Fig.44 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la Bcl2 en l'hipocamp i el còrtex de ratolins 3xTg per l'Alzheimer.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la Bcl2. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de Bcl2. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blot*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra: \*\* $p < 0.01$  vs. cnt.; cnt=control (sèrum fisiològic 0.9%); AV=AVCRI104P3 (0.6  $\mu\text{mol/kg}$ ).

#### - pAkt(Ser473)/Akt

Pel que fa a l'Akt, que com ja s'ha explicat forma part de la via de supervivència de la PI3K/Akt i s'encarrega d'inhibir diverses proteïnes proapoptòtiques tals

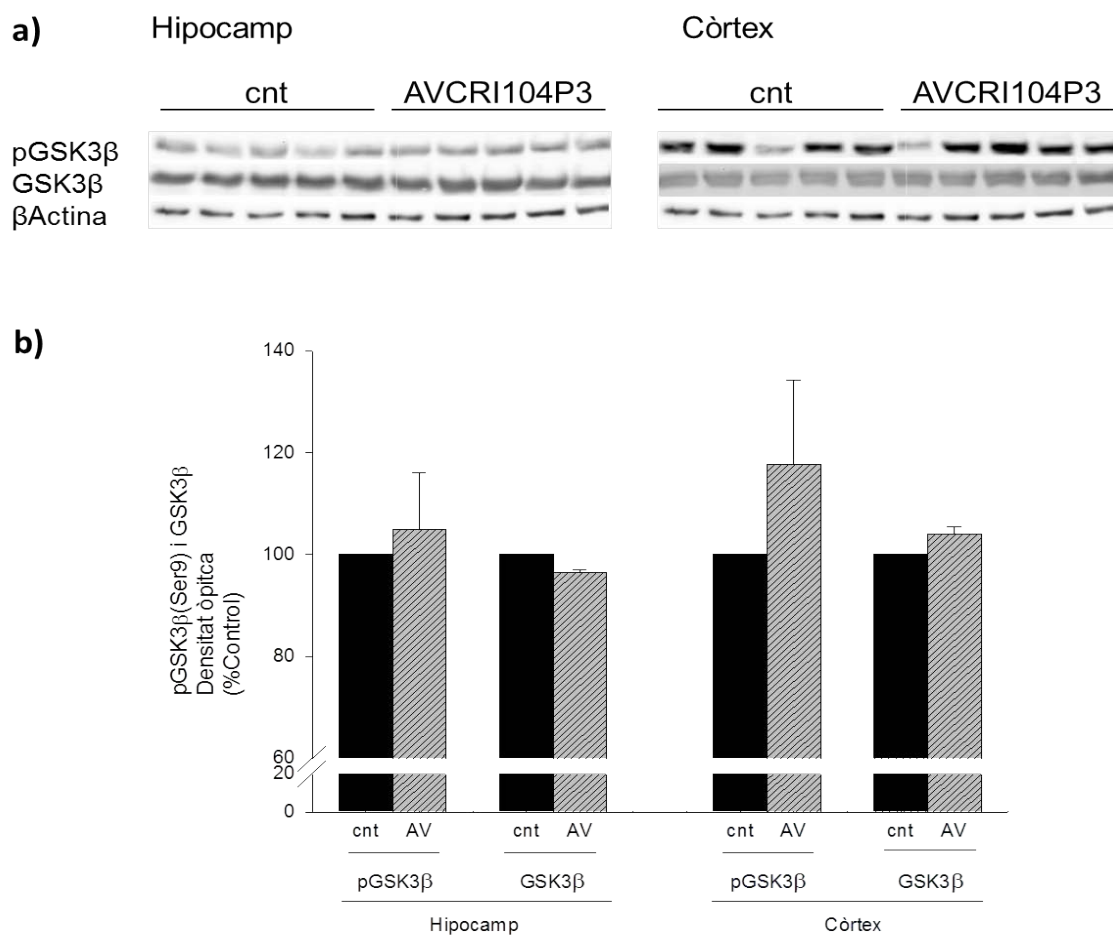
com la GSK3 $\beta$ , aquesta va mostrar un augment de la forma no fosforilada o inactiva a nivell del còrtex amb el tractament amb l'anticolinesteràsic (22%,  $p < 0.01$ ) (Fig.45b). A nivell de l'hipocamp no es van veure diferències significatives entre els grups experimentals (Fig.45b).



**Fig.45 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la pAkt(Ser473) i l'Akt en l'hipocamp i el còrtex de ratolins 3xTg per l'Alzheimer.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la pAkt(Ser473) i l'Akt. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de pAkt(Ser473) i Akt. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra: \*\* $p < 0.01$  vs. cnt.

- pGSK3 $\beta$ (Ser9)/GSK3 $\beta$ 

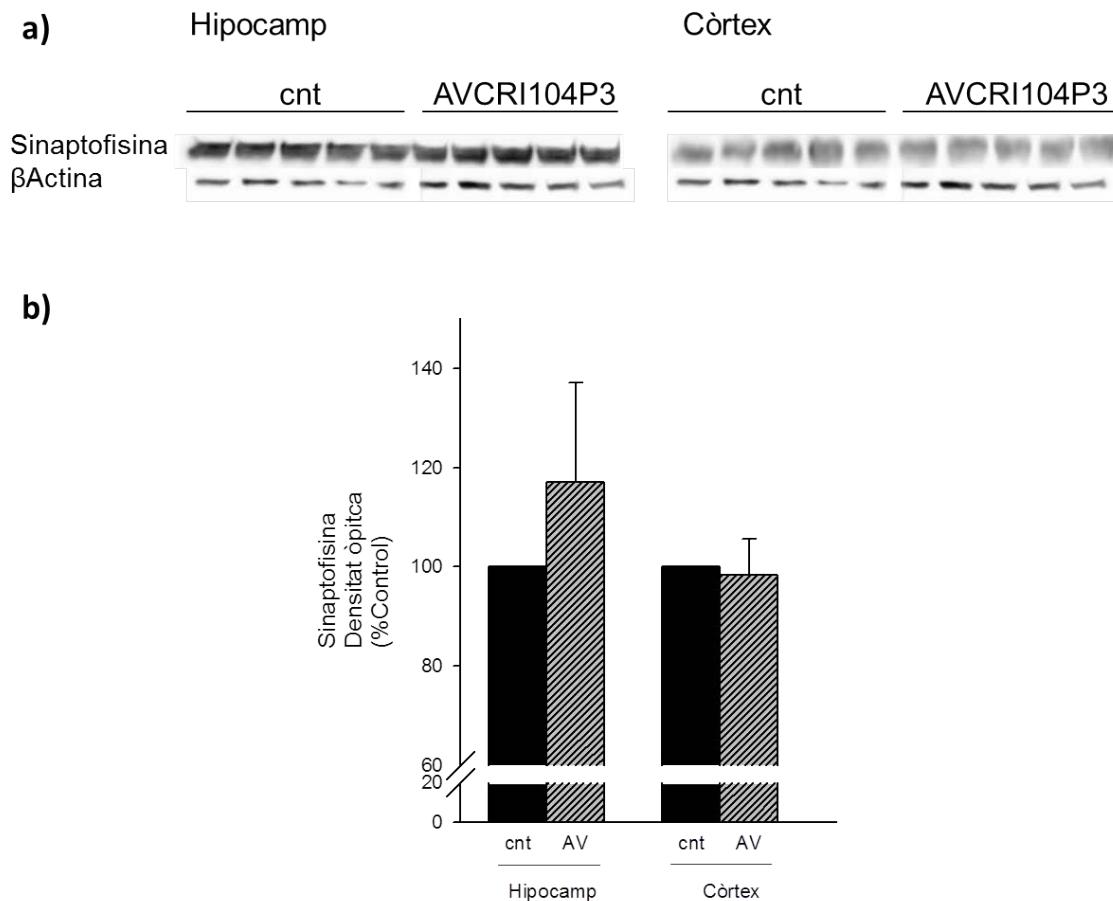
Com ja s'ha comentat, la importància de la GSK3 $\beta$  recau en el fet que és una de les principals quinases que hiperfosforila la proteïna tau, a la vegada que activa diversos factors implicats en la via intrínseca de l'apoptosi. L'expressió d'aquesta proteïna no es va veure modificada de forma significativa amb el tractament amb el fàrmac (Fig.46b).



**Fig.46 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la pGSK3 $\beta$ (Ser9) i la GSK3 $\beta$  en l'hipocamp i el còrtex de ratolins 3xTg per l'Alzheimer.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la pGSK3 $\beta$ (Ser9) i la GSK3 $\beta$ . (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de pGSK3 $\beta$ (Ser9) i GSK3 $\beta$ . Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra.

## - Sinaptofisina

Pel que fa a l'expressió de la glicoproteïna sinaptofisina, en aquest cas, els resultats obtinguts a partir dels WBs no van mostrar diferències significatives entre els grups experimentals ni en l'hipocamp ni en el còrtex dels ratolins 3xTg (Fig.47b).

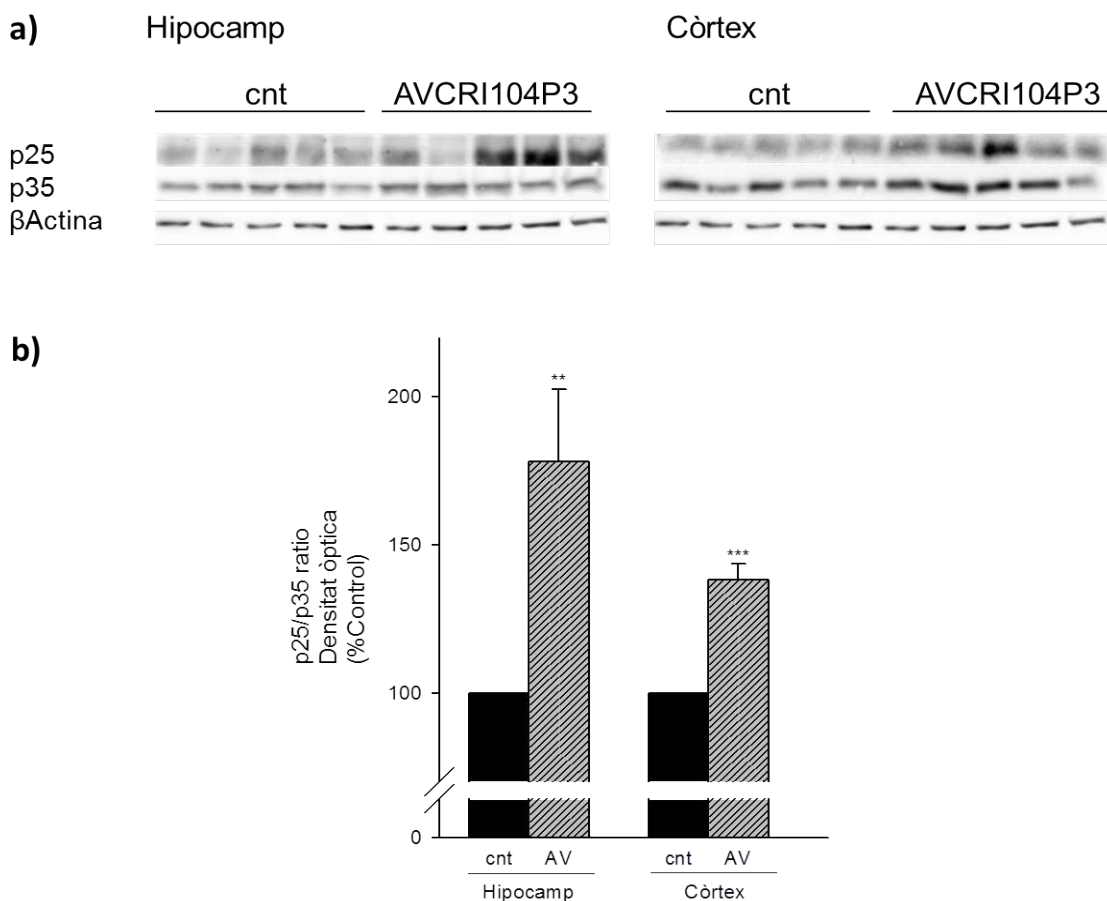


**Fig.47 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la sinaptofisina en l'hipocamp i el còrtex de ratolins 3xTg per l'Alzheimer.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la sinaptofisina. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de sinaptofisina. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra.

**- p25/p35**

Anteriorment ja s'ha explicat que la relació entre els co-activadors de la Cdk5 (p25/p35) és indicadora del grau de sobreactivació de la quinasa Cdk5, i que la presència d'aquesta quinasa activada en excés indueix la mort neuronal, així com la hiperfosforilació de la proteïna tau.

Tal com es mostra a la figura 48b, els ratolins 3xTg van augmentar de forma

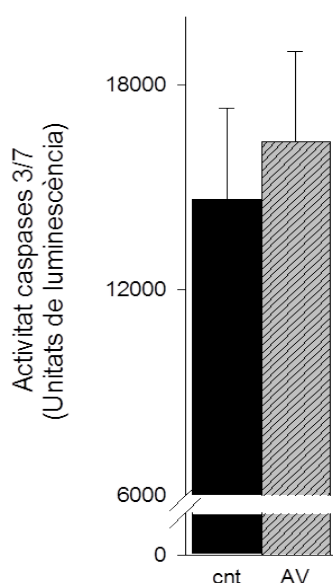


**Fig.48 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la relació p25/p35 en l'hipocamp i el còrtex de ratolins 3xTg per l'Alzheimer.** (a) Immunoblots representatius dels nivells d'expressió de la relació p25/p35. (b) Representació de l'anàlisi fotodensitomètrica dels nivells de la relació p25/p35. Les barres representen els resultats de la mesura semiquantitativa de les bandes obtingudes per la tècnica del *Western Blott*. Els resultats són la mitjana ± EEM de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a una mostra: \*\*p<0.01 vs.cnt., \*\*\*p<0.001 vs. cnt.

significativa l'expressió de la relació p25/p35 després de l'administració del fàrmac en ambdues regions cerebrals (78%,  $p < 0.01$  i 38%,  $p < 0.001$ , en l'hipocamp i el còrtex respectivament) (Fig.48b).

#### - Activitat de les caspases 3/7 en el còrtex

L'activitat de les caspases efectores 3 i 7, les quals participen tant en la via intrínseca com extrínseca de l'apoptosi, es va determinar per luminescència en el còrtex dels ratolins 3xTg. Aquesta no es va veure modificada pel tractament amb l'anticolinesteràsic (Fig.49).



**Fig.49 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'activitat de les caspases 3/7 en el còrtex de ratolins 3xTg per l'Alzheimer.** Quantificació de l'activitat de les caspases 3/7 per luminescència. Les barres representen els resultats obtinguts en unitats de luminescència directament proporcionals a l'activitat de les caspases 3/7. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM dels triplicats de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadístic s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades.

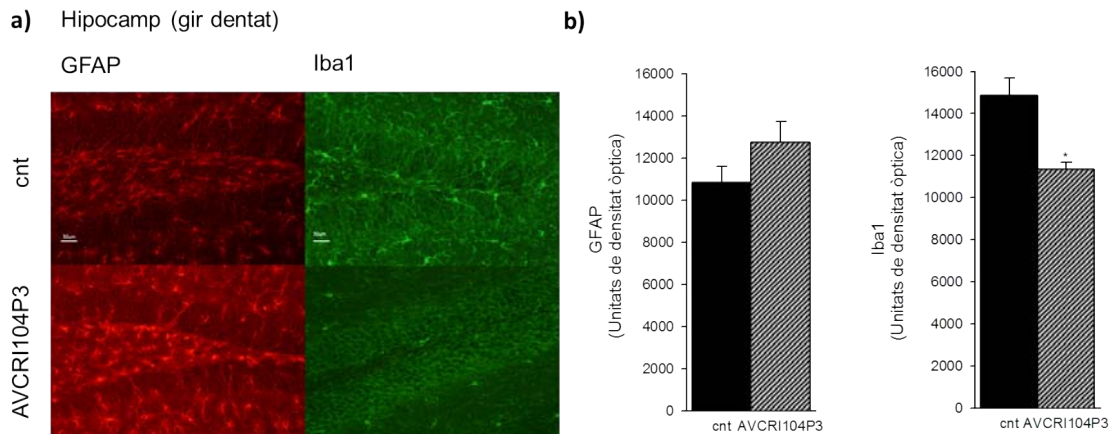
### 4.3. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'expressió dels marcadors de gliosi i neurogènesi en l'hipocamp

#### - GFAP i Iba1

En el cas dels ratolins transgènics, l'expressió de la proteïna glial àcida fibril·lar (GFAP), indicadora d'astrogliosi, va presentar un augment no



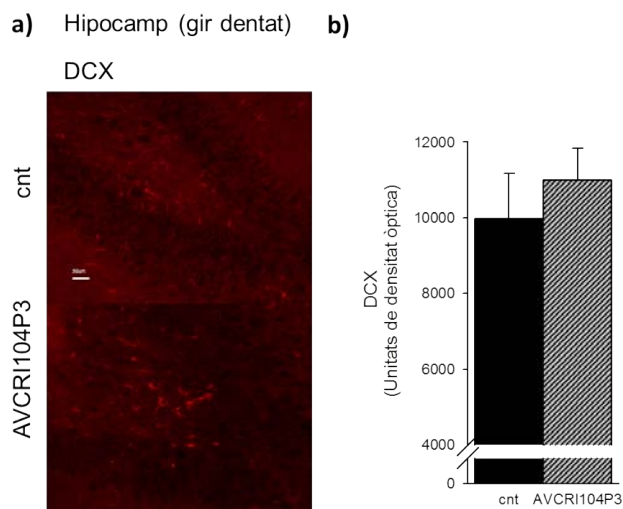
significatiu amb el tractament amb l'anticolinesteràsic (18%) (Fig.50b). En canvi, de igual manera que en els models anteriors, l'expressió de la proteïna Iba1, que marca els macròfags activats, va disminuir de forma significativa respecte als controls (23%,  $p < 0.05$ ) amb l'administració de l'AVCRI104P3 (Fig.50b).



**Fig.50 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la GFAP i l'Iba1 en l'hipocamp (gir dentat) de ratolins 3xTg per l'Alzheimer** (a) Imatges representatives del microscopi de fluorescència del gir dentat marcat amb els anticossos GFAP (vermell) i Iba1 (verd), marcadors d'astrogliosi i microgliosi respectivament. Barra d'escala: 50  $\mu\text{m}$ . (b) Anàlisi semiquantitativa dels nivells de GFAP i Iba1. Les barres representen els resultats de la quantificació de la densitat òptica de les imatges obtingudes per immunofluorescència (IF). Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades: \* $p < 0.05$  vs. cnt.; cnt=control (sèrum fisiològic 0.9%); AVCRI104P3 (0.6  $\mu\text{mol/kg}$ ).

## - DCX

En concordança amb els resultats obtinguts amb els ratolins no transgènics, la proteïna DCX, present en les neurones neonatals, no va presentar canvis significatius en la seva expressió entre els diferents grups experimentals. El que sí que es va observar és una certa tendència a l'alça amb el tractament (Fig.51b).



**Fig.51 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre la DCX en l'hipocamp (gir dentat) de ratolins 3xTg per l'Alzheimer** (a) Imatges representatives del microscopi de fluorescència del gir dentat marcat amb l'anticòs DCX (vermell), marcador de neurogènesi. Barra d'escala: 50  $\mu$  m. (b) Anàlisi semiquantitativa dels nivells de DCX. Les barres representen els resultats de la quantificació de la densitat òptica de les imatges obtingudes per IF. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM de 3-4 experiments d'entre 3 i 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades.

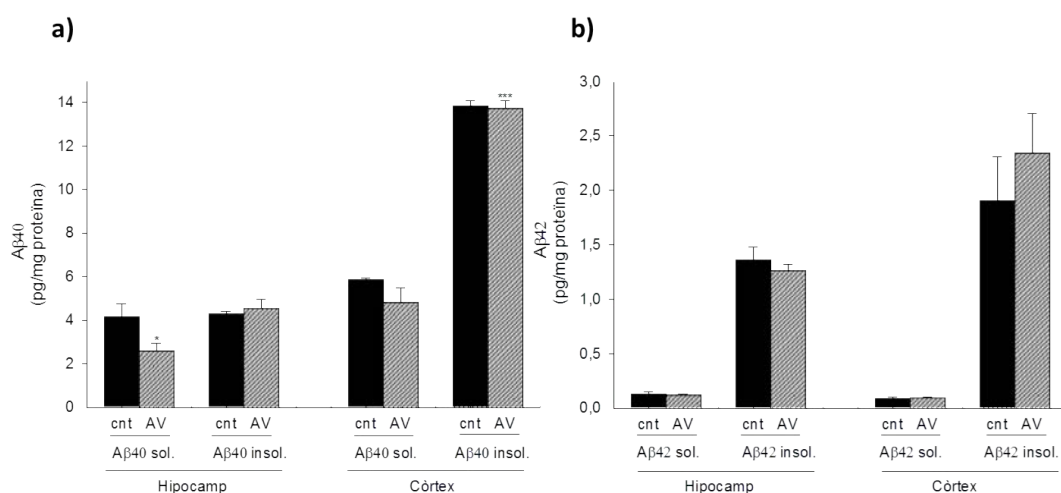
#### 4.4. Efecte de l'AVCRI104P3 sobre l'expressió dels pèptids $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ en l'hipocamp i el còrtex

El pèptid  $\beta$ -amiloide, producte del processament amiloidogènic de l'APP, es presenta majoritàriament sota les formes d' $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$ , que es corresponen a dos pèptids de 40 i 42 aminoàcids respectivament, essent el pèptid  $A\beta_{42}$  el més neurotòxic. Ambdues formes es troben en estat soluble i insoluble en funció de la grandària dels agregats, essent la forma soluble més neurotòxica que la insoluble. A partir d'anticossos monoclonals per a les formes soluble i insoluble dels pèptids  $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$ , i mitjançant la tècnica d'immunoassaig ELISA, es van determinar les respectives concentracions tant en l'hipocamp com en el còrtex.

Els resultats obtinguts van mostrar una disminució significativa de la fracció soluble del pèptid  $A\beta_{40}$  en l'hipocamp dels animals tractats amb l'anticolinesteràsic (37%,  $p < 0.05$ ) (Fig.52a). En canvi, en el còrtex no es van

observar diferències entre els grups de tractament. La quantitat d'A $\beta$ <sub>40</sub> insoluble determinada en el còrtex va ser molt superior a la soluble, així com a la determinada en l'hipocamp (Fig.52a).

Quant al pèptid A $\beta$ <sub>42</sub>, la presència del fàrmac no en va modificar la concentració de forma significativa ni en el còrtex ni en l'hipocamp (Fig.52b). En aquest cas, les concentracions de la forma insoluble del pèptid van ser més de 10 vegades superiors a les solubles en ambdues regions (Fig.52b).



**Fig.52 Efecte de l'AVCRI104P3 sobre les formes soluble i insoluble dels pèptids A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub> en l'hipocamp i el còrtex de ratolins 3xTg per l'Alzheimer.** Representació dels nivells d'A $\beta$ <sub>40</sub> (a) i A $\beta$ <sub>42</sub> (b) soluble i insoluble en l'hipocamp i en el còrtex determinats per ELISA. Els resultats són la mitjana  $\pm$  EEM dels triplicats de 3-4 experiments de 5 animals per grup de tractament. Per a l'anàlisi estadística s'ha aplicat la prova t de Student per a mostres no aparellades: \*p<0.05 vs. cnt., \*\*\*p<0.001 vs. cnt.; cnt=control (sèrum fisiològic 0.9%); AV=AVCRI104P3 (0.6  $\mu$ mol/kg); sol.=soluble; insol.=insoluble.



**DISCUSSIÓ**



Els trastorns neurodegeneratius així com l'envelliment són el resultat directe de la pèrdua funcional progressiva i mort de determinades neurones. L'abordatge farmacològic més utilitzat en aquest tipus d'infermetats implica el bloqueig o la potenciació dels neurotransmissors que es troben alterats com a conseqüència d'aquesta mort neuronal selectiva (Hunter et al. 2013). No obstant, i com és ben conegut, hi ha pocs medicaments disponibles per prevenir o tractar aquesta pèrdua neuronal característica de patologies tals com l'Alzheimer, el Parkinson, la Corea de Huntington o l'esclerosi lateral amiotròfica. Amb relació a l'MA s'han proposat diverses opcions terapèutiques relacionades amb els tractaments amb antioxidants, els inhibidors de la MAO-B, les vacunes d'A $\beta$ , però els únics fàrmacs aprovats fins ara per l'FDA i l'EMA per a aquesta indicació són els IChE, que en augmentar la transmissió central colinèrgica redueixen els símptomes cognitius, funcionals i de comportament associats a la malaltia. A més, alguns d'aquests compostos presenten d'altres funcions no canòniques, també beneficioses per a l'MA, i capaces de modificar el curs de la malaltia. De fet, actualment s'estan realitzant molts esforços per tal d'aconseguir compostos que mostrin diferents efectes al mateix temps, de tal manera que a la vegada que augmentin l'activitat colinèrgica puguin interaccionar amb els diferents factors que intervenen en el desenvolupament del procés neurodegeneratiu.

D'entre aquests fàrmacs multifuncionals, cal destacar-ne, entre d'altres, les huprines i els IChE d'acció dual, heterodímers formats per almenys un farmacòfor d'un IChE, que inhibeixen tant el lloc actiu com el lloc perifèric de l'AChE (Di Pietro et al. 2014; Viayna et al. 2013). Aquests compostos, sintetitzats pel laboratori de Química Farmacèutica dirigit pel Dr. Pelayo Camps i el Dr. Diego Muñoz-Torrero, de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, presenten un ampli perfil farmacològic i han estat objecte de diferents estudis realitzats en el nostre departament. Així, la present tesi doctoral s'ha centrat en l'avaluació de l'efecte de dos d'aquests fàrmacs, els anticolinesteràsics huprina X (híbrid huperzina A-tacrina) i AVCRI104P3 (heterodímer donepezil-huprina Y), mesurant a nivell bioquímic els canvis en la regulació d'algunes vies i molècules implicades en l'apoptosi (AChE-S,

pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ , p25/p35, caspases i A $\beta$ ), la supervivència cel·lular (AChE-R, Bcl2 i pAkt/Akt), la plasticitat neuronal (sinaptofisina), la gliosi (GFAP i Iba1) i la neurogènesi (DCX) en diferents entorns, tots ells relacionats amb els processos de neurodegeneració o d'envelliment. Els experiments s'han realitzat utilitzant diferents models experimentals tant *in vitro* com *ex vivo*: en cèl·lules de neuroblastoma humà que sobreexpressen les isoformes S i R de l'AChE, en ratolins tractats amb l'àcid kaïníc, en ratolins de dotze mesos i en ratolins 3xTg-AD també de dotze mesos.

L'HX, a part de ser un potent inhibidor de l'AChE, com ja s'ha comentat anteriorment, millora la cognició en ratolins transgènics per l'Alzheimer (Ratia et al. 2013), presenta efectes neuroprotectors (juntament amb l'HY i l'HZ) enfront del peròxid d'hidrogen en cèl·lules PC12 diferenciades i sense diferenciar (Pera et al. 2013), és capaç de disminuir els nivells del pèptid A $\beta$  en cervells de ratolins 3xTg-AD i incrementar-ne els nivells de sinaptofisina (Hedberg et al. 2010). A la vegada, disminueix l'agregació amiloidogènica induïda per l'AChE *in vitro* (Pera et al. 2006) i potencia l'efecte dels receptors nicotínics en sinaptosomes corticals de rata (Roman et al. 2004). A més, també s'ha observat que les huprines presenten una acció agonista sobre el receptor M<sub>1</sub> en cervell de rata (Roman et al. 2002; Alcalá et al. 2005). L'efecte neuroprotector de les huprines també ha estat demostrat davant del glutamat en cultius de cèl·lules granulars i davant de lesions estriatals induïdes per l'àcid 3-nitropropioníc (Canudas et al. 2003).

L'híbrid AVCRI104P3, un compost de síntesi més recent, que inclou una molècula d'huprina Y enantiopura i un *linker* de tres metilens, és un potent inhibidor de l'hAChE (IC<sub>50</sub> de 5,37 $\pm$ 0.3 nM) a la vegada que inhibeix l'agregació del pèptid A $\beta$ <sub>40</sub> induïda per l'AChE (44.5 $\pm$ 1.8% d'inhibició a 100  $\mu$ M), essent en ambdues activitats més eficaç que el donepezil. També inhibeix de forma significativa l'hBChE (IC<sub>50</sub> de 88 $\pm$ 2.3 nM), la BACE-1 (29.1 $\pm$ 2.9% d'inhibició a 5  $\mu$ M) i l'autoagregació del pèptid A $\beta$ <sub>42</sub> (28.5 $\pm$ 0.4% d'inhibició a 10  $\mu$ M) (Viayna et al. 2010).



Per tant, en la present tesi doctoral, a través de diferents models experimentals, s'ha estudiat l'efecte dels anticolinesteràsics HX i AVCRI104P3 en front de la mort i la supervivència neuronal, la inflamació i la neurogènesi, amb l'objectiu de trobar possibles accions beneficioses, tant per a l'MA com per a qualsevol trastorn neurodegeneratiu, relacionades o no amb la inhibició de l'AChE.

### **Efecte dels anticolinesteràsics HX i AVCRI104P3 en cèl·lules de neuroblastoma humà que sobreexpressen les isoformes S i R de l'AChE.**

S'ha descrit que l'AChE, enzim responsable del metabolisme de l'ACh, presenta dues isoformes particularment rellevants en el teixit neuronal: la forma sinàptica (S o T), majoritària i insoluble, que s'expressa de forma predominant en l'SNC i en el teixit muscular (Massoulié & Millard 2009), i la forma *readthrough* (lectura completa) o R, minoritària, soluble i de dispersió ràpida (Massoulié et al. 2008).

El polimorfisme estructural de l'enzim sosté la teoria que les formes moleculars diferents de l'AChE, tot i presentar el mateix lloc actiu i la mateixa activitat catalítica, mostren altres funcions fisiològiques diferents (implicació en el desenvolupament neuronal, en la inflamació i en l'apoptosi (Vogel-Hopker et al. 2012; del Rey & Besedovsky 2008; Li et al. 2000), i no només en el sistema colinèrgic (substància negra, cèl·lules del cerebel, hematopoètiques, osteogèniques i neoplàsiques (Greenfield et al. 1983; Deutsch et al. 2002)).

Estudis realitzats en neurones de l'hipocamp mostren que la isoforma S de l'AChE, així com els seus pèptids C-terminals T14 i T30 presenten accions tròfiques o tòxiques en funció de la dosi i el temps d'exposició, les quals podrien estar relacionades amb l'obertura específica i selectiva dels canals de calci tipus L o canals lents (Greenfield et al. 2004). En concret, hi ha treballs que revelen que els pèptids T14 i T30 interaccionen de forma al·lostèrica amb els receptors nicotínics  $\alpha 7$  modulant l'influx de calci, i regulant a l'alça la síntesi

d'mRNA i l'expressió proteica d'aquests receptors. Específicament el pèptid T14, de grandària inferior al T30, a baixes concentracions potencia el creixement de neurites i es comporta com un agonista dels nAChR  $\alpha 7$ , i a altes concentracions o administrat de forma crònica els bloqueja i indueix l'apoptosi (Bond et al. 2009).

La sobreexpressió de l'AChE-S està relacionada amb la mort cel·lular programada, en part, perquè sembla que està implicada en la formació de l'apoptosoma (Park et al. 2004; Greenberg et al. 2010). Els ratolins transgènics per l'AChE-S humana acumulen de forma progressiva fragments neuronals de proteïnes immunopositives, presenten una alta incidència d'astròcits reactius (Sternfeld et al. 2000) i mostren una neuropatologia accelerada relacionada amb l'estrès, que inclou la pèrdua de l'arborització i les espines dendrítiques (Meshorer & Soreq 2006).

La isoforma R de l'AChE, contràriament a l'AChE-S, ha demostrat tenir efectes beneficiosos a curt i a mig termini en condicions d'estrès agut. Els ratolins que sobreexpressen l'AChE-R mostren una funció neuromuscular normal, i els seus cervells estan relativament protegits de les característiques patològiques associades a l'estrès, que d'altra banda causaria el deteriorament neuronal propi de l'edat (Berson et al. 2008). De la mateixa manera s'ha demostrat que el pèptid C-terminal de l'AChE-R (ARP) promou el desenvolupament i la plasticitat neuronal (Dori & Soreq 2006).

En aquesta primera part del nostre treball, es va estudiar la influència de les isoformes S i R de l'AChE sobre la supervivència cel·lular en cultius de cèl·lules de neuroblastoma humà SH-SY5Y transfectades amb les variants S i R. Tal com s'ha descrit en els resultats, la sobreexpressió de l'AChE, independentment de la isoforma transfectada, va disminuir significativament la viabilitat cel·lular entre un 40% i un 55% ( $p < 0.001$ ) respecte als controls (cèl·lules no transfectades). Aquests canvis en la supervivència cel·lular es van mantenir constants entre les 24 i les 48 hores després de la transfecció. Considerant que les cèl·lules SH-SY5Y expressen tota la maquinària

colinèrgica (Yamada et al. 2011), podria ser que l'augment de l'activitat colinesteràsica i la conseqüent disminució dels nivells d'ACh disponible en fossin la causa. S'ha descrit que tant l'ACh com la colina endògena presenten efectes neuroprotectors essent les dues molècules potents activadors dels nAChR  $\alpha 7$  (presentes en les cèl·lules SH-SY5Y), els quals augmenten la supervivència neuronal i milloren el rendiment cognitiu i la demència, entre altres funcions (Kalappa et al. 2013). També hi ha autors que defensen que l'ACh exerceix efectes neuroprotectors a través dels receptors muscarínics (mAChR) i de l'activació de la PKC (Tiong et al. 2010).

Pel que fa als resultats obtinguts en les corbes de viabilitat de les cèl·lules SH-SY5Y transfectades en presència de diferents concentracions de peròxid d'hidrogen, aquestes no van mostrar diferències significatives ni entre elles (S, R) ni amb els controls (les cèl·lules no transfectades). Només a la concentració de 400  $\mu$ M es va observar un augment de la viabilitat cel·lular en favor de les cèl·lules transfectades amb l'AChE-S (23%,  $p < 0.05$ ). Aquest resultat, encara que sigui estadísticament significatiu, en ser un punt aïllat de la corba, probablement, no tingui una significació biològica aparent. El fet de no veure diferències en la supervivència cel·lular en front d'un estímul oxidatiu entre les cèl·lules transfectades amb les diferents isoformes, mostra, igual que en el cas anterior, que cap de les dues variants provoca canvis significatius en la viabilitat cel·lular en aquestes condicions experimentals. Hi ha estudis realitzats en cèl·lules SH-SY5Y, que han suggerit que els nivells proteics d'AChE-R augmenten de forma significativa des d'una hora fins a cinc hores després de l'exposició de les cèl·lules a un estrès oxidatiu de lleu a moderat (Härtl et al. 2011), o amb quantitats patofisiològiques de la proteïna  $\beta$ -amiloide (Li et al. 2013). Altres estudis realitzats en l'hipocamp de pacients amb l'MA, en canvi, demostren que tot i observar-se un augment en els nivells d'mRNA-R, aquest increment no es veu traduït a proteïna (Berson et al. 2008). A més a més, s'ha descrit tant en cèl·lules de neuroblastoma i glioma com en ratolins, que tot i l'increment d'mRNA-R en condicions d'estrès, els seus nivells continuen mantenint-se molt baixos en comparació amb els d'mRNA-S. Aquest augment, per tant, no és un indicador sensible del nivell d'estrès (Perrier et al. 2005), i en

conseqüència sembla poc probable que aquest increment es tradueixi en un canvi significatiu en la supervivència cel·lular.

En el nostre cas, cal tenir en compte ambdues situacions. En primer lloc, quan les cèl·lules són transfectades amb les formes S o R no s'observen diferències pel que fa a la viabilitat. I per altra banda, quan es crea un estímul pernicios, les cèl·lules transfectades amb R no mostren una resposta protectora. Aquests resultats suggereixen que la sobreexpressió observada d'AChE és suficient per augmentar la mortalitat de les cèl·lules transfectades respecte a les no transfectades, però en canvi, l'increment de l'AChE-R no és suficient per protegir les cèl·lules del peròxid.

Prèviament a l'avaluació dels efectes dels anticolinesteràsics donepezil, HX i AVCRI104P3 sobre l'mRNA de les variants S i R, es van comparar els seus nivells basals, i en concordança amb el ja descrit (Perrier et al. 2005), els resultats van mostrar uns nivells d'mRNA-S significativament molt superiors als d'R, representant aquests últims un 0.5% dels de la forma sinàptica ( $p < 0.001$ ).

Quan es van estudiar els efectes dels IChE sobre els mRNA S i R es van observar respostes diferents. Mentre que el donepezil va augmentar els nivells d'mRNA-R (154%,  $p < 0.01$ ) sense modificar els d'S, l'AVCRI104P3 va disminuir els nivells d'mRNA-R un 30% i va incrementar els d'S de forma significativa (76%,  $p < 0.001$ ). L'HX, per la seva part, va disminuir tant l'mRNA-S (33%,  $p < 0.01$ ) com l'mRNA-R (83%,  $p < 0.001$ ). Això ens porta a concloure que els IChE poden modular la transcripció de l'AChE de forma independent de la seva interacció amb l'enzim, ja que tots ells actuen de la mateixa manera sobre el centre catalític de l'enzim.

Hi ha estudis que mostren variacions en l'expressió de les isoformes de l'AChE en pacients d'Alzheimer tractats amb els IChE. Així doncs, el donepezil s'ha associat amb una disminució dels nivells d'AChE-R en comparació amb els nivells d'AChE-S, mentre que la rivastigmina s'ha vist que augmenta la relació AChE-R/AChE-S. Pel que fa a la tacrina, aquesta incrementa els nivells d'expressió de les dues isoformes, la qual cosa podria ser en part deguda a la

inducció d'algun tipus de mecanisme de retroalimentació a través dels receptors colinèrgics. Varis autors suggereixen que la síntesi i el disseny de nous compostos hauria d'aspirar a la regulació a l'alça de l'AChE-R (Darreh-Shori et al. 2004; Nordberg et al. 2014; Greenberg et al. 2010; Pohanka 2012), i que els canvis circadians en l'expressió de les isoformes S i R haurien de tenir-se en compte per a les consideracions terapèutiques (Shaltiel et al. 2013).

Dels resultats obtinguts en el nostre laboratori, també podem dir que tots el anticolinesteràsics que hem estudiat modifiquen la síntesi de l'mRNA d'ambdues isoformes seguint un patró d'actuació diferent. Sembla que la resposta de l'mRNA-S i R als diferents inhibidors no depèn únicament del propi compost, sinó també de molts altres factors inherents a l'entorn experimental ja que, com veurem més endavant, els resultats *ex vivo* no es correlacionen del tot amb el que hem observat *in vitro*.

### **Avaluació dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic HX en el model de neurotoxicitat amb l'àcid kaïníc en ratolins C57BL/6.**

El sistema glutamatèrgic és el principal sistema implicat en la transmissió sinàptica excitatòria central. El glutamat actua a través de dos tipus de receptors ionotròpics: els receptors NMDA i els receptors no NMDA. Els no NMDA es divideixen en dos subtipus: els  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propionat (AMPA) i els kainat, i es localitzen majoritàriament a l'hipocamp tant a nivell pre- com postsinàptic. La contribució d'aquests receptors en la funció cerebral ha estat ben caracteritzada degut al paper que juguen en les funcions sinàptiques i a la disponibilitat d'agonistes i antagonistes selectius. La sobreestimulació d'aquests receptors, ja sigui per part del glutamat o per altres agonistes provoca la desregulació dels canals de calci, que desencadena una sèrie de processos que porten a la mort neuronal per excitotoxicitat (Choi 1988). L'excitotoxicitat s'ha postulat com la causa principal de mort neuronal en accidents cerebrovasculars, lesions cerebrals (Choi 1988), així com en una

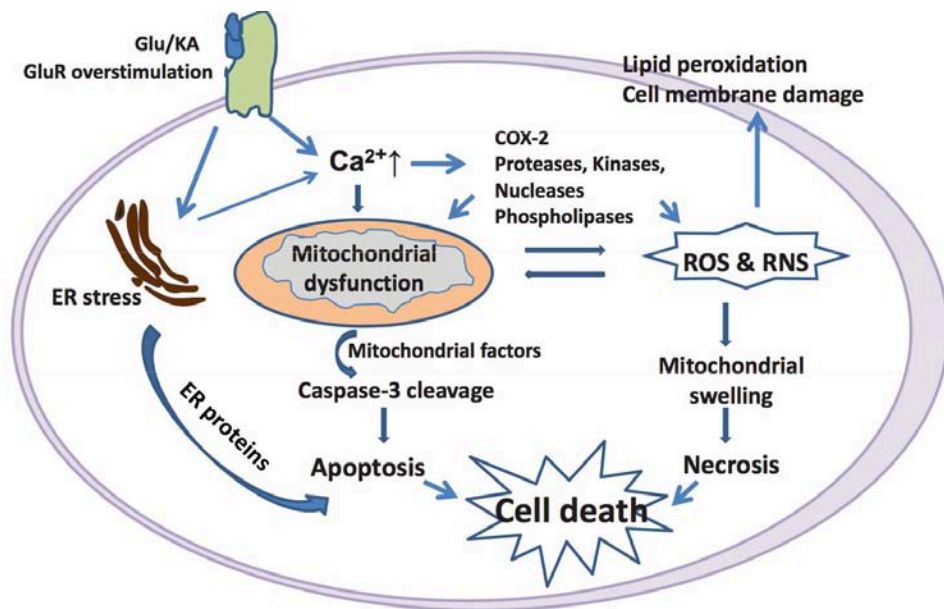
sèrie de malalties neurodegeneratives que inclouen l'Alzheimer, el Parkinson, la corea de Huntington i l'esclerosi múltiple (Manev et al. 1989).

El model escollit per estudiar els efectes de l'HX sobre els mecanismes de neurodegeneració i mort neuronal induïda per excitotoxicitat, i processos relacionats, va ser el model de toxicitat amb l'àcid kaínic, un agonista dels receptors ionotròpics AMPA i KAINAT, el qual es va administrar a dosi única (28 mg/kg, i.p.) i es va deixar actuar durant un període de 48 hores. L'HX es va administrar durant 21 dies (0,08 mg/kg, i.p.) prèviament a l'administració de l'àcid kaínic. Es van determinar els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'AcChE en el còrtex frontal, els nivells i l'activitat de determinades proteïnes implicades en l'apoptosi i en la supervivència cel·lular tant en el còrtex com en l'hipocamp, i la presència de factors específics relacionats amb l'astrogliosi, la microgliosi i la neurogènesi en l'hipocamp, tots ells implicats directa o indirectament amb el procés o els processos neurodegeneratius.

L'àcid kaínic (KA) és un anàleg no degradable del glutamat, 30 vegades més potent que aquest pel que fa a la seva neurotoxicitat (Lee et al. 2008). L'administració del KA en ratolins provoca una síndrome de convulsions ben caracteritzada i descrita per Ben-Ari i altres grups de recerca (Ben-Ari 1985). El dany induït per l'àcid kaínic afecta principalment a l'hipocamp a causa de l'alta densitat de receptors kainat presents en aquesta regió (Darstein et al. 2003), encara que la pèrdua de neurones difereix entre espècies i soques (McLin & Steward 2006). Les neurones són directament excitades per l'estimulació dels receptors kainat, i indirectament per l'augment del flux de glutamat provocat per l'estimulació de les fibres moloses (fibres que es dirigeixen al cerebel) de la regió CA3 (Rodríguez-Moreno & Sihra 2004), el que desencadena l'extensió de l'estat epilèptic a totes les estructures límbiques.

La sobreactivació dels receptors del KA, que actuen tant a nivell pre- com postsinàptic, provoca la despolarització de la membrana cel·lular alterant la concentració del calci intracel·lular i el funcionament del reticle endoplasmàtic, i desencadenant així la cascada d'inflamació i de mort neuronal que implica la

disfunció mitocondrial, la generació de les ROS i les RNS i l'activació enzimàtica (COX-2, proteases, quinases, nucleases, fosfolipases...), entre altres processos relacionats (Zhang & Zhu 2011) (Fig.53).



**Fig.53 Descripció esquemàtica de la mort neuronal per l'àcid kaïníc.** (1) Mitjançant l'estimulació dels receptors del glutamat (GluR) l'àcid kaïníc (KA) provoca l'augment del calci intracel·lular, l'activació dels enzims dependents del calci i la producció de radicals lliures; (2) El calci excessiu i els radicals lliures causen la disfunció mitocondrial, l'alliberament de factors mitocondrials i l'activació de la caspasa 3, el que porta a l'apoptosi neuronal; (3) El KA provoca la desintegració del reticle endoplasmàtic (ER) i l'estrès associat amb l'activació de les proteïnes Bip, Chop i caspasa 12; (4) La sobrecàrrega de calci i l'excés de radicals lliures causen la inflamació de la mitocondria que porta a la necrosi neuronal. COX: ciclooxigenasa; ROS: espècies reactives de l'oxigen; RNS: espècies reactives del nitrogen (Adaptat de Zhang & Zhu 2011) .

Experiments realitzats amb la tacrina i la huperzina A, anticolinesteràsics parentals de l'HX, han demostrat millorar la connexió colinèrgica i actuar com a nootròpics enfront de la lesió provocada per l'administració del KA al nucli basal magnocel·lular, nucli principalment colinèrgic implicat en el processament de la memòria de treball espacial (Ueki & Miyoshi 1989; Xiong et al. 1998).

En aquest sentit, i pel que fa a les convulsions observades després de l'administració del KA, aquestes no es van veure modificades amb l'administració prèvia de l'HX. Se sap que tant l'augment de la transmissió glutamatèrgica com de l'activitat colinèrgica en el cervell estan involucrades en l'aparició de convulsions (McDonough & Shih 1993; Lallement et al. 1998), i que els pacients amb la malaltia d'Alzheimer presenten un major risc de desenvolupar atacs d'epilèpsia en comparació amb els pacients no dements d'edat similar (Romanelli et al. 1990; Belcastro et al. 2007). De fet, s'ha demostrat que el tractament de l'MA amb els colinomimètics donepezil i rivastigmina provoca convulsions com a reacció adversa en un 6,41% i un 8,74% dels pacients, respectivament (Kumlien & Lundberg 2010). I quan el donepezil va ser proposat com a possible tractament per als problemes de memòria en les persones amb epilèpsia, tot i que es va detectar una millora en l'aprenentatge, els autors van remarcar la possible exacerbació de les convulsions (Fisher et al. 2001). Només l'IAChE huperzina A ha demostrat capacitat per modular els atacs epilèptics provocats per un augment de l'activitat del sistema glutamatèrgic en bloquejar els receptors NMDA (Tang et al. 2011; Schneider et al. 2009; Coleman et al. 2008). El fet de que la molècula d'huperzina A estigui inclosa en l'estructura de l'HX podria explicar el perquè aquesta última no incrementa la taxa d'atacs induïts pel KA.

En el present treball, abans d'estudiar els canvis en l'mRNA de les isoformes S i R deguts als diferents tractaments (àcid kaínic i HX), se'n van determinar els nivells basals. Tal i com està descrit, els nivells d'mRNA-S van ser superiors als d'mRNA-R, en concret, un 38% superiors. No obstant, les diferències no van ser significatives a causa de la variabilitat dels valors.

Quan es va avaluar l'efecte que produïa el KA en els nivells d'mRNA d'ambdues isoformes (S i R), els resultats van mostrar un augment significatiu de l'mRNA-R (104%,  $p < 0.001$ ), i una tendència per part de l'HX a disminuir aquest increment tot i que no significativament. En canvi, els nivells d'mRNA-S no es van veure modificats ni amb el KA ni amb l'HX (Fig.25b). Anteriorment s'ha explicat que sota condicions d'estrès i de lesions cerebrals, els transcrits



pre-mRNA de l'AChE pateixen un *splicing* alternatiu pel que es produeix un augment de l'expressió de la isoforma minoritària R (Soreq & Seidman 2001; Meshorer & Soreq 2006). Estudis realitzats en rates epilèptiques van revelar un increment de l'mRNA-R en l'hipocamp, i en canvi, no van mostrar diferències en els nivells d'mRNA-S, suggerint un augment net de la isoforma R (Zimmerman et al. 2008). En aquest cas, l'increment dels nivells d'mRNA-R podria ser entès com un mecanisme per protegir el teixit cerebral de la hiperexcitació colinèrgica, entre d'altres, que es dona durant les convulsions degut a l'administració del KA, essent l'AChE-R fàcilment accessible pel microambient sinàptic (Zimmerman et al. 2008). A més a més, com ja s'ha comentat, a l'AChE-R se li atribueix un paper neuroprotector i antiapoptòtic (Dori & Soreq 2006). El fet que l'HX no modifiqués de forma significativa els mRNA S i R, a diferència del que s'observa *in vitro*, podria ser degut tant al model experimental (*in vitro* vs. *ex vivo*, cèl·lules que sobreexpressen l'AChE vs. model de neurotoxicitat amb el KA) com al temps de determinació de l'mRNA (24 i 72 hores després de l'administració del fàrmac, *in vitro* i *ex vivo*, respectivament). Hi ha estudis realitzats en cèl·lules de neuroblastoma (N2a) on s'observa que el temps de vida mitja ( $t_{1/2}$ ) de l'mRNA de l'AChE és de 4-5 hores (Puymirat et al. 1995), per tant, la diferència en els temps de determinació podria afectar els resultats obtinguts en ambdós models experimentals.

En referència als esdeveniments de senyalització intracel·lular associats a la mort cel·lular induïda pel KA, són difícils de determinar donada la seva multiplicitat, complexitat i interrelació. Hi ha estudis que suggereixen que la generació de les ROS, i la inhibició i expressió de diverses proteïnes (anti)apoptòtiques tals com la Bcl2, el factor p53, la Bax i les caspases (cisteïna-proteases de mort cel·lular) en són la causa principal (Henshall et al. 2000). S'ha descrit que sota els efectes de l'àcid kaínic disminueix tant la síntesi de l'mRNA com de la proteïna Bcl2 a les 6 hores de les convulsions arribant al nivell més baix a les 12 hores, suggerint que l'estat epilèptic accelera l'apoptosi en inhibir l'expressió de la Bcl2 (Sun et al. 2012). Els nostres resultats mostren que l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl2 disminueix

significativament tant en l'hipocamp (26%,  $p < 0.001$ ) com en el còrtex (38%,  $p < 0.001$ ) dels ratolins tractats amb l'àcid kaínic respecte als controls, el que ens indica que els efectes sobre la Bcl2 es mantenen fins a les 48 hores després de la seva administració. Quan es van analitzar els nivells de la proteïna antiapoptòtica en els animals tractats prèviament amb l'HX, aquests, tot i que van presentar una lleugera tendència a la recuperació dels nivells d'aquesta proteïna, no van mostrar canvis significatius en la seva expressió. Cal tenir en compte que el  $t_{1/2}$  de la Bcl2 és de 22 hores (O'Connor et al. 2006), i que el tractament amb l'anticolinesteràsic es va suspendre 72 hores abans del sacrifici dels ratolins.

La mort cel·lular programada és desencadenada per una sèrie de cascades de caspases. La caspasa 3, un regulador crucial de l'apoptosi activat per les caspases 8 o 9, s'activa durant les convulsions epilèptiques anteriors a la mort neuronal (Kondratyev & Gale 2000). S'ha demostrat que tant l'mRNA com la proteïna caspasa 3 s'incrementen en les neurones de l'hipocamp 24 hores després de les convulsions arribant al seu màxim a les 72 hores, i que augmenta significativament la seva activitat entre els 3 i els 7 dies després de l'administració del KA (Sun et al. 2012; Crespo-Biel et al. 2007). Quan es va analitzar l'activitat de la caspasa 3 en diferents tipus cel·lulars en l'hipocamp, se'n va detectar un augment un i 5 dies després de la injecció del KA (Tzeng et al. 2013). Contràriament, Verdaguer i cols. van observar tan sols un modest increment de l'activitat d'aquesta proteasa a les 24 hores de l'administració del KA en cèl·lules de cerebel, el que porta a pensar que l'activació d'aquestes proteïnes no és un esdeveniment crucial en l'apoptosi induïda per l'àcid kaínic (Verdaguer et al. 2002). S'ha suggerit que l'activació de la calpaïna, i no la de la caspasa 3, és la que està implicada en la neurotoxicitat provocada en l'hipocamp després de les crisis epilèptiques (Araújo et al. 2008). En el nostre cas, es va deixar actuar el KA durant 48 hores i posteriorment es va determinar l'activitat de les caspases 3 i 7. Els resultats no van mostrar cap modificació significativa pel que fa a l'activitat d'aquestes proteases, ni deguda a l'administració de l'àcid kaínic, ni al tractament conjunt (fàrmac i àcid kaínic). Podria ser que en les nostres condicions experimentals haguéssim determinat

l'activitat de les caspases prèviament a que aquestes haguessin augmentat de forma significativa (Sun et al. 2012; Crespo-Biel et al. 2007). Per altra banda, els estudis es van realitzar en el còrtex, on la mort neuronal induïda per l'administració de l'àcid kaínic no és tan abundant com en l'hipocamp donat que el nombre de receptors AMPA/kainat és menor.

D'altres línies d'investigació s'han centrat en l'activació de les MAPKs (proteïnes quinases mitogen activades) en resposta a l'àcid kaínic i la seva relació amb l'Akt (Kim et al. 2001). L'Akt, que pertany a la família de les proteïnes quinases serina/treonina, és un mediador important de la supervivència cel·lular en resposta als factors de creixement i als estímuls que provoquen un influx de calci a la cèl·lula. Tal com s'ha comentat a la introducció, l'Akt fosforila directament proteïnes proapoptòtiques com la GSK3 $\beta$ , la BAD, la caspasa 9 o el factor de transcripció FOXO, la qual cosa condueix a la supressió de les senyals de mort cel·lular (Lawlor & Alessi 2001). A la vegada, l'Akt activa el factor CREB, que promou la supervivència neuronal i augmenta l'expressió de la Bcl2 (Mabuchi et al. 2001), i indueix l'expressió de la p35, afavorint així la formació del complex Cdk5-p35, enlloc de la unió proapoptòtica Cdk5-p25. L'activació de l'Akt es dona a través de la seva fosforilació dependent de la via de senyalització de la PI3K, i aquesta pot ser activada per diferents lligands com els factors neurotròfics o la insulina, així com per l'estimulació dels receptors nicotínics, entre altres. Els resultats obtinguts després de l'administració del KA mostren una disminució significativa de la forma activa o fosforilada de l'Akt tant en l'hipocamp (23%,  $p < 0.001$ ) com en el còrtex (20%,  $p < 0.001$ ), mentre que la forma inactiva augmenta en l'hipocamp (9%,  $p < 0.05$ ) i en el còrtex (21%,  $p < 0.01$ ) amb l'administració de l'àcid kaínic, d'acord amb el descrit anteriorment per altres autors (Y. S. Kim et al. 2014).

Atès que l'HX també és un agonista al·lostèric dels receptors nicotínics (Roman et al. 2004), l'administració d'aquest anticolinesteràsic podria suggerir la implicació de la via de la PI3K/Akt/Bcl2 relacionada amb l'activació dels nAChERs  $\alpha 7$  (Kihara et al. 2001). A més a més, d'altres estudis demostren que

derivats de la huperzina A (B12H), així com el donepezil i la galantamina, protegeixen les neurones granulars del cerebel i les neurones corticals de la neurotoxicitat del glutamat, activant i regulant a l'alça els receptors nicotínics  $\alpha 4$  i  $\alpha 7$  (Cui et al. 2013; Akaike et al. 2010). No obstant això, l'HX no va modificar les accions del KA en l'hipocamp, i en el còrtex va mostrar una recuperació de la forma inactiva de l'Akt (100% de recuperació,  $p < 0.05$ ) així com una tendència a restablir els nivells control de la forma fosforilada, tot i que no significativa (Fig.27b).

Com ja s'ha comentat, una de les principals dianes de la via de la PI3K/Akt és la GSK3 $\beta$ , la qual inhibeix en fosforilar-la en el residu de serina 9. La seva sobreexpressió és suficient per induir la mort neuronal, i intervé en la hiperfosforilació de la proteïna tau, així com en el processament aberrant de l'APP (Crespo-Biel et al. 2007). També s'ha demostrat que té un paper important en la regulació de la via de les caspases (Linseman et al. 2004). En determinar els nivells d'expressió de les diferents formes de la proteïna GSK3 $\beta$  es va observar, curiosament, un augment de la forma fosforilada o inactiva amb l'administració de l'àcid kaínic tant a nivell de l'hipocamp (29%, no significatiu) com a nivell del còrtex (53%,  $p < 0.01$ ). També es va observar una discreta disminució, encara que significativa, de la forma activa en l'hipocamp (10%,  $p < 0.001$ ). Aquests resultats, considerant que l'Akt és la principal via de fosforilació de la GSK3 $\beta$ , i que aquesta es troba majoritàriament inactiva, poden semblar contradictoris. No obstant això, altres quinases com la proteïna quinasa A (PKA), la C (PKC) o la MAPK-1 poden també fosforilar la GSK3 $\beta$  en la serina 9. Hi ha estudis que suggereixen que després de l'administració de l'àcid kaínic en ratolins hi ha un increment de la forma inactiva de la GSK3 $\beta$  en l'hipocamp, com a mecanisme de defensa de les cèl·lules d'aquella regió en particular (Goodenough et al. 2004). A la vegada, investigacions recents demostren que la sobreactivació dels receptors del glutamat per part de l'àcid kaínic provoca la regulació a l'alça de la PKC, que podria ser la responsable de la inhibició de la GSK3 $\beta$  (Z.-C. Liu et al. 2014; B. Liu et al. 2014). Estudis en el nostre departament han demostrat que l'HX, a través de l'estimulació dels receptors muscarínics ( $M_1$ ) postsinàptics, és capaç d'augmentar els nivells

d'expressió de la PKC i de la pGSK3 $\beta$  en ratolins transgènics per l'Alzheimer (Ratia et al. 2013). Això es podria correspondre amb l'increment de la forma fosforilada detectada amb l'administració crònica de l'anticolinesteràsic en aquells ratolins tractats amb l'àcid kaínic. Donat que la GSK3 $\beta$  té un paper important en la regulació de la via de les caspases, el fet de no veure canvis en l'activitat de la caspasa 3 amb l'administració de l'àcid kaínic podria ser degut a que la GSK3 $\beta$  es troba majoritàriament inactiva.

El dany neuronal produït per l'àcid kaínic condueix a la pèrdua de plasticitat neuronal i de connectivitat sinàptica. Un dels marcadors utilitzats per avaluar el nivell de sinaptogènesi és l'expressió de la sinaptofisina, glicoproteïna d'unió al calci que es troba a les membranes de les vesícules dels neurotransmissors, i que canvia tant en l'hipocamp com en el còrtex després d'una lesió cerebral. La reducció de l'expressió de la sinaptofisina es correlaciona amb la disfunció de la memòria en individus amb l'MA (Suh et al. 2008) i en individus d'edat avançada (Bennett et al. 2006). En analitzar els efectes del KA sobre aquesta proteïna sinàptica s'observà, tal i com han descrit prèviament diferents autors, una disminució de l'expressió de la sinaptofisina en l'hipocamp (8%,  $p < 0.05$ ), però no en el còrtex, on es posà de manifest un lleuger augment de la seva expressió (7%,  $p < 0.05$ ), tot i que es tracta de canvis poc significatius. S'ha suggerit, que aquest increment de l'expressió de la proteïna amb l'administració del KA podria correspondre a la resposta de l'organisme en front de l'agressió produïda per l'àcid kaínic (Arkhipov et al. 2008). El tractament crònic amb l'HX va augmentar de forma significativa l'expressió de la sinaptofisina en l'hipocamp (27%,  $p < 0.01$ ), mostrant en el còrtex solament una tendència a l'alça. Com ja s'ha comentat, en estudis recents s'ha demostrat que el tractament amb l'HX augmenta l'expressió d'aquesta proteïna en el còrtex de ratolins 3xTg-AD, i es suggereix que aquest efecte podria ser degut a l'estimulació dels receptors nicotínics i muscarínics dels quals l'HX, entre altres efectes, n'és un agonista (Hedberg et al. 2010). A més a més, anteriorment també s'ha dit que les huprines presenten accions neuroprotectors enfront del peròxid d'hidrogen en cèl·lules PC12 relacionades amb l'activació dels receptors nicotínics (Pera et al. 2013). Sembla per tant bastant probable, que

l'HX incrementi l'expressió de la sinaptofisina davant de l'efecte del KA, augmentant d'aquesta manera la plasticitat sinàptica i propiciant la remodelació colinèrgica així com les xarxes neuronals relacionades.

L'entrada de calci excessiva i prolongada dins de la cèl·lula, com a resposta a l'excitotoxicitat induïda per la sobreestimulació dels receptors ionotròpics del glutamat (Manev et al. 1989), activa proteases calci-dependents tals com la calpaïna (Ray et al. 2006; Araújo et al. 2008), la qual trenca el factor p35 en el fragment p25. El pèptid p25 sobreactiva la Cdk5, que en aquest estat patològic promou l'apoptosi (Noble et al. 2003; Hashiguchi et al. 2002) i fosforila la tau (Noble et al. 2003). En les nostres condicions experimentals es va observar que l'administració de l'àcid kaïníc augmentava la relació dels factors p25/p35 tant en l'hipocamp (21%,  $p < 0.05$ ) com en el còrtex (11%), tal i com estava descrit (Crespo-Biel et al. 2007). En el cas de l'hipocamp, la relació dels co-activadors p25/p35 va disminuir fins a un 44% ( $p < 0.05$ ) amb el tractament amb l'HX, assolint uns nivells inferiors als dels valors control. Estudis recents demostren que el clorhidrat de donepezil disminueix l'expressió de la via calpaïna/Cdk5-p25 (Wang et al. 2014), essent, doncs, una de les possibles vies d'actuació de l'anticolinesteràsic HX.

Se sap que la mort neuronal induïda pel KA s'acompanya de l'activació dels astròcits i la micròglia (Ravizza et al. 2005). Per una banda, els astròcits, les cèl·lules més nombroses de la glia, presenten receptors funcionals pel glutamat que en sobreactivar-se desencadenen l'astrogliosi o proliferació d'astròcits activats, el que s'ha considerat com un marcador de neurotoxicitat (Ding et al. 2000). Els astròcits activats produeixen citocines pro- i antiinflamatòries, quimiocines, factors neurotròfics, factors de creixement, i altres moduladors implicats en la comunicació entre les neurones i la glia, en resposta a un estímul agressiu (Braun et al. 2009).

Per altra banda, la micròglia, que representa el 20% de la població glial, és el principal tipus cel·lular efector de la resposta immune i inflamatòria de l'SNC (Streit et al. 1988). No obstant, sembla que en condicions patològiques es pot

comportar com a neuroprotectora o com a neurotòxica. Hi ha estudis que suggereixen que en l'esclerosi múltiple o en l'encefalomielitis autoimmune experimental la micròglia activada crea un micro-ambient reparador i regenerador (Napoli & Neumann 2010), i d'altres demostren que aquesta en activar-se, indueix o empitjora els canvis neuropatològics en diverses malalties com l'Alzheimer o el Parkinson, així com en la lesió induïda pel KA en secretar factors proinflamatoris (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,...) i neurotòxics (Marinova-Mutafchieva et al. 2009).

Quan el contingut de la proteïna acídica fibril·lar de la glia (GFAP), filament present en els astròcits actius, es va determinar en l'hipocamp dels ratolins tractats amb el KA, es va observar un lleuger augment significatiu (15%,  $p < 0.001$ ) que no va ser revertit amb l'administració crònica de l'anticolinesteràsic. Hi ha estudis que mostren un augment constant de l'expressió de la GFAP a partir d'un/tres dies fins a un mes després de la injecció intrahipocampal o intraperitoneal d'àcid kaínic (Ding et al. 2000), el que suggereix que potser s'hauria d'haver deixat actuar el KA més de 48 hores per poder determinar-ne el seu efecte màxim. També s'ha demostrat que el tractament crònic amb l'huperzina A, compost parental de l'HX, es capaç de disminuir l'activació de la glia a diferents temps (3, 7, 14 i 28 dies) després de la inflamació crònica provocada per una hipoperfusió cerebral (Wang et al. 2010).

D'altra banda, quan es van analitzar els canvis en la micròglia deguts al KA, es va observar un augment del 73% ( $p < 0.001$ ) de l'expressió de la proteïna Iba1 o AIF-1 (factor inflamatori d'aloinjert), modulador de la resposta immune durant l'activació dels macròfags, el qual es troba incrementat en casos d'inflamació cerebral crònica. A diferència del que vam observar en el cas de la macròglia, l'administració de l'HX revertí completament i de forma significativa l'acció de l'àcid kaínic (68%,  $p < 0.001$ ).

Els efectes antiinflamatoris de l'anticolinesteràsic HX podrien ser deguts tant a la inhibició de l'ACH $E$ , la qual afavoreix l'activació de la micròglia (von Bernhardt et al. 2003), com a l'activació de la via colinèrgica antiinflamatòria,

que inhibeix l'alliberament de les citocines proinflamatòries a partir de l'estimulació dels receptors nicotínics  $\alpha 7$  (Conejero-Goldberg et al. 2008). L'estimulació dels receptors nicotínics ha demostrat atenuar l'alliberament del  $TNF\alpha$  entre altres citocines a través de la via de les MAPKs, i en conseqüència inhibir la micròglia (Liu et al. 2007). També s'ha suggerit que l'estimulació dels receptors  $M_1$  inhibeix la producció del  $TNF\alpha$  i activa el nervi vague eferent que desencadena la resposta antiinflamatòria (Pavlov et al. 2009). En aquest sentit, l'HX activaria la via colinèrgica antiinflamatòria per diferents vies, ja que a part de ser un potent IChE que augmenta la disponibilitat de l'ACh en l'espai sinàptic, com ja s'ha dit anteriorment, potencia l'efecte dels receptors nicotínics (Roman et al. 2004) i presenta una acció agonista sobre el receptor  $M_1$  (Roman et al. 2002; Alcalá et al. 2005). A més, s'ha demostrat que la huperzina A atenua la sobreexpressió de les MAPKs (la JNK i la p38) (Wang et al. 2010), que també es podria suggerir com a possible mecanisme d'acció de la huprina.

La neurogènesi és un procés de generació de noves neurones en l'SNC a través de la divisió de les cèl·lules mare neurals i la diferenciació neuronal de les cèl·lules acabades de néixer. Tot i que és un procés que s'esdevé durant el desenvolupament inicial, hi ha algunes regions del cervell com la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp i la zona sub-ventricular, que recobreix els ventricles laterals, que la mantenen durant tota la vida. La neurogènesi en els hipocamps adults i d'edat avançada ha rebut molta atenció donada la importància de l'hipocamp en el manteniment de l'aprenentatge i la memòria, així com la seva disfunció en malalties com ara l'epilèpsia del lòbul temporal, la malaltia d'Alzheimer, i els trastorns depressius majors (Kempermann et al. 2008), essent la neuroinflamació crònica un dels factors contribuents de la seva restricció (Boehme et al. 2014). Concretament, s'ha demostrat que quan la micròglia és activada, la neurogènesi s'interromp (Kohman & Rhodes 2013).

En el nostre model experimental, el marcador de neurogènesi DCX va disminuir significativament després de l'administració del KA (26%,  $p < 0.05$ ), i el pretractament amb l'HX no va ser capaç de superar aquest efecte, tot i revertir l'increment de l'Iba1 induït pel KA. D'altres IChE com la Bis(7)-tacrina (B7T),



la huperzina A o la galantamina han demostrat augmentar la neurogènesi en diferents models experimentals, i en tots els casos es suggereix la implicació del sistema colinèrgic (ACh, receptors muscarínics  $M_1$  i nicotínics  $\alpha 7$ ) com a primer pas per a l'activació/inhibició de les diferents vies bioquímiques (Shu et al. 2012; Ma et al. 2013; Kita et al. 2014). Tenint en compte això, en el nostre cas, podria ser que la dosi de l'anticolinesteràsic (HX) no hagués estat suficient per revertir l'efecte del KA sobre la neurogènesi (DCX).

Per tant, els resultats obtinguts amb l'HX en relació amb la toxicitat induïda pel KA, suggereixen en primer lloc, que aquesta no incrementa les convulsions provocades pel KA com s'ha observat amb altres IChE. En segon lloc, que protegeix d'algunes accions neurotòxiques observades amb l'administració del KA en incrementar la sinaptofisina i el factor p35 (CDK5) en l'hipocamp, accions relacionades amb la neuroplasticitat. I en tercer lloc, que té un efecte antiinflamatori en disminuir l'activació de la micròglia. Tots aquests resultats, junt amb els obtinguts prèviament en el nostre departament, suggereixen que l'HX té un perfil farmacològic adient pel tractament de diferents malalties neurodegeneratives.

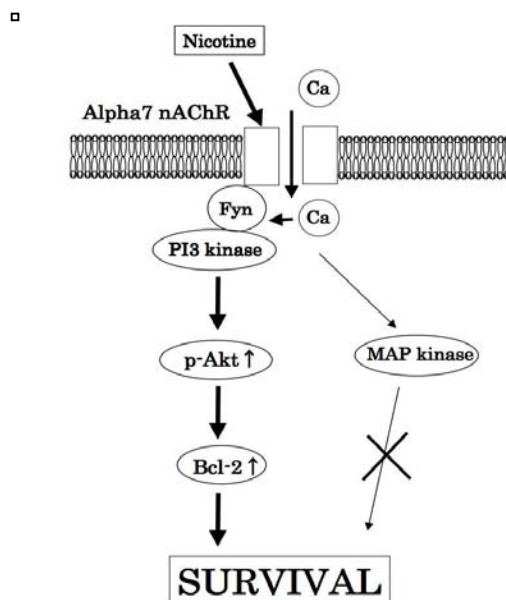
### **Avaluació dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 en ratolins 126/Sv x C57BL/6 de 12 mesos.**

Aquest estudi s'ha centrat en els efectes de l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 sobre les proteïnes implicades en els processos de supervivència i mort cel·lular, així com de plasticitat, funció sinàptica, gliosi i neurogènesi en un model murí de 12 mesos. Prèviament als estudis bioquímics que aquí es presenten, es van realitzar una sèrie de proves de comportament per tal d'analitzar la millora potencial que aquest anticolinesteràsic exercia sobre els processos de memòria i aprenentatge. Els resultats d'aquests estudis de comportament van demostrar que l'AVCRI104P3 induïa millores cognitives així com també s'observaren efectes ansiolítics (Giménez-Llort et al. 2015).

En primer lloc es va avaluar l'efecte de l'AChE sobre els nivells d'mRNA de les isoformes S i R de l'AChE, que com ja s'ha explicat, s'associen a processos pro- i antiapoptòtics respectivament. Previ a aquest estudi, es van comparar els nivells d'mRNA basals d'ambdues variants, i en aquest cas, els nivells d'S van ser només un 16% superiors als d'R. S'ha descrit que amb l'edat disminueix l'activitat de l'AChE, essent entre un 30 i un 50% inferior en els cervells de les rates mascle de 18 mesos en comparació amb les de 3 mesos, i també s'ha observat, que la isoforma S és més vulnerable a l'envelliment que l'R (Das et al. 2001). En aquest sentit, es podria suggerir que la pèrdua d'mRNA-S relacionada amb l'edat podria tendir a igualar els nivells d'ambdues isoformes.

En avaluar l'efecte del fàrmac sobre les isoformes de l'AChE, es va veure que l'administració crònica de l'AVCR1104P3 en ratolins de 12 mesos no va induir cap canvi significatiu en els nivells d'mRNA-S i mRNA-R.

Pel que fa a la proteïna antiapoptòtica Bcl2, el tractament amb l'anticolinesteràsic en va augmentar la seva expressió tant en l'hipocamp (89%,  $p < 0.01$ ) com en el còrtex (23%,  $p < 0.01$ ), així com també va incrementar la de la forma fosforilada de l'Akt en l'hipocamp (38%,  $p < 0.01$ ). La hipòtesi que s'estableix per explicar la resposta al fàrmac es basa en l'efecte neuroprotector dels receptors nicotínics, especialment del receptor  $\alpha 7$ , en front de la neurotoxicitat induïda pel glutamat i pel pèptid  $A\beta$  (Kihara et al. 2001). Aquest subtipus de receptor, format per 5 subunitats  $\alpha 7$ , activa la via de la PI3K/Akt, la qual està implicada en la regulació de la família de la Bcl2, essent l'increment de l'expressió d'aquesta proteïna un dels principals efectes antiapoptòtics d'aquesta via. La fosforilació de l'Akt en aquestes condicions es dona a través de la tirosina quinasa Fyn, la qual està associada amb els receptors nicotínics  $\alpha 7$  i unida a la PI3K, i és dependent de la presència del calci extracel·lular (Kihara et al. 2001) (Fig.54).



**Fig.54** Model esquemàtic de la neuroprotecció induïda per l'estimulació dels receptors nicotínic  $\alpha 7$  (Adaptat de Kihara et al. 2001).

Amb referència als altres IACHÉ, s'ha demostrat que tant les huprines com el donepezil, compostos parentals de l'AVCRI104P3, presenten efectes neuroprotectors no directament relacionats amb la seva capacitat anticolinesteràsica. Les huprines, com ja s'ha dit, augmenten la viabilitat cel·lular enfront del peròxid d'hidrogen i redueixen l'excitotoxicitat del glutamat (Pera et al. 2013; Canudas et al. 2003), així com disminueixen els nivells del pèptid  $A\beta$ , incrementen els nivells de sinaptofisina (Hedberg et al. 2010) i milloren la cognició dels ratolins 3xTg-AD (Ratia et al. 2013). S'ha suggerit que tots aquests efectes són en part deguts a la seva capacitat d'activar directa i indirectament els receptors nicotínic (Roman et al. 2004). Quant al donepezil, s'ha demostrat que disminueix l'excitotoxicitat del glutamat (Takada et al. 2003), així com la mort neuronal per la privació de glucosa i d'oxigen (Akasofu et al. 2003), i que augmenta la viabilitat cel·lular en cèl·lules SH-SY5Y tractades amb el pèptid  $A\beta$  i l'àcid okadaic (Arias et al. 2005). En aquest cas, també s'ha descrit que aquests efectes depenen de l'estimulació dels receptors nicotínic  $\alpha 7$  que activen la via de la PI3K/Akt/Bcl2 (Arias et al. 2005).

L'activació de la via de l'Akt/GSK3 $\beta$  també va ser estudiada, essent la fosforilació de la GSK3 $\beta$  en la serina 9 per l'Akt el principal mecanisme d'inactivació d'aquesta proteïna. La GSK3 $\beta$  està implicada en la fosforilació de la tau entre d'altres processos proapoptòtics. En el present estudi es va observar un augment de la forma fosforilada o inactiva de la proteïna GSK3 $\beta$  (31%,  $p < 0.01$ ) en detriment de la no fosforilada o activa (17%,  $p < 0.01$ ) en l'hipocamp amb l'administració de l'anticolinesteràsic AVCRI104P3, reforçant la hipòtesi de la implicació de la via de la PI3K/Akt a través de l'estimulació dels receptors nicotínics  $\alpha 7$  com a principal mecanisme de neuroprotecció de l'anticolinesteràsic. A més, prèviament també s'ha comentat que l'HX augmenta de forma significativa la pGSK3 $\beta$  en l'hipocamp de ratolins 3xTg-AD (Ratia et al. 2013). Amb relació al donepezil, s'ha demostrat que el fet que activi la via de la PI3K/Akt també comporta un augment de l'expressió de la forma fosforilada de la GSK3 $\beta$  (Noh et al. 2013).

En determinar l'expressió de la sinaptofisina, una proteïna integral de la membrana de les vesícules sinàptiques, que com ja s'ha explicat està implicada en els mecanismes d'alliberació dels neurotransmissors, així com en la plasticitat sinàptica (Nie et al. 2012), es va observar que el tractament crònic amb l'AVCRI104P3 en disminuïa els nivells tant en l'hipocamp (21%,  $p < 0.01$ ) com en el còrtex (19%,  $p < 0.01$ ). Contràriament, estudis previs realitzats en el nostre departament havien demostrat que el tractament crònic amb l'anticolinesteràsic HX augmentava els nivells d'aquesta proteïna en ratolins 3xTg-AD de set mesos, plantejant un efecte neuroprotector del fàrmac en l'activitat sinàptica (Hedberg et al. 2010). Aquests resultats suggeririen diferències entre els perfils farmacològics dels diferents IChE.

La Cdk5 és una quinasa necessària per al desenvolupament del cervell implicada en els processos de maduració, migració i plasticitat neuronal (Jessberger et al. 2008). La desregulació d'aquest enzim s'ha relacionat amb diverses malalties neurodegeneratives tals com l'MA ja que es comporta com una tau-quinasa, indueix la formació de l'A $\beta$ , i contribueix a la disfunció sinàptica anterior a la mort neuronal (Qu et al. 2011). Tal com s'ha comentat

abans, la Cdk5, per tal d'activar-se, s'uneix als fragments neuroespecífics p35 i p39. En canvi, el metabòlit p25 procedent del trencament del factor p35 per la calpaïna, sobreactiva la Cdk5 i en provoca la seva desregulació (Kimura et al. 2014). En el present treball es va analitzar la relació p25/p35 com a marcador de disfunció i degeneració neuronal. A diferència del descrit per a altres IACHe com el donepezil (Wang et al. 2014), els resultats obtinguts van mostrar un augment significatiu de la proporció p25/p35 en l'hipocamp amb el tractament amb el fàrmac AVCRI104P3 (21%,  $p < 0.05$ ), però no van modificar-ne els nivells en el còrtex. Estudis previs han demostrat que ni la tacrina, ni la huperzina A, ni l'HY presenten efectes neuroprotectors davant del model d'apoptosi induïda per la colxicina, la qual provoca la sobreactivació de la Cdk5 en neurones granulars del cerebel (Jordá 2004). També hi ha autors que sostenen que la sobreestimulació dels receptors nicotínics  $\alpha 7$  enlloc de ser neuroprotectora, indueix un augment del calci intracel·lular i provoca l'activació de les vies dependents de calci com ara la de la calpaïna, que incrementa la p25, i la de la caspasa 3 (Garcia-Ratés et al. 2010).

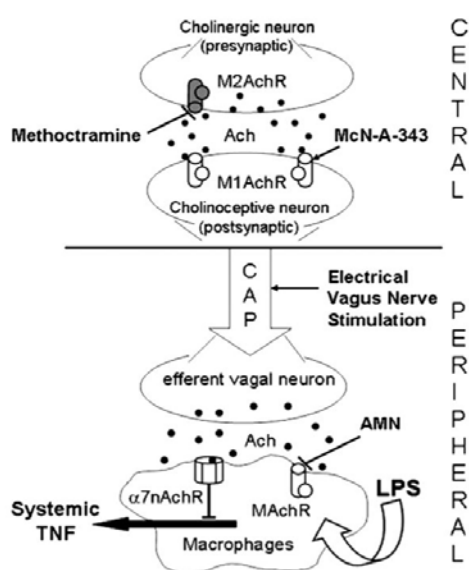
L'activitat de les caspases 3 i 7, proteases apoptòtiques, no es va veure modificada amb l'administració de l'anticolinesteràsic AVCRI104P3. En diversos estudis en els quals s'ha analitzat la relació entre els IACHe i les caspases s'han observat resultats contradictoris. Hi ha grups que demostren que el donepezil està implicat en l'activació d'aquestes proteases (Ki et al. 2010), mentre que d'altres obtenen que els IACHe huperzina A, galantamina i donepezil indueixen un efecte neuroprotector mitjançant la inhibició de les mateixes en diferents models experimentals (Xiao et al. 2002; Liu et al. 2010; Shen et al. 2010). Per altra banda, hi ha autors que qüestionen l'augment de l'activitat de la caspasa 3 amb l'edat. Pollack i cols. van demostrar que no hi havia diferències significatives en l'activitat de la caspasa 3 en el còrtex entre els ratolins de 6 i 24 mesos (Pollack et al. 2002). En aquest sentit, es podria suggerir que en el nostre model de ratolí de 12 mesos, l'activitat de la caspasa 3 no està prou alterada com per poder observar-se l'efecte del fàrmac.

L'envelliment del cervell s'associa a un cert nivell de neuroinflamació (Godbout & Johnson 2009; Sieber et al. 2011) i a una disminució de la neurogènesi (Rao et al. 2006). En aquestes condicions, la secreció de mediadors inflamatoris augmenta en el cervell, el que significa que la micròglia activada i els astròcits activats alliberen citocines i quimosines proinflamatòries que en excés i/o alliberades de forma crònica afavoreixen el procés de neurodegeneració i la mort neuronal (Sieber et al. 2011). En la neurogènesi, el declivi relacionat amb l'edat és conseqüència d'una reducció de la proliferació de les cèl·lules mare neurals, així com d'un retard en la maduració de les neurones acabades de néixer (Rao et al. 2006). En aquest estudi es va determinar si l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 atenuava l'expressió, relacionada amb l'edat, dels mediadors de la inflamació cerebral GFAP i Iba1, i promovia la neurogènesi en l'hipocamp. El tractament amb l'IChE no va modificar els nivells de GFAP, marcador d'astrogliosi, però en canvi, va disminuir fins a un 34% ( $p < 0.05$ ) els nivells d'Iba1, marcador de la micròglia activada. L'expressió de la DCX, marcador de neurogènesi, no es va veure modificada en l'hipocamp dels ratolins de 12 mesos. Les dades bibliogràfiques pel que fa a l'efecte d'altres anticolinesteràsics sobre aquests marcadors són força diverses. Així doncs, s'ha demostrat que el donepezil inhibeix l'activació dels astròcits induïda per oligòmers d'A $\beta_{42}$  en ratolins de 2 mesos (H. G. Kim et al. 2014; Meunier & Borjini 2014), i en canvi la huperzina A, a diferència de la tacrina, n'estimula l'activació en cultius corticals primaris de rates (Lunardi et al. 2013). Amb referència a la neurogènesi, s'ha observat que els tractaments amb huperzina A i donepezil estimulen la proliferació de les cèl·lules mare embrionàries tant en l'hipocamp de ratolí adult (2-3 mesos) com vell (24 mesos) (Ma et al. 2013; Itou et al. 2011). Pel que fa a la tacrina, hi ha autors que han demostrat que estimula la neurogènesi en la zona subventricular del cervell dels ratolins adults, però que no mostra cap efecte en el gir dentat (Jin et al. 2006).

L'efecte antiinflamatori que mostra l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 en disminuir la micròglia activada podria explicar-se, com ja s'ha suggerit en el cas de l'HX, tant per la inhibició de l'AChE com per la via colinèrgica antiinflamatòria, que implica l'activació dels receptors nicotínics  $\alpha 7$  i la

subsegüent inhibició del  $TNF\alpha$ , entre altres citocines proinflamatòries (Lutz et al. 2014). L'estimulació dels receptors nicotínics presents en la micròglia disminueix l'alliberament del  $TNF\alpha$  en inhibir les MAPKs p44/42 i p38 (Shytle et al. 2004). Altres autors proposen la implicació dels receptors muscarínics cerebrals ( $M_1$ ) en la regulació de la resposta immunitària a nivell central. Suggereixen que l'estimulació dels  $M_1$  inhibeix la producció del  $TNF\alpha$  i activa el nervi vague eferent amb la subsegüent alliberació de l'ACh i activació dels receptors nicotínics  $\alpha 7$  (Pavlov et al. 2009) (Fig.55).

□



**Fig.55 Regulació colinèrgica muscarínica central de la resposta inflamatòria sistèmica (mecanisme proposat).** L'alliberament del  $TNF$  és inhibit per la senyal colinèrgica derivada del nervi vague eferent. Aquesta via colinèrgica antiinflamatòria està mitjançada pels receptors nicotínics  $\alpha 7$  ( $\alpha 7nAChR$ ) en els macròfags. L'activació dels receptors muscarínics centrals  $M_1$  ( $M1AChR$ ) i la inhibició dels  $M_2$  activa el nervi vague eferent (Adaptat de Pavlov et al. 2006).

L'AVCRI104P3, per ser inhibidor de l'AChE augmenta la disponibilitat d'ACh i per tant de forma indirecta estimula tant els receptors nicotínics com muscarínics, igual que l'HX i el donepezil, que a més a més en són agonistes directes (Roman et al. 2004; Alcalá et al. 2005; Arias et al. 2005; Easton et al. 2013). No obstant, la dosi de donepezil utilitzada en ratolins C57BL/6 com a antiinflamatori és molt més elevada (10 mg/Kg) que la dosi d'AVCRI104P3 administrada (0,06  $\mu\text{mol/Kg}$  equival a 0,043 mg/Kg,  $PM=713,69$  g/mol) (Hwang et al. 2010).

Tenint en compte el model experimental en el que s'ha realitzat aquest estudi, ratolins de mitjana edat, cal destacar que l'AVCRI104P3 activa tota una sèrie de proteïnes implicades en els processos antiapoptòtics (PI3K/Akt/Bcl2-pGSK3 $\beta$ ), afavorint a més un efecte antiinflamatori en inhibir la micròglia activada, probablement associat a l'activació colinèrgica i a la inhibició de l'AChE. Curiosament, el descens en els nivells de sinaptofisina i l'augment de la p25, no estarien en la mateixa línia dels altres resultats obtinguts.

**Avaluació dels efectes produïts per l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 en ratolins triple transgènics (3xTg) per l'Alzheimer (PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>SWE</sub>, tau<sub>P301L</sub>) de 12 mesos.**

En aquest treball, finalment, s'ha estudiat la capacitat de l'AVCRI104P3 per modificar l'expressió de les proteïnes amb funcions neurotròfiques i neurotòxiques, relacionades amb els processos neurodegeneratius, en un model de ratolí 3xTg-AD per l'Alzheimer de 12 mesos. S'han determinat els marcadors bioquímics ja analitzats en els models anteriors, així com els nivells dels pèptids A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub>, específics de l'MA. Prèviament a l'anàlisi bioquímic dels efectes de l'anticolinesteràsic, igual que en el cas dels ratolins 126/Sv x C57BL/6 de 12 mesos, es van realitzar estudis de comportament per tal d'avaluar els canvis cognitius provocats pel fàrmac en relació amb l'aprenentatge i la memòria. En aquest cas, els resultats obtinguts també van demostrar que l'heterodímer AVCRI104P3 induïa millores cognitives i efectes ansiolítics en els ratolins 3xTg-AD.

Com en els casos anteriors, inicialment es van avaluar els nivells basals d'mRNA de les variants S i R de l'AChE, observant-se que els nivells d'mRNA-R eren un 41% inferiors ( $p < 0.05$ ) als d'mRNA-S. Berson i cols. descriuen que l'mRNA-R representa aproximadament un 7% de l'mRNA-S en l'hipocamp dels pacients adults no dement, i que tant amb l'edat com en l'MA disminueix la síntesi d'mRNA-S fins a un terç aproximadament dels nivells considerats control (adults no dement) (Berson et al. 2008). En el nostre cas, els nivells



d'mRNA-R obtinguts representen el 59% dels d'S, el que concordaria amb la disminució d'mRNA-S observada per Berson en els cervells dels pacients amb l'MA.

L'administració de l'AVCRI104P3 durant 21 dies en ratolins 3xTg-AD de 12 mesos va augmentar un 109% ( $p < 0.001$ ) els nivells d'mRNA-R, sense modificar els d'S. Com ja s'ha explicat anteriorment, les variants S i R de l'AChE, tot i presentar la mateixa capacitat catalítica, acostumen a desenvolupar funcions inverses relacionades amb els processos (anti)apoptòtics. Així, en la neuropatologia de l'MA, la isoforma S facilita la formació de les fibril·les amiloides i incrementa la toxicitat del pèptid A $\beta$  (Inestrosa et al. 1996; Rees et al. 2005; Alvarez et al. 1998) i en canvi, la isoforma R inhibeix l'agregació de les fibril·les i limita la toxicitat de la proteïna A $\beta$  (Berson et al. 2008; Alvarez et al. 1998). A més a més, s'ha observat una disminució dels nivells d'AChE-R en els pacients amb Alzheimer, així com una pèrdua selectiva també de la isoforma R en aquells malalts no tractats durant un any amb els IChE (rivastigmina), que es correlaciona amb una regressió en la millora cognitiva i del comportament observada prèviament (Berson et al. 2008; Darreh-Shori et al. 2004).

Tot això demostra que la disminució dels nivells de la isoforma R podria estar relacionada amb la progressió de l'MA, i que aquesta isoforma pot ser induïda per part d'alguns IChE com la rivastigmina, i en aquest estudi per part de l'AVCRI104P3, encara que se'n desconeixen els mecanismes. S'ha suggerit que en tractaments crònics amb els IChE, l'augment de l'ACh com a conseqüència de la inhibició de l'AChE provoca un increment de l'expressió de l'enzim per compensar l'excés d'ACh, i que en aquest context, determinats IChE indueixen de forma selectiva l'expressió de l'AChE-R (Dori et al. 2011). Hi ha autors que atribueixen aquest canvi cap a l'*splicing* de l'AChE-R a l'estimulació dels receptors muscarínics (Salmon et al. 2005).

Com ja s'ha explicat anteriorment, la variant R presenta funcions antiapoptòtiques i neuroprotectores, ja sigui en condicions d'estrès oxidatiu o

en front de neurotoxines com l'estaurosporina o l'MPTP (1-metil-4-fenil-1, 2, 2, 6-tetrahidropiridina), situacions en les quals també augmenta la seva expressió (Härtl et al. 2011; Li et al. 2012). També s'ha descrit que la variant R exerceix el seu efecte neuroprotector en incrementar l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl2 (Härtl et al. 2011; Li et al. 2013) i en interaccionar amb el receptor RACK1 (*receptor for activated C kinase 1*) i la PKC (Dori & Soreq 2006). De fet, en el present estudi, l'anticolinesteràsic AVCR1104P3 va augmentar els nivells d'mRNA-R i paral·lelament els de la Bcl2 (hipocamp, 69%; còrtex, 36%), que podrien justificar, des del punt de vista molecular, la millora cognitiva observada en els estudis previs de comportament.

Per altra banda, la sobreexpressió de l'AChE-S, a diferència de la isoforma R, està relacionada amb l'apoptosi dependent de les caspases (Toiber et al. 2008). En aquest cas, el tractament crònic amb l'anticolinesteràsic no va modificar ni els nivells d'mRNA-S, ni l'activitat de les caspases 3 i 7, el que podria correspondre a una correlació entre ambdues proteïnes apoptòtiques. També s'ha descrit, que en condicions proinflamatòries i prooxidatives pròpies de l'MA, es produeix l'activació de les calpaïnes, però no la de les caspases (Arnal et al. 2013). Pel que fa a les caspases, hi ha dades força disperses i fins i tot contradictòries en relació amb l'acció dels anticolinesteràsics sobre aquestes proteases. Hi ha autors que han demostrat que el donepezil indueix l'apoptosi en cèl·lules HL-60 activant la via de les caspases (Ki et al. 2010), i d'altres han observat que aquest mateix fàrmac inhibeix l'activació de la caspasa 3 en cèl·lules exposades a altes concentracions de glutamat (Shen et al. 2010). El fet d'obtenir diferents resultats en diferents models experimentals demostra que són les condicions d'aquests les que podrien determinar la resposta al fàrmac.

En el cas dels ratolins NTg s'ha descrit que el principal efecte neuroprotector de l'ACR1104P3 podria ser degut a l'estimulació dels receptors nicotínics  $\alpha 7$  que activen la via de supervivència de la PI3K/Akt, la qual indueix la síntesi de la Bcl2 i a més a més, és la principal via de fosforilació de la GSK3 $\beta$ , quinasa que intervé en la fisiopatologia de l'MA. En canvi, en els ratolins 3xTg-AD, el fàrmac

no modifica les formes fosforilades ni de l'Akt, ni de la GSK3 $\beta$ , el que suggereix que aquesta via podria no estar activada en aquestes condicions experimentals. S'ha demostrat que el pèptid A $\beta$  pot inhibir els receptors nicotínics (Wang et al. 2000), i per tant, que l'acumulació de la proteïna  $\beta$ -amiloide en els animals 3xTg-AD podria ser la causa de l'afectació d'aquesta via. D'altra banda, estudis previs realitzats en el nostre departament van demostrar que l'anticolinesteràsic HX i la huperzina A augmentaven els nivells d'expressió de la pGSK3 $\beta$  en l'hipocamp dels ratolins 3xTg-AD de 7 mesos d'edat (Ratia et al. 2013). El fet que els resultats no coincideixin, podria ser perquè en el present treball els ratolins avaluats tenien 12 mesos d'edat, mentre que en l'estudi amb l'HX i la huperzina A aquests eren de 7 mesos. Amb 12 mesos els nivells del pèptid A $\beta$  són molt més elevats que amb 7, i l'estat de la malaltia està molt més avançat, el que podria limitar l'efecte del fàrmac.

Per avaluar si l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 provocava una millora en la densitat sinàptica, tal i com s'havia observat després del tractament crònic amb l'HX en el còrtex dels ratolins 3xTg-AD de 7 mesos d'edat (Hedberg et al. 2010), es va determinar l'expressió del marcador de sinapsis sinaptofisina tant en l'hipocamp com en el còrtex dels ratolins 3xTg-AD. A diferència dels ratolins no transgènics de 12 mesos, en els quals es va observar una disminució d'aquest marcador sinàptic, l'AVCRI104P3 no va modificar els nivells de sinaptofisina.

En determinar la relació p25/p35, la qual s'utilitza per avaluar la disfunció i la degeneració neuronal en ser indicativa del grau de sobreactivació de la Cdk5, es va observar un augment significatiu del factor p25 respecte al p35 en ambdues regions cerebrals després de l'administració de l'anticolinesteràsic (un 78%  $p < 0.01$  en l'hipocamp i un 38%  $p < 0.001$  en el còrtex). S'ha explicat que en la neuropatogènia de l'MA hi ha implicada la desregulació de la Cdk5, donat que un excés dels nivells del complex Cdk5-p25 no només provoca la formació de les plaques amiloides, sinó que també hiperfosforila la proteïna tau (Shukla et al. 2012). En el nostre cas, el compost AVCRI104P3 va incrementar

l'expressió del complex Cdk5-p25. En aquest sentit, els resultats obtinguts són consistents amb els observats en els ratolins no transgènics també de 12 mesos, resposta que aniria en sentit contrari a les respostes cognitives observades en les proves de comportament en aquests mateixos ratolins. En el cas del donepezil s'ha descrit que disminueix l'activació de la via calpaïna/Cdk5-p25, segons la qual l'excés de calci intracel·lular activaria la calpaïna que afavoreix la formació del factor p25 (Wang et al. 2014), mentre que altres dades demostren que ni la tacrina, ni la huperzina A ni l'HY modifiquen els nivells de Cdk5 en el model d'apoptosi induïda per la colxicina (Jordá 2004).

La inflamació és un dels esdeveniments principals en l'MA i s'associa amb la disfunció progressiva i la pèrdua de neurones, així com amb el deteriorament de la neurogènesi (Molina-Holgado & Molina-Holgado 2010). L'acumulació dels pèptids A $\beta$  presents en els cervells amb Alzheimer provoca una resposta inflamatòria crònica, que es posa de manifest amb l'augment dels astròcits i la micròglia activada, entre altres (Fuster-Matanzo et al. 2013). A més a més, s'ha suggerit que l'acumulació del pèptid A $\beta$  pot causar desequilibris en la senyalització colinèrgica, així com alterar la migració, proliferació i diferenciació neuronal (Wicklund et al. 2010). A la vegada, s'ha proposat que l'estimulació de les vies colinèrgiques té efectes antiinflamatoris, ja que l'ACh inhibeix l'alliberament de citoquines a través de l'estimulació dels receptors nicotínics  $\alpha 7$  presents en la micròglia (Czura & Tracey 2005), al igual que en el cas dels ratolins no transgènics.

L'AVCRI104P3 va disminuir de forma significativa (23%,  $p < 0.05$ ) els nivells de la micròglia activada (Iba1) suggerint de nou un possible efecte antiinflamatori per part del fàrmac. Pel que fa a la neurogènesi, l'anticolinesteràsic també en aquest cas, no va modificar de forma significativa l'expressió de la DCX, tot i que va mostrar una certa tendència a augmentar-ne els nivells.

Amb relació als nivells de la proteïna A $\beta$ , es va observar que la forma insoluble era molt més elevada en el còrtex que en l'hipocamp. Els dipòsits d'A $\beta$  s'inicien

en regions corticals i, cap als sis mesos d'edat, els ratolins ja presenten una gran acumulació de plaques amiloidogèniques insolubles (Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al. 2003). En determinar l'efecte de l'anticolinesteràsic AVCRI104P3 sobre els nivells d' $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$  tant en l'hipocamp com en el còrtex dels ratolins 3xTg-AD, els resultats van demostrar que l'AVCRI104P3 és capaç de reduir significativament els nivells d' $A\beta_{40}$  soluble en l'hipocamp (37%,  $p < 0.05$ ), no observant-se canvis ni en els nivells d' $A\beta_{40}$  insoluble ni els nivells d' $A\beta_{42}$ , probablement a causa de la naturalesa més fibril·logènica de l' $A\beta_{42}$  en comparació amb la de l' $A\beta_{40}$  (Harper et al. 1997). En efecte, estudis previs van mostrar que el tractament crònic amb l'HX en ratolins 3xTg-AD reduïa els nivells del pèptid  $A\beta_{40}$  insoluble en l'hipocamp, i es va suggerir que això podria ser degut tant a la potenciació de la via no amiloidogènica de l'APP a través del receptors nicotínics i muscarínics, com a la inhibició del lloc perifèric de l'ACH<sub>E</sub>, que en interaccionar amb el pèptid amiloide n'indueix l'agregació (Hedberg et al. 2010). També s'ha demostrat que el donepezil disminueix l' $A\beta_{42}$  soluble i insoluble en ratolins 2xTg-AD (hAPP i hPS1), i encara que els mecanismes exactes són desconeguts, s'ha suggerit que podria ser degut a l'estimulació dels receptors muscarínics  $M_1$  i que a més podria augmentar l'aclariment del pèptid  $A\beta$  (Easton et al. 2013; Caccamo et al. 2006). En el nostre cas, tot i que no disposem de dades referents a la interacció de l'AVCRI104P3 sobre els receptors muscarínics de forma directa, si que s'ha demostrat que l'AVCRI104P3 inhibeix l'agregació del pèptid  $A\beta$  induïda per l'ACH<sub>E</sub> a través de la seva interacció amb el lloc perifèric de l'enzim, i potencia la via no amiloidogènica de l'APP en inhibir la BACE, el que posa de manifest possibles vies diferents d'actuació del fàrmac (Viayna et al. 2010).

Per tant, els estudis bioquímics realitzats en aquest model experimental, suggereixen que l'AVCRI104P3 presenta efectes antiapoptòtics relacionats amb la sobreexpressió de l'ACH<sub>E</sub>-R i l'increment dels nivells de Bcl2, tot i que així mateix augmenta el factor proapoptòtic p25 que desregula la Cdk5. L'anticolinesteràsic també mostra efectes antiinflamatoris en disminuir l'activació de la micròglia activada (Iba1), i d'altra banda, s'ha vist que disminueix els nivells d' $A\beta_{40}$  soluble en l'hipocamp. Tots aquests factors,

suggereixen que l'AVCRI104P3 podria ser considerat un fàrmac potencial pel tractament de l'MA així com també per altres malalties neurodegeneratives.

## **CONCLUSIONS**





Dels resultats obtinguts en el present treball, es conclou que:

1. En el model *in vitro* de cèl·lules de neuroblastoma humà (SH-SY5Y) transfectades amb les isoformes S i R de l'AChE, s'observa que tots els anticolinesteràsics estudiats modifiquen la síntesi de l'mRNA d'ambdues variants seguint un patró d'actuació diferent. Així, la resposta de l'mRNA-S i R als diferents inhibidors no depèn del mecanisme d'acció d'aquests compostos (inhibidors de l'AChE), sinó que depèn d'altres característiques inherents al propi compost.
2. En el model *in/ex vivo* de neurotoxicitat amb el KA, l'HX no incrementa les convulsions induïdes pel neurotòxic, a diferència del que s'ha descrit per a altres IChE. A més, protegeix d'alguns dels efectes nocius observats amb l'administració del KA en incrementar la sinaptofisina i el factor p35 (Cdk5) en l'hipocamp, accions relacionades amb la neuroplasticitat. L'HX també presenta un efecte antiinflamatori en disminuir l'activació de la micròglia. Tots aquests resultats, juntament amb els obtinguts prèviament en el nostre departament, suggereixen que l'HX té un perfil farmacològic amb potencial interès per al tractament de diferents malalties neurodegeneratives.
3. En el model *ex vivo* de ratolins de mitjana edat, on en estudis previs s'havia observat una millora en els processos d'aprenentatge i memòria, s'ha vist que l'anticolinesteràsic d'acció dual AVCRI104P3 activa tota una sèrie de proteïnes implicades en els processos antiapoptòtics (PI3K/Akt-Bcl2-pGSK3 $\beta$ ), afavorint a més un efecte antiinflamatori en inhibir la micròglia activada, probablement associat a l'activació colinèrgica i a la inhibició de l'AChE. Curiosament, el descens en els nivells de sinaptofisina i l'augment de la p25 no estarien en la mateixa línia dels altres resultats obtinguts.
4. Amb relació als efectes de l'AVCRI104P3 en el model *ex vivo* de ratolins 3xTg-AD, on també es van obtenir millores en els processos cognitius analitzats prèviament, s'ha observat que el fàrmac indueix l'expressió

d'algunes molècules relacionades amb els processos antiapoptòtics tals com l'AChE-R i la Bcl2. En canvi, augmenta el factor proapoptòtic p25 que desregula la Cdk5. L'anticolinesteràsic també mostra efectes antiinflamatoris en disminuir l'activació de la micròglia (Iba1), i d'altra banda, s'ha vist que disminueix els nivells d'A $\beta$ <sub>40</sub> soluble en l'hipocamp. Tots aquests factors, suggereixen que l'AVCRI104P3 podria ser considerat un fàrmac potencial per al tractament de l'MA, així com també per al d'altres malalties neurodegeneratives.

## **BIBLIOGRAFIA**



- Aimone, J.B. et al., 2014. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev*, 94, pp.991–1026.
- Akaike, A. et al., 2010. Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of alpha4 and alpha7 receptors in neuroprotection. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 40(1-2), pp.211–6.
- Akasofu, S. et al., 2008. Donepezil attenuates excitotoxic damage induced by membrane depolarization of cortical neurons exposed to veratridine. *European journal of pharmacology*, 588(2-3), pp.189–97.
- Akasofu, S. et al., 2003. Protective effect of donepezil in a primary culture of rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *European journal of pharmacology*, 472(1-2), pp.57–63.
- Alagiakrishnan, K. et al., 2013. Antidiabetic drugs and their potential role in treating mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Discovery medicine*, 16(90), pp.277–86.
- Alcalá, M.M. et al., 2005. Effects of (+/-)-huprine Y and (+/-)-huprine Z, two new anticholinesterasic drugs, on muscarinic receptors. *Neuroscience letters*, 379(2), pp.106–9.
- Aliev, G. et al., 2014. Oxidative Stress Mediated Mitochondrial and Vascular Lesions as Markers in the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *Current medicinal chemistry*, 21(19), pp.2208–17.
- Alkalay, A. et al., 2013. Plasma acetylcholinesterase activity correlates with intracerebral  $\beta$ -amyloid load. *Current Alzheimer research*, 10(1), pp.48–56.
- Altomare, D.A. & Khaled, A.R., 2012. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. *Current medicinal chemistry*, 19(22), pp.3748–62.
- Alvarez, A. et al., 1998. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), pp.3213–23.
- Anand, P. & Singh, B., 2013. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of pharmacal research*, 36(4), pp.375–99.
- Anselmet, A. et al., 1994. Evolution of acetylcholinesterase transcripts and molecular forms during development in the central nervous system of the quail. *Journal of neurochemistry*, 62(6), pp.2158–65.

- Araújo, I.M. et al., 2008. Calpain activation is involved in early caspase-independent neurodegeneration in the hippocampus following status epilepticus. *Journal of neurochemistry*, 105(3), pp.666–76.
- Arias, E. et al., 2005. Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 315(3), pp.1346–53.
- Arkhipov, V., Kuleskaja, N. & Lebedev, D., 2008. Behavioral perseveration and impairment of long-term memory in rats after intrahippocampal injection of kainic acid in subconvulsive dose. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 88(3), pp.299–305.
- Arnal, N. et al., 2013. Role of copper and cholesterol association in the neurodegenerative process. *International journal of Alzheimer's disease*, 2013, p.414817.
- Asle-Rousta, M. et al., 2013. FTY720 (fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (A $\beta$ 42)-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 50(3), pp.524–32.
- Avila, J., Wandosell, F. & Hernández, F., 2010. Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease pathogenesis and glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Expert review of neurotherapeutics*, 10(5), pp.703–10.
- Badia, A. et al., 1998. Synthesis and evaluation of tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 6(4), pp.427–40.
- Balleza-Tapia, H. & Peña, F., 2009. Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 9(6), pp.724–40.
- Bartolini, M. et al., 2003. Beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochemical pharmacology*, 65(3), pp.407–16.
- Belcastro, V. et al., 2007. Levetiracetam monotherapy in Alzheimer patients with late-onset seizures: a prospective observational study. *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, 14(10), pp.1176–8.
- Belli, M., Ramazzotti, M. & Chiti, F., 2011. Prediction of amyloid aggregation in vivo. *EMBO reports*, 12(7), pp.657–63.
- Bello, O. et al., 2013. Is memantine a potential therapeutic for Rett syndrome?. *Frontiers in neuroscience*, 7, p.245.

- Belluti, F. et al., 2013. Small-molecule inhibitors/modulators of amyloid- $\beta$  peptide aggregation and toxicity for the treatment of Alzheimer's disease: a patent review (2010 - 2012). *Expert opinion on therapeutic patents*, 23(5), pp.581–96.
- Ben-Ari, S. et al., 2006. Modulated splicing-associated gene expression in P19 cells expressing distinct acetylcholinesterase splice variants. *Journal of neurochemistry*, 97 Suppl 1, pp.24–34.
- Ben-Ari, Y., 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 14(2), pp.375–403.
- Bennett, J.C. et al., 2006. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiology of learning and memory*, 85(2), pp.139–52.
- Von Bernhardi, R. et al., 2003. Acetylcholinesterase induces the expression of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in glia and activates glial cells in culture. *Neurobiology of Disease*, 14(3), pp.447–457.
- Berson, A. et al., 2008. Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain : a journal of neurology*, 131(Pt 1), pp.109–19.
- Birnboim, H.C. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), pp.1513–23.
- Blennow, K. & Zetterberg, H., 2009. Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 18(2), pp.413–7.
- Boehme, M. et al., 2014. Impact of indomethacin on neuroinflammation and hippocampal neurogenesis in aged mice. *Neuroscience letters*, 572, pp.7–12.
- Bolognesi, M.L. et al., 2007. Multi-Target-Directed Drug Design Strategy: From a Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitor to a Trifunctional Compound against Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(26), pp.6446–6449.
- Bond, C.E., Zimmermann, M. & Greenfield, S. a, 2009. Upregulation of alpha7 Nicotinic Receptors by Acetylcholinesterase C-Terminal Peptides. *PLoS one*, 4(3), p.e4846.
- Borchelt, D.R. et al., 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A $\beta$ 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, 17(5), pp.1005–13.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–54.
- Braun, A. et al., 2009. Selective regulation of growth factor expression in cultured cortical astrocytes by neuro-pathological toxins. *Neurochemistry international*, 55(7), pp.610–8.
- Brentnall, M. et al., 2013. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology*, 14, p.32.
- Caccamo, A. et al., 2006. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron*, 49(5), pp.671–82.
- Cai, Z., Hussain, M.D. & Yan, L.-J., 2013. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *The International journal of neuroscience*.
- Camps, P. et al., 2000. New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of medicinal chemistry*, 43(24), pp.4657–66.
- Camps, P. et al., 2008. Novel donepezil-based inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation. *Journal of medicinal chemistry*, 51(12), pp.3588–98.
- Camps, P. et al., 2009. Pyrano[3,2-c]quinoline-6-chlorotacrine hybrids as a novel family of acetylcholinesterase- and beta-amyloid-directed anti-Alzheimer compounds. *Journal of medicinal chemistry*, 52(17), pp.5365–79.
- Camps, P. et al., 2005. Synthesis and pharmacological evaluation of huprine-tacrine heterodimers: subnanomolar dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 48(6), pp.1701–4.
- Canudas, A.M. et al., 2003. Neuroprotective effects of (+/-)-huprine Y on in vitro and in vivo models of excitotoxicity damage. *Experimental neurology*, 180(2), pp.123–30.
- Cavalli, A. et al., 2008. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *Journal of medicinal chemistry*, 51(3), pp.347–72.
- Cavallini, A. et al., 2013. An unbiased approach to identifying tau kinases that phosphorylate tau at sites associated with Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*, 288(32), pp.23331–47.



- Chan, C.B. & Ye, K., 2012. Phosphoinositide 3-kinase enhancer (PIKE) in the brain: is it simply a phosphoinositide 3-kinase/Akt enhancer?. *Reviews in the neurosciences*, 23(2), pp.153–61.
- Chen, Z. & Zhong, C., 2013. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progress in neurobiology*, 108, pp.21–43.
- Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1(8), pp.623–34.
- Cirilo, A.D., Llombart, C.M. & Tamargo, J.J., 2003. *Introducción a la química terapéutica*, Ediciones Díaz de Santos.
- Clavaguera, F., Grueninger, F. & Tolnay, M., 2014. Intercellular transfer of tau aggregates and spreading of tau pathology: Implications for therapeutic strategies. *Neuropharmacology*, 76 Pt A, pp.9–15.
- Coleman, B.R. et al., 2008. [+]Huperzine A treatment protects against N-methyl-D-aspartate-induced seizure/status epilepticus in rats. *Chemico-biological interactions*, 175(1-3), pp.387–95.
- Conejero-Goldberg, C., Davies, P. & Ulloa, L., 2008. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor: a link between inflammation and neurodegeneration. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 32(4), pp.693–706.
- Corsale, C. et al., 2012. Entrapment of A $\beta$ (1-40) peptide in unstructured aggregates. *Journal of physics. Condensed matter: an Institute of Physics journal*, 24(24), p.244103.
- Crespo-Biel, N. et al., 2007. Kainate induces AKT, ERK and cdk5/GSK3beta pathway deregulation, phosphorylates tau protein in mouse hippocampus. *Neurochemistry international*, 50(2), pp.435–42.
- Cruts, M., Theuns, J. & Van Broeckhoven, C., 2012. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Human mutation*, 33(9), pp.1340–4.
- Cui, W. et al., 2013. Bis(12)-hupyridone, a novel acetylcholinesterase inhibitor, protects against glutamate-induced neuronal excitotoxicity via activating  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor/phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade. *Chemico-biological interactions*, 203(1), pp.365–70.
- Cunningham, C., 2013. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*, 61(1), pp.71–90.
- Czura, C.J. & Tracey, K.J., 2005. Autonomic neural regulation of immunity. *Journal of internal medicine*, 257(2), pp.156–66.

- D'Mello, S.R. & Chin, P.C., 2005. Treating neurodegenerative conditions through the understanding of neuronal apoptosis. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, 4(1), pp.3–23.
- Darreh-Shori, T. et al., 2004. Long-lasting acetylcholinesterase splice variations in anticholinesterase-treated Alzheimer's disease patients. *Journal of neurochemistry*, 88(5), pp.1102–13.
- Darstein, M. et al., 2003. Distribution of kainate receptor subunits at hippocampal mossy fiber synapses. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(22), pp.8013–9.
- Das, A., Dikshit, M. & Nath, C., 2001. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sciences*, 68(6041), pp.1545–1555.
- Davie, B.J., Christopoulos, A. & Scammells, P.J., 2013. Development of M1 mAChR allosteric and bitopic ligands: prospective therapeutics for the treatment of cognitive deficits. *ACS chemical neuroscience*, 4(7), pp.1026–48.
- Davis, A.A. et al., 2010. Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(12), pp.4190–6.
- Del'Guidice, T. & Beaulieu, J.-M., 2010. [Psychotropic drugs and the involvement of the Akt/GSK3 signalling pathway in mental illnesses]. *Médecine sciences: M/S*, 26(6-7), pp.647–51.
- Deutsch, V.R. et al., 2002. The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Experimental hematology*, 30(10), pp.1153–61.
- Dinamarca, M.C. et al., 2010. Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the Aβ peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 5, p.4.
- Ding, M., Haglid, K.G. & Hamberger, A., 2000. Quantitative immunochemistry on neuronal loss, reactive gliosis and BBB damage in cortex/striatum and hippocampus/amygdala after systemic kainic acid administration. *Neurochemistry international*, 36(4-5), pp.313–8.
- Doi, Y. et al., 2013. Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid β-induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PloS one*, 8(4), p.e61988.

- Dori, a et al., 2011. Acetylcholinesterase inhibitor pretreatment alters stress-induced expression of acetylcholinesterase transcripts in the mouse brain. *Neuroscience*, 183, pp.90–8.
- Dori, A. & Soreq, H., 2006. ARP, the cleavable C-terminal peptide of “readthrough” acetylcholinesterase, promotes neuronal development and plasticity. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 28(3), pp.247–55.
- Dumas, J.A. & Newhouse, P.A., 2011. The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional compensation. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 99(2), pp.254–61.
- Easton, A. et al., 2013. Effects of sub-chronic donepezil on brain Abeta and cognition in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Psychopharmacology*, 230(2), pp.279–89.
- Enciu, A.-M. & Popescu, B.O., 2013. Is there a causal link between inflammation and dementia?. *BioMed research international*, 2013, p.316495.
- Epis, R. et al., 2012. Alpha, beta-and gamma-secretases in Alzheimer’s disease. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 4, pp.1126–50.
- Evans, D.A., Morris, M.C. & Rajan, K.B., 2014. Vitamin E, memantine, and Alzheimer disease. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 311(1), pp.29–30.
- Favaloro, B. et al., 2012. Role of apoptosis in disease. *Aging*, 4(5), pp.330–49.
- De Ferrari, G. V et al., 2001. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry*, 40(35), pp.10447–57.
- Fisher, A., 2012. Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer’s disease. *Journal of neurochemistry*, 120 Suppl., pp.22–33.
- Fisher, R.S. et al., 2001. A pilot study of donepezil for memory problems in epilepsy. *Epilepsy & behavior: E&B*, 2(4), pp.330–4.
- Forder, J.P. & Tymianski, M., 2009. Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules. *Neuroscience*, 158(1), pp.293–300.
- Freyberg, Z., Ferrando, S.J. & Javitch, J.A., 2010. Roles of the Akt/GSK-3 and Wnt signaling pathways in schizophrenia and antipsychotic drug action. *The American journal of psychiatry*, 167(4), pp.388–96.

- Fuster-Matanzo, A. et al., 2013. Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators of inflammation*, 2013, p.260925.
- Galdeano, C., 2012. *Disseny, síntesi, avaluació farmacològica i modelatge molecular de nous inhibidors de l'acetilcolinesterasa de lloc d'unió dual. Tesi Doctoral.*
- Galdeano, C. et al., 2012. Huprine-tacrine heterodimers as anti-amyloidogenic compounds of potential interest against Alzheimer's and prion diseases. *Journal of medicinal chemistry*, 55(2), pp.661–9.
- Galdeano, C. et al., 2010. Structural determinants of the multifunctional profile of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors as anti-Alzheimer agents. *Current pharmaceutical design*, 16(25), pp.2818–36.
- Games, D. et al., 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373(6514), pp.523–7.
- Garcia-Ratés, S. et al., 2010. The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on nicotinic receptors: Intracellular calcium increase, calpain/caspase 3 activation, and functional upregulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 244, pp.344–353.
- Geula, C. & Mesulam, M., 1989. Special properties of cholinesterases in the cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain research*, 498(1), pp.185–9.
- Ghezzi, L., Scarpini, E. & Galimberti, D., 2013. Disease-modifying drugs in Alzheimer's disease. *Drug design, development and therapy*, 7, pp.1471–1479.
- Gilboa-Geffen, A., Hartmann, G. & Soreq, H., 2012. Stressing hematopoiesis and immunity: an acetylcholinesterase window into nervous and immune system interactions. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5(March), p.30.
- Giménez-Llort, L. et al., 2015. AVCRI104P3, a novel multitarget compound with cognition-enhancing and anxiolytic activities: Studies in cognitively poor middle-aged mice. *Behavioural brain research*, Accepted M.
- Godbout, J.P. & Johnson, R.W., 2009. Age and neuroinflammation: a lifetime of psychoneuroimmune consequences. *Immunology and allergy clinics of North America*, 29(2), pp.321–37.
- Golde, T.E. et al., 2013.  $\gamma$ -Secretase inhibitors and modulators. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(12), pp.2898–907.
- Goodenough, S. et al., 2004. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  protects against kainic acid-induced neurotoxicity in vivo. *Brain research*, 1026(1), pp.116–25.

- Gordon, S.L. & Cousin, M.A., 2013. The Sybtraps: Control of Synaptobrevin Traffic by Synaptophysin,  $\alpha$ -Synuclein and AP-180. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*.
- Greenberg, D.S. et al., 2010. Acetylcholinesterase variants in Alzheimer's disease: from neuroprotection to programmed cell death. *Neurodegenerative diseases*, 7(1-3), pp.60–3.
- Greenblatt, H.M. et al., 1999. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS letters*, 463(3), pp.321–6.
- Greenfield, S.A. et al., 2004. A novel peptide modulates  $\alpha 7$  nicotinic receptor responses: implications for a possible trophic-toxic mechanism within the brain. *Journal of neurochemistry*, 90(2), pp.325–31.
- Greenfield, S.A. et al., 1983. Origin of various enzymes released from the substantia nigra and caudate nucleus: effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigro-striatal pathway. *The Journal of comparative neurology*, 214(1), pp.87–92.
- Greenfield, S.A., Zimmermann, M. & Bond, C.E., 2008. Non-hydrolytic functions of acetylcholinesterase. The significance of C-terminal peptides. *The FEBS journal*, 275(4), pp.604–11.
- Greig, N.H., Reale, M. & Tata, A.M., 2013. New pharmacological approaches to the cholinergic system: an overview on muscarinic receptor ligands and cholinesterase inhibitors. *Recent patents on CNS drug discovery*, 8(2), pp.123–41.
- Guan, Z., 2008. Cross-talk between oxidative stress and modifications of cholinergic and glutaminergic receptors in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta pharmacologica Sinica*, 29(7), pp.773–80.
- Gutowski, M. & Kowalczyk, S., 2013. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta biochimica Polonica*, 60(1), pp.1–16.
- Haass, C. et al., 1995. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature medicine*, 1(12), pp.1291–6.
- Hård, T., 2011. Protein engineering to stabilize soluble amyloid  $\beta$  -protein aggregates for structural and functional studies. *The FEBS journal*, 278(20), pp.3884–92.
- Hardy, J. & Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), pp.353–6.

- Harel, M. et al., 1993. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(19), pp.9031–5.
- Harper, J.D., Lieber, C.M. & Lansbury, P.T., 1997. Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein. *Chemistry & biology*, 4(12), pp.951–9.
- Härtl, R., Gleinich, A. & Zimmermann, M., 2011. Dramatic increase in readthrough acetylcholinesterase in a cellular model of oxidative stress. *Journal of neurochemistry*, 116(6), pp.1088–96.
- Hashiguchi, M. et al., 2002. Truncation of CDK5 activator p35 induces intensive phosphorylation of Ser202/Thr205 of human tau. *The Journal of biological chemistry*, 277(46), pp.44525–30.
- Hashimoto, M. et al., 2005. Does donepezil treatment slow the progression of hippocampal atrophy in patients with Alzheimer's disease? *The American journal of psychiatry*, 162(4), pp.676–82.
- Hawkes, C.A. & McLaurin, J., 2009. Selective targeting of perivascular macrophages for clearance of beta-amyloid in cerebral amyloid angiopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), pp.1261–6.
- Hedberg, M.M. et al., 2010. Effect of huprine X on  $\beta$ -amyloid, synaptophysin and  $\alpha 7$  neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the brain of 3xTg-AD and APP<sup>swe</sup> transgenic mice. *Neuro-degenerative diseases*, 7(6), pp.379–88.
- Henshall, D.C., Chen, J. & Simon, R.P., 2000. Involvement of caspase-3-like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures. *Journal of neurochemistry*, 74(3), pp.1215–23.
- Hernandez, F., Lucas, J.J. & Avila, J., 2013. GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 33 Suppl 1, pp.S141–4.
- Herrup, K., 2010. Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(50), pp.16755–62.
- Hicks, D.A. et al., 2013. The amyloid precursor protein represses expression of acetylcholinesterase in neuronal cell lines. *The Journal of biological chemistry*, 288(36), pp.26039–51.
- Holcomb, L. et al., 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature medicine*, 4(1), pp.97–100.

- Holsinger, R.M.D. et al., 2013. Splice variants of the Alzheimer's disease beta-secretase, BACE1. *Neurogenetics*, 14(1), pp.1–9.
- Hoshi, M. et al., 1996. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(7), pp.2719–23.
- Huang, Z.-H. et al., 2012. Donepezil protects endothelial cells against hydrogen peroxide-induced cell injury. *CNS neuroscience & therapeutics*, 18(2), pp.185–7.
- Hunter, S., Arendt, T. & Brayne, C., 2013. The Senescence Hypothesis of Disease Progression in Alzheimer Disease: an Integrated Matrix of Disease Pathways for FAD and SAD. *Molecular neurobiology*.
- Hwang, J. et al., 2010. Microglia signaling as a target of donepezil. *Neuropharmacology*, 58(7), pp.1122–9.
- Inestrosa, N.C. et al., 1996. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, 16(4), pp.881–91.
- Inestrosa, N.C. & Alarcón, R., 1998. Molecular interactions of acetylcholinesterase with senile plaques. *Journal of physiology, Paris*, 92(5-6), pp.341–4.
- Inestrosa, N.C., Dinamarca, M.C. & Alvarez, A., 2008. Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. *The FEBS journal*, 275(4), pp.625–32.
- Inestrosa, N.C., Sagal, J.P. & Colombres, M., 2005. Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid beta. *Sub-cellular biochemistry*, 38, pp.299–317.
- Itou, Y. et al., 2011. Cholinergic activation of hippocampal neural stem cells in aged dentate gyrus. *Hippocampus*, 21, pp.446–459.
- Jameson, R.R., Seidler, F.J. & Slotkin, T.A., 2007. Nonenzymatic functions of acetylcholinesterase splice variants in the developmental neurotoxicity of organophosphates: chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and diazinon. *Environmental health perspectives*, 115(1), pp.65–70.
- Janson, J. et al., 2013. Population PKPD Modeling of BACE1 Inhibitor-Induced Reduction in A $\beta$  Levels In Vivo and Correlation to In Vitro Potency in Primary Cortical Neurons from Mouse and Guinea Pig. *Pharmaceutical research*.

- Jarrett, J.T., Berger, E.P. & Lansbury, P.T., 1993. The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 695, pp.144–8.
- Jean, L. et al., 2008. Structural elements regulating amyloidogenesis: a cholinesterase model system. *PLoS one*, 3(3), p.e1834.
- Jellinger, K.A., 2013. The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations. *International review of neurobiology*, 110, pp.1–47.
- Jessberger, S. et al., 2008. Cdk5 regulates accurate maturation of newborn granule cells in the adult hippocampus. *PLoS biology*, 6(11), p.e272.
- Jin, K. et al., 2006. Alzheimer's disease drugs promote neurogenesis. *Brain Research*, 1085, pp.183–188.
- Jing, P. et al., 2013. Lithium treatment induces proteasomal degradation of over-expressed acetylcholinesterase (AChE-S) and inhibit GSK3 $\beta$ . *Chemico-biological interactions*, 203(1), pp.309–13.
- Johnson, G. & Moore, S.W., 2007. Acetylcholinesterase readthrough peptide shares sequence similarity to the 28-53 peptide sequence of the acetylcholinesterase adhesion-mediating site and competes for ligand binding in vitro. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 31(2), pp.113–26.
- Jordá, E.G., 2004. (+)-huprine Y, (-)-huperzine A and tacrine do not show neuroprotective properties in an apoptotic model of neuronal cytoskeletal alteration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 6, pp.577–583.
- Jurisch-Yaksi, N., Sannerud, R. & Annaert, W., 2013. A fast growing spectrum of biological functions of  $\gamma$ -secretase in development and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(12), pp.2815–27.
- Kalappa, B.I. et al., 2013. A positive allosteric modulator of  $\alpha 7$  nAChRs augments neuroprotective effects of endogenous nicotinic agonists in cerebral ischaemia. *British journal of pharmacology*, 169(8), pp.1862–78.
- Kawauchi, T., Shikanai, M. & Kosodo, Y., 2013. Extra-cell cycle regulatory functions of cyclin-dependent kinases (CDK) and CDK inhibitor proteins contribute to brain development and neurological disorders. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 18(3), pp.176–94.
- Kelleher, R.J. & Soiza, R.L., 2013. Evidence of endothelial dysfunction in the development of Alzheimer's disease: Is Alzheimer's a vascular disorder?. *American journal of cardiovascular disease*, 3(4), pp.197–226.
- Kempermann, G., Krebs, J. & Fabel, K., 2008. The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. *Current opinion in psychiatry*, 21(3), pp.290–5.



- Ki, Y.S. et al., 2010. Donepezil, a potent acetylcholinesterase inhibitor, induces caspase-dependent apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 33(6), pp.1054–9.
- Kihara, T. et al., 2001. Alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *The Journal of biological chemistry*, 276(17), pp.13541–6.
- Kim, A.H. et al., 2001. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology*, 21(3), pp.893–901.
- Kim, H.G. et al., 2014. Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation in vitro and in vivo. *NeuroToxicology*, 40, pp.23–32.
- Kim, Y.S. et al., 2014. Decreased interaction between FoxO3a and Akt correlates with seizure-induced neuronal death. *Epilepsy research*, 108(3), pp.367–78.
- Kimura, T., Ishiguro, K. & Hisanaga, S.-I., 2014. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Frontiers in molecular neuroscience*, 7, p.65.
- Kita, Y. et al., 2014. Galantamine promotes adult hippocampal neurogenesis via M1 muscarinic and  $\alpha 7$  nicotinic receptors in mice. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 17(12), pp.1957–68.
- Klein, T. & Bischoff, R., 2011. Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. *Journal of proteome research*, 10(1), pp.17–33.
- Kohman, R.A. & Rhodes, J.S., 2013. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain, behavior, and immunity*, 27(1), pp.22–32.
- Kondratyev, A. & Gale, K., 2000. Intracerebral injection of caspase-3 inhibitor prevents neuronal apoptosis after kainic acid-evoked status epilepticus. *Brain research. Molecular brain research*, 75(2), pp.216–24.
- Kuchibhotla, K. V et al., 2013. Neurofibrillary tangle-bearing neurons are functionally integrated in cortical circuits in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), pp.510–4.
- Kumlien, E. & Lundberg, P.O., 2010. Seizure risk associated with neuroactive drugs: data from the WHO adverse drug reactions database. *Seizure*, 19(2), pp.69–73.
- LaFerla, F.M., 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(11), pp.862–72.

- Lai, A.Y. & McLaurin, J., 2012. Clearance of amyloid- $\beta$  peptides by microglia and macrophages: the issue of what, when and where. *Future neurology*, 7(2), pp.165–176.
- Lallement, G. et al., 1998. Medical management of organophosphate-induced seizures. *Journal of physiology, Paris*, 92(5-6), pp.369–73.
- Lasagna-Reeves, C.A. et al., 2012. Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Scientific reports*, 2, p.700.
- Lawlor, M.A. & Alessi, D.R., 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?. *Journal of cell science*, 114(Pt 16), pp.2903–10.
- Layer, P.G. et al., 2013. Cholinesterases in development: AChE as a firewall to inhibit cell proliferation and support differentiation. *Chemico-biological interactions*, 203(1), pp.269–76.
- Lee, C.Y.D. & Landreth, G.E., 2010. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 117(8), pp.949–60.
- Lee, H.P. et al., 2010. Antioxidant approaches for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert review of neurotherapeutics*, 10(7), pp.1201–8.
- Lee, J.-K. et al., 2008. Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. *Neuroscience letters*, 440(3), pp.260–4.
- Lemere, C.A., 2013. Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles. *Molecular neurodegeneration*, 8(1), p.36.
- Lew, J., 2013. CDK5: A new lead to survival. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(13), pp.1981–2.
- Lheureux, S. & Le Moulec, S., 2011. [Molecules involved in apoptosis regulation as therapeutic targets in oncology]. *Bulletin du cancer*, 98(9), pp.1029–36.
- Li, B.-S. et al., 2002. Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. *The EMBO journal*, 21(3), pp.324–33.
- Li, B.-S. et al., 2003. Cyclin-dependent kinase-5 is involved in neuregulin-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activity mediating neuronal survival. *The Journal of biological chemistry*, 278(37), pp.35702–9.
- Li, G. et al., 2012. Staurosporine-induced apoptosis presents with unexpected cholinergic effects in a differentiated neuroblastoma cell line. *Neurochemistry International*, 61, pp.1011–1020.

- Li, G., Klein, J. & Zimmermann, M., 2013. Pathophysiological amyloid concentrations induce sustained upregulation of readthrough acetylcholinesterase mediating anti-apoptotic effects. *Neuroscience*, 240, pp.349–60.
- Li, Y. et al., 2000. Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(1), pp.149–55.
- Lichtenthaler, S.F., 2011.  $\alpha$ -secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *Journal of neurochemistry*, 116(1), pp.10–21.
- Linseman, D.A. et al., 2004. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(44), pp.9993–10002.
- Liu, B., Feng, J. & Wang, J.-H., 2014. Protein Kinase C is Essential for Kainate-Induced Anxiety-Related Behavior and Glutamatergic Synapse Upregulation in Prelimbic Cortex. *CNS neuroscience & therapeutics*, 20(11), pp.982–90.
- Liu, J. et al., 2013. Rhein lysinate decreases the generation of  $\beta$ -amyloid in the brain tissues of Alzheimer's disease model mice by inhibiting inflammatory response and oxidative stress. *Journal of Asian natural products research*, 15(7), pp.756–63.
- Liu, Q. et al., 2007. Dissecting the signaling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer disease model. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(1), pp.61–73.
- Liu, X. et al., 2010. Protective effects of galantamine against A $\beta$ -induced PC12 cell apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Neurochemistry international*, 57(5), pp.588–99.
- Liu, Z.-C. et al., 2014. Snail regulated by PKC/GSK-3 $\beta$  pathway is crucial for EGF-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells. *Cell and tissue research*, 358(2), pp.491–502.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.402–8.
- Livneh, U. et al., 2010. Strain and regional dependence of alternate splicing of acetylcholinesterase in the murine brain following stress or treatment with

- diisopropylfluorophosphate. *Behavioural brain research*, 210(1), pp.107–15.
- Lossi, L. et al., 2005. Apoptosis in the mammalian CNS: Lessons from animal models. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 170(1), pp.52–66.
- Lu, L. et al., 2013. Synaptic acetylcholinesterase targeted by microRNA-212 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(11), pp.2530–40.
- Lunardi, P. et al., 2013. Huperzine A, but not tacrine, stimulates S100B secretion in astrocyte cultures. *Life Sciences*, 92, pp.701–707.
- Lutz, J.A. et al., 2014. A nicotinic receptor-mediated anti-inflammatory effect of the flavonoid rhamnetin in BV2 microglia. *Fitoterapia*, 98, pp.11–21.
- Ma, T. et al., 2013. Huperzine A promotes hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo. *Brain research*, 1506, pp.35–43.
- Mabuchi, T. et al., 2001. Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(23), pp.9204–13.
- Malm, T. et al., 2010. The role and therapeutic potential of monocytic cells in Alzheimer's disease. *Glia*, 58(8), pp.889–900.
- Mandel, M. & Higa, A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology*, 53(1), pp.159–62.
- Manev, H. et al., 1989. Delayed increase of Ca<sup>2+</sup> influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Molecular pharmacology*, 36(1), pp.106–12.
- Marinova-Mutafchieva, L. et al., 2009. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 110(3), pp.966–75.
- Marks, N. & Berg, M.J., 2010. BACE and gamma-secretase characterization and their sorting as therapeutic targets to reduce amyloidogenesis. *Neurochemical research*, 35(2), pp.181–210.
- Massoulié, J. et al., 2008. Old and new questions about cholinesterases. *Chemico-biological interactions*, 175(1-3), pp.30–44.
- Massoulié, J. & Millard, C.B., 2009. Cholinesterases and the basal lamina at vertebrate neuromuscular junctions. *Current opinion in pharmacology*, 9(3), pp.316–25.

- Mastrangelo, M.A. & Bowers, W.J., 2008. Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC neuroscience*, 9, p.81.
- Matos, M. et al., 2008. Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience*, 156(4), pp.898–910.
- Matrone, C. et al., 2008. NGF and BDNF signaling control amyloidogenic route and Abeta production in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), pp.13139–44.
- Mattson, M.P. & Pedersen, W.A., 1998. Effects of amyloid precursor protein derivatives and oxidative stress on basal forebrain cholinergic systems in Alzheimer's disease. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 16(7-8), pp.737–53.
- McDonough, J.H. & Shih, T.M., 1993. Pharmacological modulation of soman-induced seizures. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 17(2), pp.203–15.
- McIlwain, D.R., Berger, T. & Mak, T.W., 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), p.a008656.
- McLin, J.P. & Steward, O., 2006. Comparison of seizure phenotype and neurodegeneration induced by systemic kainic acid in inbred, outbred, and hybrid mouse strains. *The European journal of neuroscience*, 24(8), pp.2191–202.
- Meraz-Ríos, M.A. et al., 2013. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7, p.59.
- Merlini, M. et al., 2011. Vascular  $\beta$ -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA $\beta$  mice. *Acta neuropathologica*, 122(3), pp.293–311.
- Meshorer, E. et al., 2005. SC35 promotes sustainable stress-induced alternative splicing of neuronal acetylcholinesterase mRNA. *Molecular psychiatry*, 10(11), pp.985–97.
- Meshorer, E. & Soreq, H., 2006. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends in neurosciences*, 29(4), pp.216–24.
- Meunier, J. & Borjini, N., 2014. Brain Toxicity and Inflammation Induced In Vivo in Mice by the Amyloid-B Forty-Two Inducer Aftin-4, a Roscovitine Derivative. *Journal of Alzheimer's Disease*, pp.1–17.

- Minarini, A. et al., 2013. Multifunctional tacrine derivatives in Alzheimer's disease. *Current topics in medicinal chemistry*, 13(15), pp.1771–86.
- Mokhtar, S.H. et al., 2013. The Beta-Amyloid Protein of Alzheimer's Disease: Communication Breakdown by Modifying the Neuronal Cytoskeleton. *International journal of Alzheimer's disease*, 2013, p.910502.
- Molina-Holgado, E. & Molina-Holgado, F., 2010. Mending the broken brain: neuroimmune interactions in neurogenesis. *Journal of neurochemistry*, 114(5), pp.1277–90.
- Moral-Naranjo, M.T. et al., 2010. The levels of both lipid rafts and raft-located acetylcholinesterase dimers increase in muscle of mice with muscular dystrophy by merosin deficiency. *Biochimica et biophysica acta*, 1802(9), pp.754–64.
- Mulle, C. et al., 1998. Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature*, 392(6676), pp.601–5.
- Muñoz, F.J. & Inestrosa, N.C., 1999. Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid beta-peptide aggregates is dependent on the type of Abeta peptide and the AChE concentration present in the complexes. *FEBS letters*, 450(3), pp.205–9.
- Muñoz-Torrero, D., 2008. Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Current medicinal chemistry*, 15(24), pp.2433–55.
- Muñoz-Torrero, D. & Camps, P., 2006. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Current medicinal chemistry*, 13(4), pp.399–422.
- Nakamura, T., Cho, D.-H. & Lipton, S.A., 2012. Redox regulation of protein misfolding, mitochondrial dysfunction, synaptic damage, and cell death in neurodegenerative diseases. *Experimental neurology*, 238(1), pp.12–21.
- Nalivaeva, N.N. & Turner, A.J., 2013. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS letters*, 587(13), pp.2046–54.
- Napoli, I. & Neumann, H., 2010. Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Experimental neurology*, 225(1), pp.24–8.
- Ni, R., Marutle, A. & Nordberg, A., 2013. Modulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid- $\beta$  interactions in Alzheimer's disease brain. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 33(3), pp.841–51.
- Nie, J. et al., 2012. Effects of triptolide on the synaptophysin expression of hippocampal neurons in the AD cellular model. *International immunopharmacology*, 13(2), pp.175–80.

- Nimmrich, V. & Eckert, A., 2013. Calcium channel blockers and dementia. *British journal of pharmacology*, 169(6), pp.1203–10.
- Noble, W. et al., 2003. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron*, 38(4), pp.555–65.
- Noh, M.-Y. et al., 2013. Neuroprotective effects of donepezil against A $\beta$ 42-induced neuronal toxicity are mediated through not only enhancing PP2A activity but also regulating GSK-3 $\beta$  and nAChRs activity. *Journal of neurochemistry*, 127(4), pp.562–74.
- Nordberg, A. et al., 2014. Cholinesterases in Alzheimer Patients. *Current Alzheimer Research*, 6(1), pp.4–14.
- Nordberg, A., 2006. Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders*, 20(2 Suppl 1), pp.S12–8.
- O'Connor, O. a. et al., 2006. The combination of the proteasome inhibitor bortezomib and the Bcl-2 antisense molecule oblimersen sensitizes human B-cell lymphomas to cyclophosphamide. *Clinical Cancer Research*, 12(9), pp.2902–2911.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., et al., 2003. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 24(8), pp.1063–70.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., et al., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), pp.409–21.
- Ofek, K. et al., 2007. Cholinergic status modulations in human volunteers under acute inflammation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 85(11), pp.1239–51.
- Ofek, K. & Soreq, H., 2013. Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. *Chemico-biological interactions*, 203(1), pp.113–9.
- Overk, C.R. et al., 2010. Cortical M1 receptor concentration increases without a concomitant change in function in Alzheimer's disease. *Journal of chemical neuroanatomy*, 40(1), pp.63–70.
- Pang, Y.P. et al., 1996. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry*, 271(39), pp.23646–9.
- Paraoanu, L.E. et al., 2006. On functions of cholinesterases during embryonic development. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 30(1-2), pp.201–4.

- Park, S.E., Kim, N.D. & Yoo, Y.H., 2004. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer research*, 64(8), pp.2652–5.
- Pavlov, V. a et al., 2006. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), pp.5219–23.
- Pavlov, V.A. et al., 2009. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, behavior, and immunity*, 23(1), pp.41–5.
- Pazini, A.M. et al., 2013. Selegiline reverses  $\alpha\beta_{25-35}$ -induced cognitive deficit in male mice. *Neurochemical research*, 38(11), pp.2287–94.
- Pera, M. et al., 2009. Acetylcholinesterase as an amyloid enhancing factor in PrP82-146 aggregation process. *Molecular and cellular neurosciences*, 40(2), pp.217–24.
- Pera, M. et al., 2006. Acetylcholinesterase triggers the aggregation of PrP 106-126. *Biochemical and biophysical research communications*, 346(1), pp.89–94.
- Pera, M. et al., 2013. Undifferentiated and differentiated PC12 cells protected by huprines against injury induced by hydrogen peroxide. *PloS one*, 8(9), p.e74344.
- Perrier, N.A. et al., 2005. The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *Journal of neurochemistry*, 94(3), pp.629–38.
- Perry, V.H. & Teeling, J., 2013. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Seminars in immunopathology*, 35(5), pp.601–12.
- Phukan, S. et al., 2010. GSK3beta: role in therapeutic landscape and development of modulators. *British journal of pharmacology*, 160(1), pp.1–19.
- Di Pietro, O. et al., 2014. 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[h][1,6]naphthyridines as a new family of potent peripheral-to-midgorge-site inhibitors of acetylcholinesterase: Synthesis, pharmacological evaluation and mechanistic studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 73, pp.141–152.
- Pirotte, B. et al., 2013. AMPA receptor positive allosteric modulators: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 23(5), pp.615–28.



- Pizza, V. et al., 2011. Neuroinflammation and ageing: current theories and an overview of the data. *Reviews on recent clinical trials*, 6(3), pp.189–203.
- Pohanka, M., 2012. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 - present). *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(8), pp.871–86.
- Polimeni, G. et al., 2014. Role of melatonin supplementation in neurodegenerative disorders. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 19, pp.429–46.
- Pollack, M., Phaneuf, S. & Dirks, A., 2002. PDFlib PLOP : PDF Linearization , Optimization , Protection. *Annals New York Academy of Sciences*, 959, pp.93–107.
- Popa-Wagner, A. et al., 2013. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, p.963520.
- Popp, J. et al., 2009. Macrophage migration inhibitory factor in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of psychiatric research*, 43(8), pp.749–53.
- Posadas, I., López-Hernández, B. & Ceña, V., 2013. Nicotinic receptors in neurodegeneration. *Current neuropharmacology*, 11(3), pp.298–314.
- Prox, J., Rittger, A. & Saftig, P., 2012. Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and presenilin. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale*, 217(3-4), pp.331–41.
- Puymirat, J., Etongue-Mayer, P. & Dussault, J.H., 1995. Thyroid Hormones Stabilize Acetylcholinesterase mRNA in Neuro-2A Cells That Overexpress the b1 Thyroid Receptor. *The Journal of biological chemistry*, 270(51), pp.30651–30656.
- Puzzo, D. et al., 2005. Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(29), pp.6887–97.
- Puzzo, D. et al., 2014. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: Practical considerations and guidelines. *Biochemical pharmacology*, 88(4), pp.450–67.
- Qu, J. et al., 2011. S-Nitrosylation activates Cdk5 and contributes to synaptic spine loss induced by beta-amyloid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34), pp.14330–5.
- Querfurth, H.W. & LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 362(4), pp.329–44.

- Rao, M.S., Hattiangady, B. & Shetty, A.K., 2006. The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus. *Aging cell*, 5(6), pp.545–58.
- Ratia, M. et al., 2013. Huprine X and huperzine A improve cognition and regulate some neurochemical processes related with Alzheimer's disease in triple transgenic mice (3xTg-AD). *Neuro-degenerative diseases*, 11(3), pp.129–40.
- Ravizza, T. et al., 2005. Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia*, 46 Suppl 5, pp.113–7.
- Ray, S.K. et al., 2006. Inhibition of calpain and caspase-3 prevented apoptosis and preserved electrophysiological properties of voltage-gated and ligand-gated ion channels in rat primary cortical neurons exposed to glutamate. *Neuroscience*, 139(2), pp.577–95.
- Rees, T. et al., 2003. Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiology of aging*, 24(6), pp.777–87.
- Rees, T.M. et al., 2005. Memory deficits correlating with acetylcholinesterase splice shift and amyloid burden in doubly transgenic mice. *Current Alzheimer research*, 2(3), pp.291–300.
- Del Rey, A. & Besedovsky, H.O., 2008. Sympathetic nervous system-immune interactions in autoimmune lymphoproliferative diseases. *Neuroimmunomodulation*, 15(1), pp.29–36.
- Richardson, K. et al., 2013. Statins and cognitive function: a systematic review. *Annals of internal medicine*, 159(10), pp.688–97.
- Rodríguez-Moreno, A. & Sihra, T.S., 2004. Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 557(Pt 3), pp.733–45.
- Rohn, T.T., 2009. Cytoplasmic inclusions of TDP-43 in neurodegenerative diseases: a potential role for caspases. *Histology and histopathology*, 24(8), pp.1081–6.
- Roman, S. et al., 2002. Interaction of a new potent anticholinesterasic compound (+/-)huprine X with muscarinic receptors in rat brain. *Neuroscience letters*, 325(2), pp.103–6.
- Roman, S. et al., 2004. Potentiation effects of (+/-)huprine X, a new acetylcholinesterase inhibitor, on nicotinic receptors in rat cortical synaptosomes. *Neuropharmacology*, 46(1), pp.95–102.
- Romanelli, M.F. et al., 1990. Advanced Alzheimer's disease is a risk factor for late-onset seizures. *Archives of neurology*, 47(8), pp.847–50.

- Sabharwal, P. & Wisniewski, T., 2014. Novel immunological approaches for the treatment of Alzheimer's disease. *Zhongguo xian dai shen jing ji bing za zhi*, 14(3), pp.139–151.
- Salmon, a et al., 2005. Muscarinic modulations of neuronal anticholinesterase responses. *Chemico-biological interactions*, 157-158, pp.105–13.
- Saydoff, J.A. et al., 2013. Uridine prodrug improves memory in Tg2576 and TAPP mice and reduces pathological factors associated with Alzheimer's disease in related models. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 36(4), pp.637–57.
- Schliebs, R. & Arendt, T., 2011. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural brain research*, 221(2), pp.555–63.
- Schneider, B.M. et al., 2009. Clinical use of an herbal-derived compound (Huperzine A) to treat putative complex partial seizures in a dog. *Epilepsy & behavior: E&B*, 15(4), pp.529–34.
- Shaked, I., Zimmerman, G. & Soreq, H., 2008. Stress-induced alternative splicing modulations in brain and periphery: acetylcholinesterase as a case study. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148, pp.269–81.
- Shaltiel, G. et al., 2013. Hippocampal microRNA-132 mediates stress-inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target. *Brain structure & function*, 218(1), pp.59–72.
- Shang, Y.C. et al., 2012. Prevention of  $\beta$ -amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI 3-K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL. *Aging*, 4(3), pp.187–201.
- Shen, H. et al., 2010. Neuroprotection by donepezil against glutamate excitotoxicity involves stimulation of  $\alpha 7$  nicotinic receptors and internalization of NMDA receptors. *British journal of pharmacology*, 161(1), pp.127–39.
- Shi, S., Wang, Z. & Qiao, Z., 2013. The multifunctional anti-inflammatory drugs used in the therapy of Alzheimer's disease. *Current medicinal chemistry*, 20(20), pp.2583–8.
- Shimohama, S., 2013. The development of therapies for Alzheimer's disease based on cholinergic hypothesis-status quo and future directions. *Rinshō shinkeigaku = Clinical neurology*, 53(11), pp.1036–8.
- Shu, X.-J. et al., 2012. Effect of bis(7)-tacrine on cognition in rats with chronic cerebral ischemia. *Neuroscience letters*, 512(2), pp.103–8.
- Shukla, V., Skuntz, S. & Pant, H.C., 2012. Deregulated Cdk5 activity is involved in inducing Alzheimer's disease. *Archives of medical research*, 43(8), pp.655–62.

- Shytle, R.D. et al., 2004. Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *Journal of neurochemistry*, 89(2), pp.337–43.
- Sieber, M.W. et al., 2011. Attenuated inflammatory response in aged mice brains following stroke. *PloS one*, 6(10), p.e26288.
- Sigoillot, S.M., Bourgeois, F. & Legay, C., 2010. Cholinesterases regulation in the absence of ColQ. *Chemico-biological interactions*, 187(1-3), pp.84–9.
- Silveyra, M.-X. et al., 2012. Changes in acetylcholinesterase expression are associated with altered presenilin-1 levels. *Neurobiology of aging*, 33(3), pp.627.e27–37.
- Silveyra, M.-X. et al., 2008. Presenilin 1 interacts with acetylcholinesterase and alters its enzymatic activity and glycosylation. *Molecular and cellular biology*, 28(9), pp.2908–19.
- Singh, S. et al., 2012. Current therapeutic strategy in Alzheimer's disease. *European review for medical and pharmacological sciences*, 16(12), pp.1651–64.
- Sinha, K. et al., 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology*, 87(7), pp.1157–80.
- Solito, E. & Sastre, M., 2012. Microglia function in Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 3, p.14.
- Soreq, H. & Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(4), pp.294–302.
- Stefani, I.C. et al., 2012. The role of ER stress-induced apoptosis in neurodegeneration. *Current Alzheimer research*, 9(3), pp.373–87.
- Sternfeld, M. et al., 2000. Excess “read-through” acetylcholinesterase attenuates but the “synaptic” variant intensifies neurodeterioration correlates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), pp.8647–52.
- Streit, W.J., Graeber, M.B. & Kreutzberg, G.W., 1988. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*, 1(5), pp.301–7.
- De Strooper, B., Iwatsubo, T. & Wolfe, M.S., 2012. Presenilins and  $\gamma$ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(1), p.a006304.
- Suh, E.C. et al., 2008. A beta 25-35 induces presynaptic changes in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurotoxicology*, 29(4), pp.691–9.

- Sun, J. et al., 2012. The effects of simvastatin on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following kainate-induced seizures in rats. *International journal of molecular medicine*, 30(4), pp.739–46.
- Sun, Y. et al., 2013. Inhibition of cholinesterase and monoamine oxidase-B activity by Tacrine-Homoisoflavonoid hybrids. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(23), pp.7406–17.
- Sundaram, J.R. et al., 2013. Specific inhibition of p25/Cdk5 activity by the Cdk5 inhibitory peptide reduces neurodegeneration in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(1), pp.334–43.
- Sussman, J.L. et al., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5022), pp.872–9.
- Takada, Y. et al., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 306(2), pp.772–7.
- Takahashi, R., 2010. [Anti-aging studies on the senescence accelerated mouse (SAM) strains]. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 130(1), pp.11–8.
- Tang, M. et al., 2011. Neto1 is an auxiliary subunit of native synaptic kainate receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(27), pp.10009–18.
- Thal, D.R., 2012. The role of astrocytes in amyloid  $\beta$ -protein toxicity and clearance. *Experimental neurology*, 236(1), pp.1–5.
- Tiong, C.X., Lu, M. & Bian, J.-S., 2010. Protective effect of hydrogen sulphide against 6-OHDA-induced cell injury in SH-SY5Y cells involves PKC/PI3K/Akt pathway. *British journal of pharmacology*, 161(2), pp.467–80.
- Toiber, D. et al., 2008. N-acetylcholinesterase-induced apoptosis in Alzheimer's disease. *PloS one*, 3(9), p.e3108.
- Toiber, D. & Soreq, H., 2005. Cellular stress reactions as putative cholinergic links in Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, 30(6-7), pp.909–19.
- Trillo, L. et al., 2013. Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. translating basic science into clinical care. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 37(8), pp.1363–79.

- Tzeng, T.-T. et al., 2013. Caspase 3 involves in neuroplasticity, microglial activation and neurogenesis in the mice hippocampus after intracerebral injection of kainic acid. *Journal of biomedical science*, 20, p.90.
- Ueki, A. & Miyoshi, K., 1989. Effects of cholinergic drugs on learning impairment in ventral globus pallidus-lesioned rats. *Journal of the neurological sciences*, 90(1), pp.1–21.
- Verdaguer, E. et al., 2002. Kainic acid-induced neuronal cell death in cerebellar granule cells is not prevented by caspase inhibitors. *British journal of pharmacology*, 135(5), pp.1297–307.
- Verghese, P.B. et al., 2013. ApoE influences amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) clearance despite minimal apoE/ $A\beta$  association in physiological conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), pp.E1807–16.
- Vezzani, A. et al., 2011. The role of inflammation in epilepsy. *Nature reviews. Neurology*, 7(1), pp.31–40.
- Viayna, E. et al., 2010. Novel huprine derivatives with inhibitory activity toward  $\beta$ -amyloid aggregation and formation as disease-modifying anti-Alzheimer drug candidates. *ChemMedChem*, 5(11), pp.1855–70.
- Viayna, E., Sabate, R. & Muñoz-Torrero, D., 2013. Dual inhibitors of  $\beta$ -amyloid aggregation and acetylcholinesterase as multi-target anti-Alzheimer drug candidates. *Current topics in medicinal chemistry*, 13(15), pp.1820–42.
- Viayna, M.E., 2013. *Disseny i síntesi de nous compostos multipotents per al tractament de la malaltia d'Alzheimer. Tesi Doctoral.*
- Vogel-Hopker, A., Sperling, L.E. & Layer, P.G., 2012. Co-opting functions of cholinesterases in neural, limb and stem cell development. *Protein and peptide letters*, 19(2), pp.155–64.
- Vogler, M., 2012. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell death and differentiation*, 19(1), pp.67–74.
- Wakabayashi, K. & Miki, Y., 2013. [Deposition and Clearance of  $\beta$ -Amyloid in the Brain]. *Brain and nerve = Shinkei kenkyū no shinpo*, 65(12), pp.1433–44.
- Wang, C.X. et al., 2006. Cyclin-dependent kinase-5 prevents neuronal apoptosis through ERK-mediated upregulation of Bcl-2. *Cell death and differentiation*, 13(7), pp.1203–12.
- Wang, H.Y. et al., 2000. Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of neurochemistry*, 75(3), pp.1155–61.

- Wang, J., Zhang, H.Y. & Tang, X.C., 2010. Huperzine A improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion. *Journal of neuroscience research*, 88(4), pp.807–15.
- Wang, T. et al., 2014. Protective effect of donepezil hydrochloride on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Molecular medicine reports*, 9(2), pp.509–14.
- Wang, Y. et al., 2013. Amelioration of  $\beta$ -amyloid-induced cognitive dysfunction and hippocampal axon degeneration by curcumin is associated with suppression of CRMP-2 hyperphosphorylation. *Neuroscience letters*, 557 Pt B, pp.112–7.
- Watterson, D.M. et al., 2013. Development of Novel In Vivo Chemical Probes to Address CNS Protein Kinase Involvement in Synaptic Dysfunction. *PloS one*, 8(6), p.e66226.
- Wegiel, J. et al., 2004. Cells of monocyte/microglial lineage are involved in both microvessel amyloidosis and fibrillar plaque formation in APPsw tg mice. *Brain research*, 1022(1-2), pp.19–29.
- Wicklund, L. et al., 2010. B-amyloid 1-42 oligomers impair function of human embryonic stem cell-derived forebrain cholinergic neurons. *PloS one*, 5(12), p.e15600.
- Wilkinson, D., Wirth, Y. & Goebel, C., 2013. Memantine in Patients with Moderate to Severe Alzheimer's Disease: Meta-Analyses Using Realistic Definitions of Response. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 37(1-2), pp.71–85.
- Wischik, C.M., Harrington, C.R. & Storey, J.M.D., 2013. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochemical pharmacology*, 88(4), pp.529–539.
- Wlodek, S.T. et al., 1996. Binding of tacrine and 6-chlorotacrine by acetylcholinesterase. *Biopolymers*, 38(1), pp.109–17.
- Woodruff-Pak, D.S., 2008. Animal models of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 15(4), pp.507–21.
- Wyllie, A.H., 2010. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Molecular neurobiology*, 42(1), pp.4–9.
- Xiao, X.Q., Zhang, H.Y. & Tang, X.C., 2002. Huperzine A attenuates amyloid beta-peptide fragment 25-35-induced apoptosis in rat cortical neurons via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase-3 activation. *Journal of neuroscience research*, 67(1), pp.30–6.

- Xiong, Z.Q., Cheng, D.H. & Tang, X.C., 1998. Effects of huperzine A on nucleus basalis magnocellularis lesion-induced spatial working memory deficit. *Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica*, 19(2), pp.128–32.
- Yamada, T. et al., 2011. Functional expression of choline transporter-like protein 1 ( CTL1 ) in human neuroblastoma cells and its link to acetylcholine synthesis. *Neurochemistry International*, 58, pp.354–365.
- Yasar, S. et al., 2013. Antihypertensive drugs decrease risk of Alzheimer disease: Ginkgo Evaluation of Memory Study. *Neurology*, 81(10), pp.896–903.
- Yeste, M., 2008. *Paper de la gsk3 i de la jnk en la regulació de les vies apoptòtiques en cèl·lules granulars de cerebel. Tesi Doctoral.*
- Zhang, H. et al., 2012. Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Journal of neurochemistry*, 120 Suppl , pp.9–21.
- Zhang, X.-J. & Greenberg, D.S., 2012. Acetylcholinesterase involvement in apoptosis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5(April), p.40.
- Zhang, X.-M. & Zhu, J., 2011. Kainic Acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. *Current neuropharmacology*, 9(2), pp.388–98.
- Zhao, H. et al., 2013. A Synergic Role of Caspase-6 and Caspase-3 in Tau Truncation at D421 Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Cellular and molecular neurobiology*, 34(3), pp.369–78.
- Zhou, Z. et al., 2011. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration*, 5(4), pp.280–292.
- Zhu, J., Li, W. & Mao, Z., 2011. Cdk5: mediator of neuronal development, death and the response to DNA damage. *Mechanisms of ageing and development*, 132(8-9), pp.389–94.
- Zimmerman, G. et al., 2008. Acetylcholine-induced seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically epileptic rats. *The European journal of neuroscience*, 27(4), pp.965–75.
- Zimmerman, G. & Soreq, H., 2006. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell and tissue research*, 326(2), pp.655–69.
- Zimmermann, M., 2013. Neuronal AChE splice variants and their non-hydrolytic functions: redefining a target of AChE inhibitors?. *British journal of pharmacology*, 170(5), pp.953–967.



Zorn, J.A. et al., 2012. Fibrils colocalize caspase-3 with procaspase-3 to foster maturation. *The Journal of biological chemistry*, 287(40), pp.33781–95.

<http://pt851.wikidot.com/alzheimer-s-disease-cell-bio>, Alzheimer's Disease Cell Bio - Cell Biology of Disease and Exercise.

<http://talaga.rutgers.edu/index.php>, Talaga Group - Single molecule fluorescence and protein conformational dynamics.

[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=isotacoforesis&lang=2](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=isotacoforesis&lang=2), Isotacoforesis.

