

**Estudio farmacológico de nuevos
anticolinesterásicos híbridos tacrina-huperzina A
potencialmente útiles para el tratamiento de la
enfermedad de Alzheimer**



M^a del Mar Alcalá Cañadas, 2003

Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**Estudio farmacológico de nuevos
anticolinesterásicos híbridos tacrina-huperzina A
potencialmente útiles para el tratamiento de la
enfermedad de Alzheimer**

Tesis presentada por M^a del Mar Alcalá Cañadas para optar al grado
de Doctora por la Universitat Autònoma de Barcelona

ALBERT BADIA SANCHO, Catedràtic del Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que el treball d'investigació anomenat *Estudio farmacológico de nuevos anticolinesterásicos híbridos tacrina-huperzina A potencialmente útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer*, elaborada per M^a del Mar Alcalá Cañadas per optar al grau de Doctora, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i reuneix els requisits necessaris per la seva defensa.

I per a que així consti, signo aquest certificat a Bellaterra, 23 d'abril de 2003

Albert Badia Sancho

*No hay caminos para la paz,
la paz es el camino*

Mahatma Gandhi

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi director de tesis, el Dr. Albert Badia, por la confianza que ha depositado en mi desde el principio para realizar este trabajo. También me gustaría agradecer a la Dra. M^a Victòria Clos su ayuda en muchos aspectos, y en especial en mis batallas con las figuras y dibujos.

Gracias también a las doctoras Nuria M^a Vivas y Susana Hospital por su colaboración en el proyecto. También al Dr. Pelayo Camps y a su equipo por cedernos los fármacos para este estudio.

Gracias a todos mis compañeros, personal y profesores del Departament de Farmacologia de la Facultat de Medicina por compartir buenos momentos, y también otros más duros, a Susana, Guido, Jorge, Arantxa, y a tantos otros, del primero al último, la lista es muy larga y seguro que olvidaría a alguien. También gracias al Departament de Bioquímica, que nos ha asesorado siempre que los hemos necesitado y por prestarnos su equipamiento siempre de forma tan amable.

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias al soporte económico de una beca predoctoral FPI que me fue concedida por la Generalitat de Catalunya, y en su etapa final gracias a la beca Severo Ochoa de la Fundació Ferrer Investigació.

Como veterinaria me gustaría dar las gracias a los animales que, de forma totalmente involuntaria, han permitido obtener los resultados que aquí se exponen y que espero sirvan en un futuro para aliviar el sufrimiento de muchos seres.

Esta tesis esta dedicada a mi familia, biológica y “adoptada”. A mis padres y a mi Tata, porque gracias a ellos soy lo que soy. A Enric, Pau i Pyrus, per la seva innocència i per renovar il.lusions. A Gabi, per la seva confiança, per il.luminar-me el camí, per tot.

A Inés.

Índice	Pág.
Índice de abreviaturas	5
Introducción	7
1. La enfermedad de Alzheimer	9
1.1. <i>Factores de riesgo</i>	10
1.2. <i>Alteraciones fisiopatológicas</i>	13
1.2.1. <u>Cambios neuropatológicos</u>	14
1.2.2. <u>Hipótesis colinérgica</u>	18
2. Farmacología de la EA	20
2.1. <i>Precursores de la ACh</i>	22
2.2. <i>Inhibidores de la AChE</i>	22
2.2.1. <u>Breve historia de los IChE</u>	22
2.2.2. <u>La enzima</u>	25
2.2.3. <u>Mecanismo de acción de los IChE</u>	29
2.2.4. <u>Principales IChE usados en la EA</u>	30
2.2.5. <u>Efectos de los IChE sobre otros sistemas</u>	33
2.2.6. <u>Efectos indeseados</u>	39
2.3. <i>Otras posibles terapias para la EA</i>	39
2.3.1. <u>Actuación sobre la proteína amiloide</u>	40
2.3.2. <u>Actuación sobre los ovillos neurofibrilares</u>	41
2.3.3. <u>Actuación sobre el estrés oxidativo</u>	42
2.3.4. <u>Actuación sobre la excitotoxicidad y el metabolismo energético</u>	42
2.3.5. <u>Actuación sobre la inflamación</u>	43
2.3.6. <u>Actuación sobre los niveles de colesterol</u>	43

2.4. <i>Fármacos híbridos tacrina-huperzina A</i>	45
Objetivos	49
Material y métodos	53
1. Material	55
1.1. <i>Animales de experimentación</i>	55
1.2. <i>Reactivos y fármacos</i>	55
2. Métodos	56
2.1. <i>Determinación de la actividad anticolinesterásica in vitro</i>	56
2.2. <i>Dependencia del tiempo del efecto anticolinesterásico</i>	58
2.3. <i>Reversibilidad de la unión</i>	59
2.4. <i>Determinación del tipo de inhibición</i>	60
2.5. <i>Determinación de la actividad anticolinesterásica ex vivo</i>	60
2.5.1. <u>Determinación de la DI_{50} del efecto anticolinesterásico en cerebro de ratón</u>	60
2.5.2. <u>Curso temporal del efecto anticolinesterásico en cerebro de ratón</u>	62
2.5.3. <u>Efecto anticolinesterásico a nivel periférico</u>	63
2.6. <i>Estudios de fijación de radioligandos a los receptores muscarínicos</i>	64
2.6.1. <u>Obtención de membranas</u>	64
2.6.2. <u>Estudios de saturación</u>	65
2.6.3. <u>Estudios de competición</u>	67
2.7. <i>Medida de la hidrólisis de fosfoinosítidos en miniprismas de corteza cerebral</i>	69
2.7.1. <u>Preparación del tejido</u>	69
2.7.2. <u>Incorporación de [3H]-inositol a los fosfoinosítidos de membrana</u>	70

2.7.3. <u>Estimulación de la acumulación de fosfatos de [³H]-inositol</u>	71
2.7.4. <u>Separación de los fosfatos de [³H]-inositol</u>	72
2.7.5. <u>Cálculos</u>	73
Resultados	75
1. Actividad inhibitoria enzimática <i>in vitro</i> sobre la AChE y sobre la BChE	77
1.1. <i>Actividad cruzada de las enzimas</i>	77
1.2. <i>Efectos in vitro sobre la AChE eritrocitaria bovina y humana y sobre la BChE humana</i>	78
2. Dependencia del tiempo y reversibilidad de la actividad inhibitoria sobre la AChE bovina	81
3. Determinación del tipo de inhibición enzimática	83
4. Actividad inhibitoria <i>ex vivo</i> sobre la AChE de cerebro de ratón	85
4.1. <i>Determinación de la DI₅₀ para la actividad anticolinesterásica ex vivo</i>	85
4.2. <i>Curso temporal del efecto anticolinesterásico ex vivo</i>	88
4.3. <i>Comparación del efecto ex vivo de las huprinas con otros anticolinesterásicos</i>	91
4.4. <i>Efectos tóxicos en experimentos ex vivo</i>	92
5. Actividad inhibitoria <i>ex vivo</i> sobre las colinesterasas plasmáticas de ratón	94
6. Efecto de las huprinas Y y Z sobre los receptores muscarínicos	95
6.1. <i>Estudios de fijación de radioligandos a receptores muscarínicos M₁</i>	95
6.1.1. <u>Estudios de saturación</u>	95
6.1.2. <u>Estudios de competición</u>	96

6.2. Estudios de fijación de radioligandos a receptores muscarínicos M_2	98
6.2.1. <u>Estudios de saturación</u>	98
6.2.2. <u>Estudios de competición</u>	100
6.3. Estudio de la hidrólisis de fosfoinosítidos en miniprismas de corteza cerebral de rata	101
Discusión	107
1. Actividad inhibitoria enzimática <i>in vitro</i> de las huprinas Y y Z sobre la AChE y la BChE	110
2. Dependencia del tiempo y reversibilidad de la actividad inhibitoria sobre la AChE	113
3. Determinación del tipo de inhibición enzimática	114
4. Actividad inhibitoria enzimática <i>ex vivo</i> de las huprinas Y y Z sobre la AChE cerebral de ratón	115
5. Actividad inhibitoria <i>ex vivo</i> sobre las colinesterasas plasmáticas de ratón	118
6. Efecto de las huprinas Y y Z sobre los receptores muscarínicos	120
Conclusiones	133
Bibliografía	139
Anexo	165

Índice de abreviaturas

ACh: acetilcolina
AChE: acetilcolinesterasa
AINEs: antiinflamatorios no esteroideos
ASCh: acetiltiocolina
 β A: β -amiloide
B_{max}: fijación máxima
BCh: butirilcolina
BChE: butirilcolinesterasa
BSCh: butiriltiocolina
BW284c51: 1,5-bis-(4-alildimetilamoniofenil) pentano-3-uno dibromuro
CAT: colina acetiltransferasa
ChE: colinesterasa/s
CE₅₀: concentración eficaz 50
CI₅₀: concentración inhibitoria 50
COX: ciclooxigenasa
DI₅₀: dosis inhibitoria 50
DTNB: ácido 5,5'-Ditio-bis(2-nitrobenzoico)
EA: enfermedad de Alzheimer
EEM: error estándar de la media
E_{max}: estimulación máxima
E₀: efecto máximo
[³H]-QNB: I-Quinuclidinil[fenil-4-³H]benzilato
Huprina Y: (\pm)-huprina Y
Huprina Z: (\pm)-huprina Z
IACHe: inhibidor de la AChE
iso-OMPA: tetraisopropilo pirofosforamida
k: constante de eliminación del efecto del fármaco
K_D: constante de disociación
K_i: constante de inhibición
NGF: factor de crecimiento neuronal
n_H: coeficiente de Hill
n.s.: no significativo
PPA: péptido precursor de la proteína β -amiloide
PPAs: PPA soluble
PS-1: preselinina-1
PS-2: preselinina-2
SNC: sistema nervioso central
t_{1/2}: tiempo de semivida biológica

Introducción

1. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es actualmente una de las alteraciones neurodegenerativas más importantes que afecta a las personas de edad avanzada. Se caracteriza por la pérdida progresiva de las funciones cognitivas y de la memoria, con un deterioro de la capacidad intelectual, y por la presencia de alteraciones en el comportamiento y en la realización de las actividades del día a día (Benzi and Moretti, 1998). A medida que la enfermedad sigue su curso, se afectan progresivamente las funciones biológicas hasta producirse, finalmente, la muerte del paciente.

El proceso normal de envejecimiento está asociado a un declive de las funciones sensoriales y motoras, lo cual se suele acompañar de una disfunción cognitiva leve. La demencia, en cambio, comprende un grupo de alteraciones caracterizadas por un deterioro gradual de las habilidades intelectuales, hasta el punto de encontrarse graves problemas sociales y ocupacionales. La prevalencia de los casos de demencia en personas de más de 80 años es de aproximadamente un 30% de la población, suponiendo la EA un 50-70% del total de los casos (Muir, 1996).

La EA se desarrolla de forma progresiva y lenta, el tiempo medio de supervivencia de los pacientes es de unos 10 años a partir del momento en que se realiza el diagnóstico presuntivo (Cummings, 1995). En las primeras fases se produce un fuerte impacto psicológico en el paciente, pasando en estadios avanzados a un mutismo casi absoluto y a una total desconexión con el entorno. De todo esto se puede deducir que la carga emocional para las familias afectadas y el gasto económico son enormes, y no es de extrañar que exista una gran presión para que se desarrollen terapias realmente efectivas.

1.1. Factores de riesgo

Los factores de riesgo que predisponen a sufrir esta enfermedad no son bien conocidos. No cabe duda que la edad es el factor más importante, pero además existen otros que podrían influir en su aparición, en este sentido se debe tener en cuenta que tanto el fenotipo como el genotipo del paciente juegan un papel importante (Holmes, 2002). La evidencia más clara de que existe una contribución genética en la etiología de la EA es la existencia de familias en las cuales la enfermedad se transmite siguiendo un claro patrón autosómico dominante. Gracias a estudios realizados en familias afectadas por la presentación de la EA a edad temprana, se ha revelado la transmisión de generación en generación de una única mutación en el gen del péptido precursor de la proteína β -amiloide (PPA), localizado en el cromosoma 21. Además, se han visto otras mutaciones en los genes que codifican la preselinina-1 (PS-1) y preselinina-2 (PS-2), localizados en los cromosomas 14 y 1, respectivamente. Las diferentes mutaciones en estos tres genes conducen a un mismo resultado, un aumento en el fragmento β -A42 del PPA, dicho fragmento forma el núcleo de las placas neuríticas halladas en el cerebro de personas afectadas por la EA. A pesar de esto, la mayoría de los casos de EA (>95%) se da a edades superiores a los 60 años, por lo cual se puede deducir que estas mutaciones son sólo una pequeña contribución al riesgo de desarrollar la enfermedad en general, aunque su estudio está ayudando a alcanzar un mejor conocimiento de la patogénesis de esta patología.

Las familias con mutaciones en el gen que codifica la PPA desarrollan la enfermedad entre los 40 y los 65 años (Holmes, 2002). La edad de inicio de la EA en las familias que presentan mutaciones en el gen de la PS-1 es más temprana (35-55 años), e incluso

se ha descrito un caso a los 24 años (Wisniewski et al., 1998). En los casos de mutaciones en el gen de la PS-2 la edad de presentación es de 40-70 años, dándose una cierta superposición con la edad de inicio de la EA tardía.

La herencia de la presentación de la EA a edad avanzada es más compleja ya que no se da un patrón autosómico dominante, si no más bien se sugiere una herencia poligénica multifactorial, aunque aún son necesarios estudios más profundos para demostrar el papel de estos factores en la enfermedad. Se ha sugerido que la presencia del alelo APOE4 avanza la edad de presentación de la enfermedad en 6 años. Existe un estudio que demuestra una clara disminución en el riesgo relativo de desarrollar la forma tardía de la EA en todos los individuos al aumentar la edad, produciéndose una meseta a partir de la cual no se describen nuevos casos (Meyer et al., 1998). La edad a la cual se alcanza esta meseta se produce antes en los portadores del alelo APOE4, por lo que parece que la presencia de este alelo influye principalmente en el momento de presentación de la enfermedad, pero no es un factor desencadenante por si mismo.

Respecto a los síntomas no-cognitivos que a menudo se presentan en la EA, no parece haber una relación directa entre los factores de riesgo genéticos y la presencia de estos síntomas en la forma tardía de la enfermedad. Sin embargo, esto no significa que los síntomas no tengan una base genética ya que los genes pueden modificar la expresión fenotípica sin estar implicados directamente en la etiología. De hecho, se ha probado la existencia de una relación entre un historial familiar de depresión y un aumento en la frecuencia de síntomas depresivos en los enfermos de Alzheimer (Pearlson et al., 1990). También se ha sugerido la existencia de un papel relevante del historial familiar en la

presencia de otros síntomas no-cognitivos, como son agitación, agresividad y psicosis (Holmes, 2002).

En cuanto al declive cognitivo, no existen estudios que demuestren la existencia de una mayor disfunción cognitiva en presencia de mutaciones en los genes de PPA, PS-1 o PS-2. Tampoco se ha podido demostrar esta relación en el caso de presencia del alelo APOE4. Todo esto podría inducir a pensar que los factores genéticos influirían sólo en el momento de aparición de la enfermedad, pero no en la velocidad de degeneración. No obstante, es importante tomar estos datos de forma relativa debido al gran número de factores que afectan la degeneración cognitiva, de hecho, un estudio de larga duración ha sugerido la existencia de una mayor velocidad de deterioro cognitivo en los portadores del alelo APOE4 (Craft et al., 1998).

La media de duración de la enfermedad en familias con mutaciones en el gen de PS-1 es significativamente más corta (5.8-6.8 años) que en familias con mutaciones en los genes de PS-2 (4.4-10.8 años) o PPA (9.0-16.0 años), reflejando la severidad de las mutaciones en el primer gen. Estudios realizados en enfermos con la presentación tardía sugieren que la enfermedad tiende a durar más en personas con antecedentes familiares o en portadores del alelo APOE4, no obstante existen numerosos factores que pueden afectar esto, por lo cual es difícil establecer una relación directa. Sí existe una clara evidencia respecto a la más larga duración de la enfermedad cuanto más temprana es la edad de aparición, hecho que se ve afectado por diversos aspectos, no exclusivamente genéticos (Holmes, 2002).

Existen otros muchos factores de riesgo implicados en la EA, por ejemplo, se ha observado una prevalencia ligeramente superior en mujeres, lo cual podría estar relacionado con una mayor esperanza de vida en este sexo. Además se ha visto una relación positiva entre la reducción del nivel de estrógenos y la aparición de la EA (Diaz Brinton et al., 2000; Green and Simpkins, 2000), aunque este tema será ampliado más adelante. Los traumatismos cráneo-encefálicos (Gentleman et al., 1993) y el síndrome de Down también parecen predisponer a que se presente la EA (McDowell, 2001). El riesgo de sufrir la enfermedad parece menor en personas con elevada actividad intelectual, aunque esto podría ser una interpretación errónea ya que las pruebas utilizadas para realizar el diagnóstico de la EA son más fáciles de interpretar en individuos de estas características.

Como factores que aparentemente podrían prevenir la aparición de la enfermedad podemos citar los consumos moderados de vino, el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para tratar la artritis, la actividad física y el consumo de dietas ricas en vitamina B₆, B₁₂ y folato (McDowell, 2001). Por otro lado se cree que el riesgo es menos elevado en fumadores, aunque esta hipótesis es muy controvertida (Fratiglioni and Wang, 2000).

1.2. *Alteraciones fisiopatológicas*

La EA se caracteriza por la presencia de graves problemas neuropatológicos, entre los cuales podemos citar atrofia cerebral difusa, con la presencia de placas extracelulares de material amiloide, así como de ovillos neurofibrilares de proteína tau fosforilada y angiopatía amiloide. Estos cambios fueron descritos por primera vez por Alois Alzheimer a finales del siglo XIX, tras realizar la observación post-mortem de los

cerebros de una mujer de 51 años y de un hombre de 50 que sufrían demencia. Además de la investigación de los cambios neuropatológicos descritos, durante las últimas décadas ha existido un creciente interés por los cambios que se evidencian en varios sistemas neurotransmisores.

1.2.1. Cambios neuropatológicos

Las placas seniles, también denominadas placas amiloides, son estructuras esféricas de 20-25 mm de diámetro, localizadas en el espacio extracelular, donde desplazan las terminaciones nerviosas. Estas estructuras están formadas por conglomerados de cuerpos y prolongaciones neuronales degeneradas en torno a un depósito central de un péptido de longitud variable (29-43 aminoácidos) y un tamaño de 4-6 kDa, llamado proteína β -amiloide (β A) (Fig. 1) (Selkoe, 1994). En condiciones normales esta proteína es generada mediante la proteólisis del PPA realizada por la enzima α -secretasa, y segregada al espacio extracelular como un fragmento soluble con conformación de hélice α . Sin embargo, en pacientes con EA la proteólisis del PPA es llevada a cabo principalmente por las β y γ -secretasas, dando lugar a un fragmento con una conformación plegada de hojas β . Este fragmento tiene una gran tendencia a agregarse formando oligómeros insolubles que se depositan en el cerebro en forma de placas seniles y en las paredes de las arterias de mediano calibre, originando la angiopatía amiloide. Se ha descrito la presencia de placas y también de ovillos neurofibrilares en bajas cantidades en cerebro de personas mayores sin signos de demencia y en neuropatías como la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, la diabetes tipo II, la polineuropatía amiloide y el mieloma múltiple (Tomlinson et al., 1968).

Las causas que provocan la agregación de la proteína β A no están totalmente claras, numerosos autores han sugerido una relación con el estrés oxidativo y con disfunciones en la homeostasis del calcio neuronal (McKeon-O'Malley et al., 1998). Además, se ha demostrado la contribución de los procesos inflamatorios en el desarrollo de las placas, ya que se ha probado la presencia de proteínas asociadas a la inflamación alrededor de éstas (McGeer and McGeer, 1998).

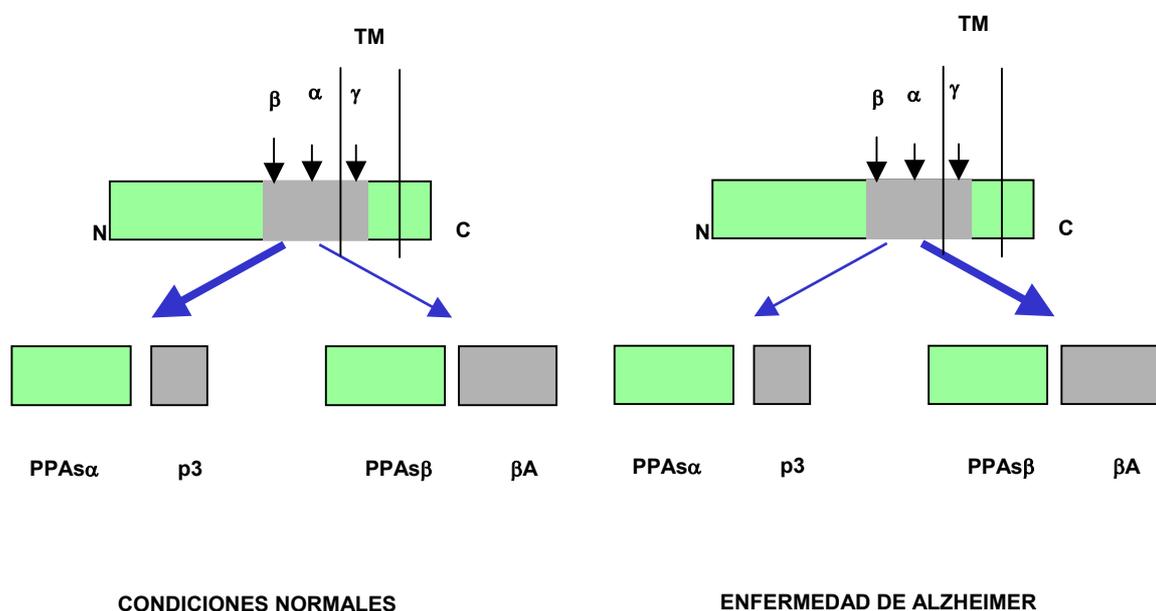


Figura 1. Alteraciones en el procesamiento del péptido precursor de la proteína amiloide soluble (PPAs) en la enfermedad de Alzheimer. La mayor formación de β A parece ser debida a un aumento de la actividad de la β - y γ -secretasas frente a la α -secretasa. TM= segmento transmembranal.

Estudios recientes sugieren, además, que la proteína β A se comporta como un potente modulador de la neurotransmisión colinérgica de forma totalmente independiente de sus propiedades neurotóxicas (Auld et al., 1998). Así, ha podido demostrarse que es capaz

de inhibir la liberación de acetilcolina (ACh), reducir su concentración intracelular junto con las actividades de la colina acetiltransferasa (CAT) y piruvato deshidrogenasa, y también disminuir la recaptación de colina. Estos efectos son altamente selectivos y restringidos a la corteza cerebral y el hipocampo, sin alterarse la neurotransmisión colinérgica en el estriado (Kar et al., 1996). Otro aspecto a destacar de esta proteína es su capacidad para bloquear y alterar la respuesta a la estimulación de los receptores colinérgicos. De este modo, la proteína βA inhibe directamente los receptores $\alpha 7$ nicotínicos (Wang et al., 2000), además de interferir en la expresión de los mismos (Hellström-Lindahl et al., 2000). Sin embargo, la interacción que dicha proteína ejerce con el receptor muscarínico M_1 se basa en una disrupción de la señal intracelular acoplada al receptor (Auld, Kar, and Quirion, 1998).

Es de interés señalar que la interacción *proteína βA -sistema colinérgico* es de tipo bidireccional (Fig. 2), ya que la estimulación de los receptores colinérgicos puede a su vez modificar la formación de esta proteína. En este sentido se ha observado que los agonistas de los receptores $M_{1/3}$ (Lin et al., 1999) así como los agonistas de los receptores nicotínicos (Seo et al., 2001), aumentan la formación de PPA soluble (PPAs), mientras que disminuyen la formación de proteína βA , por lo que una adecuada actividad colinérgica protege frente a la vía amiloidogénica responsable de la formación del péptido insoluble.

Finalmente, parece también claro que la enzima acetilcolinesterasa (AChE) puede acelerar la formación de la proteína βA y jugar un papel muy importante en su deposición en los cerebros de pacientes con EA, este hecho está posiblemente relacionado con la activación del locus periférico de la enzima (Lassmann et al., 1995).

En este sentido, la utilización de ligandos capaces de interactuar simultáneamente con el sitio activo y el sitio periférico supondría importantes ventajas sobre el uso de cualquier inhibidor de la AChE conocido, ya que estos ligandos de sitio de unión dual presentarían una mayor potencia inhibitoria de la enzima debido a su mayor afinidad y, consecuentemente, una mayor eficacia para el tratamiento de los síntomas de la EA y, además, tendrían actividad neurotrófica y capacidad para retrasar el proceso de neurodegeneración.

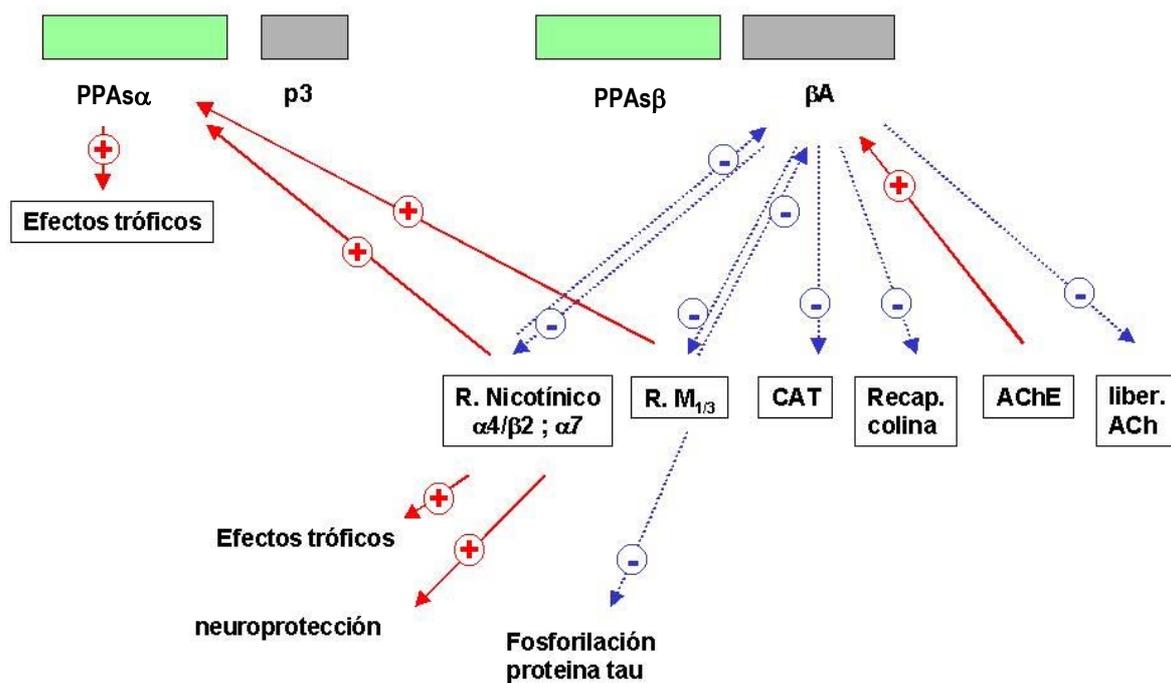


Figura 2. Interacción recíproca entre sistema colinérgico y proteína β A. R.M $_{1/3}$ = receptores muscarínicos M $_1$ y M $_3$, CAT = colina acetiltransferasa.

El segundo tipo de lesión presente en la EA es la degeneración neurofibrilar caracterizada por la presencia de cúmulos de fibrillas en el citoplasma de las neuronas, son los denominados ovillos neurofibrilares, compuestos principalmente por proteína tau altamente fosforilada (Mori and Ihara, 1991). Esta proteína, de un peso molecular igual a 50-70 KDa, está asociada a microtúbulos y en condiciones normales produce una estabilización de los mismos, manteniendo, por tanto, el citoesqueleto neuronal. En la EA la proteína tau pierde su función fisiológica habitual debido a su anormal hiperfosforilación y tiende a agregarse formando los ovillos neurofibrilares, que son insolubles y difícilmente degradables por proteólisis (Itoh et al., 1997). Esto produce una serie de alteraciones del citoesqueleto neuronal, con pérdida de ramificaciones dendríticas y reducción del número de estructuras sinápticas, conduciendo finalmente a la pérdida de neuronas en distintas regiones del sistema nervioso (Bondareff et al., 1989). Debido a que la hiperfosforilación de la proteína tau parece darse antes que la agregación de la proteína β A, éste se considera como uno de los primeros signos de degeneración neuronal (Mandelkow, 1999).

1.2.2. Hipótesis colinérgica

Desde principios de los años 70 se han encontrado pruebas consistentes de que varios sistemas de neurotransmisión están selectivamente afectados en el cerebro de los pacientes con EA. Los cambios más graves se producen en el sistema colinérgico, es por ello que se llegó a la formulación de la llamada *hipótesis colinérgica*. Dado que la etiología exacta de la EA no es del todo conocida, esta hipótesis llevó a la conclusión de que la actuación más razonable consistiría en una terapia sintomática que potenciara la función colinérgica en el SNC.

La hipótesis colinérgica surgió a partir de una serie de hallazgos en estudios post-mortem y en biopsias (Bowen et al., 1977; Davies and Maloney, 1976). De diferentes trabajos y revisiones se deducen una serie de características comunes en la EA, estos hallazgos neuroquímicos han sido corroborados por diversos estudios morfométricos, histopatológicos y neuroimágenes (Bartus et al., 1982; Coyle et al., 1983; Giacobini, 1990; Palmer and Gershon, 1990; Pepeu, 1988; Perry, 1986; Perry et al., 1977; Whitehouse et al., 1981; Whitehouse et al., 1982): en la EA existen deficiencias en la síntesis de ACh, en la actividad de la CAT y en la recaptación de colina. Además se produce una reducción de la liberación de ACh en la sinapsis neuronal así como una disminución de su metabolismo al encontrarse la actividad de la AChE disminuida (Davies, 1979). Como se ha comentado anteriormente, también se ha observado una pérdida de receptores nicotínicos, quedando en principio el número de receptores muscarínicos intacto.

El déficit colinérgico presente en la EA es el resultado de la pérdida masiva de neuronas, especialmente en neocórtex, amígdala e hipocampo. Las terminaciones nerviosas de estas áreas se originan en el prosencéfalo basal, es decir, el septo medial, la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert. En la EA se presenta una grave pérdida de neuronas en prácticamente todos estos núcleos, especialmente el núcleo basal de Meynert, lo cual podría explicar la marcada disminución de la actividad de la CAT presente en las áreas corticales inervadas de forma primaria por estas neuronas (Benzi and Moretti, 1998).

La importancia de las alteraciones del sistema colinérgico presentes en la EA fue confirmada al demostrar que la neurotransmisión colinérgica modula los procesos de memoria, aprendizaje y atención. Esto fue probado gracias a los siguientes hallazgos:

- Existe una correlación entre el déficit de CAT, las placas seniles y el deterioro cognitivo en los pacientes con EA (Mountjoy, 1986).
- Se produce un déficit cognitivo al usar fármacos anticolinérgicos centrales (por ejemplo, la escopolamina) tanto en personas sanas como en animales de experimentación, lo que podría equipararse a la deficiencia cognitiva presente en pacientes con EA (Benzi and Moretti, 1998).
- Se ha demostrado un empeoramiento en los procesos de aprendizaje y memoria en animales de experimentación asociado a la degeneración del prosencéfalo basal inducida por lesiones electrolíticas o con excitotoxinas, colinotoxinas o inmunotoxinas (Muir, 1996). Un proceso similar se observó en ratones transgénicos que sobreexpresaban la AChE humana (Beeri et al., 1995).

2. Farmacología de la EA

Se dispone aún de escasos recursos terapéuticos para el tratamiento de esta patología debido a la complejidad de las alteraciones observadas en los pacientes, aunque se está llevando a cabo una profunda investigación para intentar llegar a un mejor conocimiento y, por tanto, a la obtención de un tratamiento más eficaz y con efectos a más largo plazo. Las distintas estrategias están esquematizadas en la figura 3. La hipótesis colinérgica ha sido la que más recursos de actuación ha ofrecido para intentar frenar la progresión de la enfermedad, basándose en la corrección del deterioro cognitivo mediante la manipulación de este sistema de neurotransmisión. De todos los fármacos probados, los inhibidores de la acetilcolinesterasa (IAChE) son los que han demostrado

una mayor eficacia. No obstante, hasta el momento sólo han supuesto un modesto avance ya que la mejoría de los pacientes es sintomática al no tratarse de un tratamiento curativo, por lo que los beneficios son transitorios; además, estos fármacos se han usado sólo en casos leves o moderados, nunca en estados avanzados de la enfermedad. Por todo ello, se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos que actúen mejorando la neurotransmisión de forma duradera y que frenen la neurodegeneración y el resto de alteraciones presentes en la enfermedad.

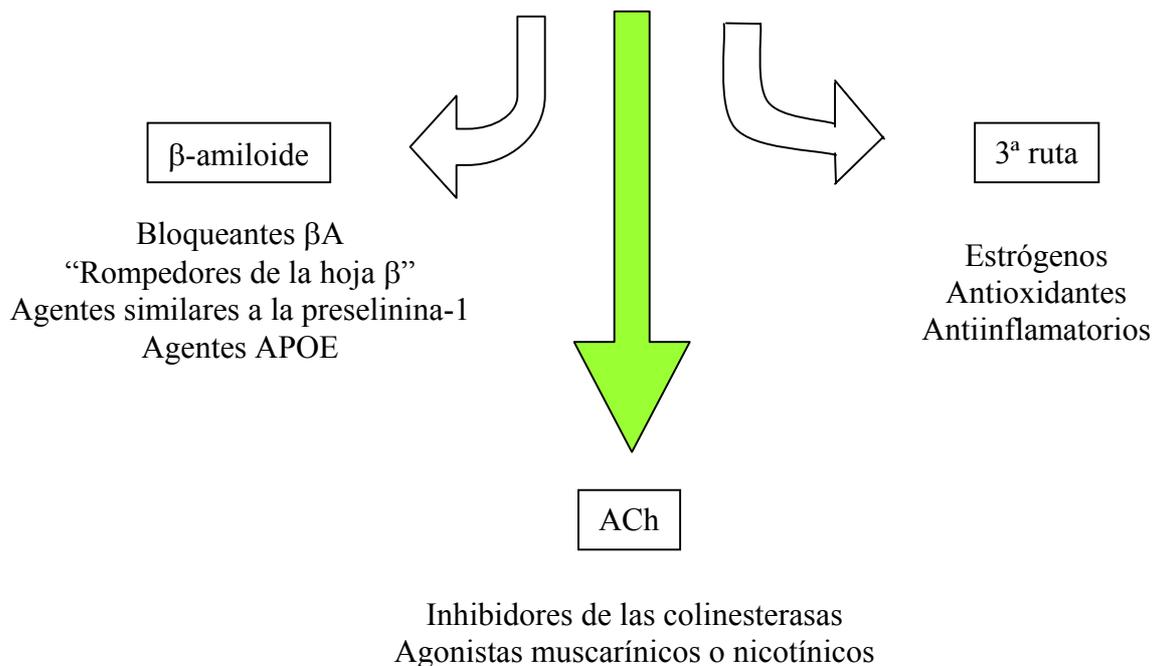


Figura 3. Posibles rutas de actuación en el tratamiento de la EA.

Además de los IChE, se están desarrollando otras terapias colinérgicas, como es el caso de los agonistas muscarínicos y nicotínicos. Sin embargo, la baja selectividad

sobre los receptores y los graves efectos adversos (sobre todo cardiovasculares y gastrointestinales) hacen que sea necesaria una investigación más profunda de estos compuestos antes de poder usarlos en el tratamiento de la EA. Por otro lado, se está observando la posibilidad de combinar la terapia de IChE con estrógenos, antiinflamatorios o antioxidantes, la aplicación de esta estrategia depende del resultado de los estudios clínicos.

A continuación se describen las diferentes estrategias terapéuticas que se aplican en la actualidad para el tratamiento de la EA, así como las que se encuentran en fase de investigación pero que podrían ser de utilidad en un futuro.

2.1. *Precursores de la ACh*

Una de las primeras estrategias probadas para el tratamiento de la EA fue la administración de lecitina y colina para aumentar la disponibilidad de ésta última y, por tanto, de ACh. Este enfoque consideraba que la velocidad de liberación de la ACh en la sinapsis debía estar relacionada con la velocidad de síntesis de dicho neurotransmisor, que a su vez depende de la disponibilidad de su precursor en la neurona presináptica (Giacobini, 1993). Sin embargo, desde un principio se vio que este tratamiento no producía una mejora clara en los enfermos.

2.2. *Inhibidores de la AChE*

2.2.1. Breve historia de los IChE (Holmstedt, 2000)

El primer IChE descrito de la historia fue la fisostigmina, obtenida a partir de la planta *Physostigma venenosum*, la tóxica haba de Calabar. Su historia va íntimamente ligada al Departamento de Farmacología de Edimburgo, donde Robert Christison realizó

numerosos experimentos con el extracto de Calabar en animales y en él mismo. En 1863, su sucesor, Thomas Fraser, aisló del haba un principio activo amorfo que presentaba las características de un alcaloide vegetal y propuso el nombre de *esere*, nombre con el que se conoce el veneno derivado del Calabar. Este alcaloide fue aislado por primera vez de forma totalmente pura en 1864 por Jobst y Hesse, que le dieron el nombre de fisostigmina. Un año después Vée obtuvo el alcaloide en forma cristalina y le dio el nombre de eserina. Ambos nombres se utilizan aún para designar esta sustancia. Es bien conocido que el extracto de Calabar jugó un papel importante en el conocimiento de la fisiología de la transmisión neurohumoral, es decir, de la forma en que se transmiten los impulsos de un nervio a otro, o de un nervio a un órgano, mediante una hormona, la ACh en este caso. La fisostigmina fue el primer alcaloide en que se supo que actuaba mediante la inhibición de una enzima (Bacq, 1983).

La capacidad de la fisostigmina para producir miosis fue atribuida al grupo uretano que presenta. Esta observación condujo a la síntesis de diferentes compuestos productos de sustituir el citado grupo, entre éstos destaca la neostigmina, sintetizada por Aeschliman y Reinert en 1931 y que se ha usado en el tratamiento de la *miastenia gravis*.

En el siglo XIX se realizaron diversos estudios para conocer los efectos adversos de los anticolinesterásicos, pero hasta 100 años después no se describió el cuadro general de su toxicología. Se vio que la muerte debida a estos compuestos es compleja e implica efectos centrales (parálisis respiratoria y convulsiones) y efectos respiratorios periféricos (aumento de las secreciones y broncoespasmo). Los efectos en el sistema circulatorio consisten en bradicardia, disminución del gasto cardiaco y fenómenos

vasculares periféricos. La muerte puede sobrevenir por asfixia, por los problemas cardiovasculares, e incluso por ambas causa a la vez.

Aunque entonces aún no se sabía, el primer organofosforado con actividad inhibitoria de la AChE había sido ya sintetizado en 1854 por de Clermont, era el tetraetilpirofosfato. Estos IChE, uno de los grupos de más interés en la actualidad, se han usado como insecticidas y gases tóxicos debido a que inhiben la enzima de forma potente e irreversible.

El antagonismo entre la atropina y la fisostigmina, observado por Fraser en los efectos sobre la pupila y la frecuencia cardiaca, llevó al estudio de este mecanismo también en otros procesos. En 1870 Fraser realizó numerosos experimentos con conejos para llegar a demostrar que el efecto letal de la fisostigmina podía evitarse usando atropina como antídoto. Sin embargo, el primer caso en el que se describe el uso del extracto de Calabar como antídoto de la atropina no fue en animales si no en personas, cuando Kleinwächter (1864) usó este extracto en un preso que había ingerido una solución de atropina confundiendo con algún tipo de licor. El resultado fue la prueba de que ambas sustancias se antagonizaban. Este antagonismo atropina-fisostigmina dio lugar a la teoría del receptor de acción del fármaco, aunque fue ya en el siglo XX cuando tomó más cuerpo la idea de que la acción de un fármaco podía deberse a una reacción entre éste y algún constituyente de la célula (Parascandola and Jasensky, 1974).

Desde los inicios de la investigación con los fármacos IChE hasta la actualidad, se han hecho grandes progresos. En un principio, y como suele suceder, el descubrimiento de sus propiedades terapéuticas fue meramente casual, y se ha necesitado una investigación

exhaustiva para llegar al conocimiento actual que se tiene de ellos. La tendencia hoy en día es sintetizar fármacos con actividades más concretas, que inhiban de una forma determinada la enzima y que además posean otras características que puedan beneficiar de algún otro modo a los enfermos de Alzheimer, por ejemplo, frenando la progresión de la neurodegeneración. No obstante, todavía son necesarios más estudios para llegar a conocer de forma precisa el mecanismo de acción de los IChE y para obtener *el fármaco ideal*.

2.2.2. La enzima

Existen dos tipos principales de colinesterasas (ChE) en los vertebrados, AChE y butirilcolinesterasa (BChE), estrechamente relacionadas en su estructura molecular pero con distinta distribución, especificidad de substrato y funciones (Chatonnet and Lockridge, 1989). Ambos tipos constan de subunidades catalíticas globulares que constituyen las formas solubles que se encuentran en plasma y en líquido cefalorraquídeo; en ambos sitios las unidades catalíticas de la enzima están enlazadas a extremos de estructura similar al colágeno o a glucolípidos, que están totalmente fijados a la membrana celular o a la membrana basal de, por ejemplo, el eritrocito o la placa motora terminal.

En las sinapsis colinérgicas, la AChE se fija a la membrana basal de la hendidura sináptica donde se encarga de hidrolizar la ACh liberada. También existe una forma soluble de AChE presente en las terminaciones nerviosas colinérgicas, donde parece ser que regula la concentración de ACh libre, y en plasma (Kosasa et al., 2000). La forma fijada a la membrana también se ha detectado en otros lugares, como en eritrocitos, donde ejerce una función todavía desconocida. Esta enzima es totalmente específica

para la ACh, aunque también inactiva algunos neuropéptidos, como la sustancia P, no obstante se desconoce la significación fisiológica de este hecho (Rang et al., 1999).

La BChE tiene una amplia distribución y se encuentra en tejidos, como hígado, piel, cerebro y músculo liso gastrointestinal, así como en forma soluble en plasma. No está especialmente asociada con las sinápsis colinérgicas y es menos específica en cuanto a sustrato que la AChE. La función de esta enzima no es del todo conocida, aunque actualmente se cree que su papel ha sido infravalorado al pensar que su inhibición tan sólo producía efectos colinérgicos periféricos (Benzi and Moretti, 1998). Recientemente se ha probado que la BChE tiene además una importante función en la hidrólisis constitutiva de la ACh en el SNC, lo cual podría conferir a esta enzima un papel mucho más amplio en la neurotransmisión colinérgica de lo que se pensó inicialmente (Greig et al., 2001; Mesulam et al., 2002).

Las distintas formas de ChE poseen el mismo dominio catalítico, la estructura tridimensional del cual fue conocida gracias a cristalografía de rayos X realizada en la AChE de *Torpedo californica* (Sussman et al., 1991). Este dominio contiene una serina activa que es parte de una tríada catalítica, Glu-His-Ser; este punto no es accesible directamente desde la superficie de la proteína si no que está situado a unos 20 Å de profundidad, al final de una larga y estrecha cavidad denominada *garganta catalítica*. Considerando que la AChE es una de las enzimas más rápidas que se conocen, este hecho es sorprendente ya que parece limitar el paso de sustratos y productos.

AChE y BChE difieren en el volumen del bolsillo acilo que acomoda al grupo de esta naturaleza del sustrato, siendo más grande en el caso de la BChE, lo cual explicaría el

hecho de que la AChE hidrolice la ACh pero no la butirilcolina (BCh), mientras que la BChE puede hidrolizar ambos substratos así como diversos ésteres más. Esta diferencia también explicaría porqué la BChE es sensible a inhibidores de gran tamaño, como el tetraisopropil pirofosforamida (iso-OMPA), mientras que la AChE no (Massoulié, 2000).

Las ChE son inhibidas por diferentes compuestos que actúan de diversas formas, algunos de los cuales se han usado terapéuticamente en la miastenia gravis, glaucoma y EA. Estos inhibidores se pueden clasificar según su sitio de unión a la enzima (Massoulié, 2000). Según este criterio, hay dos grupos de inhibidores que se unen al sitio activo propiamente: los ligandos no-covalentes, como el edrofonio y la tacrina, y los pseudosubstratos, o inhibidores covalentes, que fosforilan, sulfonilan o carbamilan la serina activa; estos últimos incluyen, respectivamente, metrifonato, fluoruro de fenilmetilsulfonilo y fisostigmina y sus derivados. Otros inhibidores, como el propidium y la toxina fasciculina, no penetran en el sitio activo si no que se unen al sitio periférico localizado en la entrada de la garganta catalítica. Finalmente, algunos inhibidores se unen simultáneamente al sitio activo y periférico, como, por ejemplo, el compuesto bis-cuaternario BW284c51. Ambos sitios de la enzima poseen residuos que contribuyen de forma importante a la unión de los ligandos.

La AChE presenta dos formas moleculares: oligómeros homoméricos simples de subunidades catalíticas (monómeros, dímeros o tetrámeros), o bien asociaciones heteroméricas de subunidades catalíticas con subunidades estructurales (Massoulié, 2000; Taylor et al., 2000). Se ha demostrado que un único gen codifica todos los tipos de AChE (Schumacher et al., 1986), sin embargo existe una gran diversidad molecular

como consecuencia de un procesamiento alternativo del RNA_m. Las distintas formas difieren tan sólo en su extremo carboxi-terminal, la porción de gen que codifica el sitio catalítico es invariable, por lo tanto, todas las formas de la enzima muestran idéntica especificidad en cuanto a sustrato e inhibidor. Por otro lado, el gen que codifica la BChE es diferente, aunque estructuralmente relacionado, al de la AChE (Lockridge et al., 1987).

Se han descrito numerosas isoformas de la AChE que, aunque presentan idéntica secuencia aminoacídica, difieren en diversas modificaciones post-translacionales, localización anatómica y funciones. La forma predominante (80%) en el cerebro es la forma globular tetramérica unida a membrana G₄, existiendo una pequeña cantidad del monómero G₁. En la EA se da una pérdida selectiva de la forma G₄ en las zonas de la corteza cerebral e hipocampo, lo que provoca una alteración en la proporción de ambas isoformas (Siek et al., 1990), dando lugar a un predominio de la forma G₁.

Parece ser que no existe una disminución significativa en la actividad de la AChE en la corteza cerebral en el proceso normal de envejecimiento. Por el contrario, en los pacientes con EA sí existe este decremento y, además, la proporción AChE / BChE se ve también alterada a medida que avanza el curso de la enfermedad. Se ha comprobado la presencia de una correlación positiva entre la pérdida de actividad de la AChE y la gravedad de la demencia; también existe correlación entre la pérdida de inervación colinérgica en corteza cerebral y el estado avanzado de la enfermedad (Perry et al., 1978a; Davies, 1979). En la EA la actividad de la AChE disminuye hasta niveles tan bajos como el 10-15% de los valores normales, mientras que la BChE permanece inalterada o incluso incrementa hasta un 20% su actividad (Atack et al., 1986; Arendt et

al., 1992; Giacobini et al., 1989). Alrededor y dentro de las placas neuríticas, sin embargo, el proceso es diferente ya que la actividad de la AChE está incrementada al estar esta enzima estrechamente ligada a la proteína β A. Por otro lado, parece ser que existe un mecanismo compensatorio ante la pérdida de AChE mediante el cual la BChE glial hidroliza la ACh, esto se ha demostrado en experimentos de microdiálisis cerebral (Cuadra et al., 1994; Cuadra and Giacobini, 1995). Así, podríamos decir que existen dos tipos de reservas de ChE funcionales: una reserva neuronal (AChE) que actuaría en condiciones fisiológicas, y otra glial (BChE) que lo haría en situaciones en que la actividad de la primera enzima se encuentra disminuida, como es el caso de la EA. De este modo, se está estudiando la posible utilidad del uso de inhibidores específicos de la BChE en los casos más graves de EA, y además, dado que esta enzima se encuentra también en las placas neuríticas, podría teóricamente disminuirse la formación de proteína β A.

2.2.3. Mecanismo de acción de los IChE

Tanto la AChE como la BChE pertenecen al grupo de enzimas de las serina-hidrolasas. El sitio activo de la AChE tiene dos regiones diferentes: una aniónica que posee un residuo glutamato y otra esterásica con un grupo imidazol de la histidina y uno -OH de la serina. Cuando la hidrólisis tiene lugar, el grupo acetilo de la ACh es transferido a la serina, dejando la enzima acetilada y una molécula libre de colina. La hidrólisis espontánea del grupo acetil-serina se da rápidamente. Los IChE tienen grupos básicos que se fijan al lugar aniónico de la enzima y otros grupos que lo hacen al sitio esterásico. La AChE hidroliza el IChE pero a una velocidad muy lenta (del orden de minutos) en comparación con la gran velocidad de hidrólisis de la ACh (milisegundos), la recuperación de la enzima también se produce de forma mucho más lenta.

2.2.4. Principales IChE usados en la EA

Como se ha comentado anteriormente, los IChE son la aproximación terapéutica más estudiada hasta el momento y la que ha proporcionado los únicos fármacos admitidos por las agencias de medicamentos: tacrina (Cognex®), donepecilo (Aricept®), rivastigmina (Exelon®) y galantamina (Reminyl®). Además, entre los fármacos que se encuentran en distintas fases de estudio se encuentra la huperzina A.

La **tacrina** (Fig. 5), 1,2,3,4-tetrahidro-9-aminoacridina, fue el primer fármaco aprobado para el tratamiento de la EA. Se trata de una aminoacridina de efecto reversible, que inhibe por igual la AChE y la BChE. Este compuesto ha demostrado tener efectos positivos sobre la pérdida de memoria de los pacientes, sin embargo, debido a las altas dosis requeridas para su eficacia terapéutica (120-160 mg/día) y a su baja selectividad, se han descrito diversos efectos indeseables, como molestias gastrointestinales, hepatotoxicidad, etc. (Krall et al., 1999). Los efectos adversos pueden minimizarse aumentando gradualmente la dosis y con controles frecuentes de las enzimas hepáticas, no obstante, la pauta de administración (4 veces/día), también dificulta su uso. A pesar de los problemas descritos, la experiencia y los conocimientos adquiridos gracias a la utilización de la tacrina han permitido orientar el diseño de otros fármacos y conocer más ampliamente la EA.

El **donepecilo** es una benzilpiperidina que ha desplazado en su uso a la tacrina. Se trata de un inhibidor reversible de la AChE, algo menos potente que la tacrina pero con mayor selectividad sobre ésta que sobre la BChE (Sugimoto et al., 1992). Los efectos indeseables son menores, no presenta hepatotoxicidad y tiene una semivida de

eliminación mayor (50-70 h frente a las 1,5-6 h de la tacrina), siendo necesaria una sola administración al día vía oral, con dosis de 5-10 mg/día (Rogers et al., 1998). El gran inconveniente de este compuesto es que, al igual que el resto de IChE utilizados en la actualidad, se produce un rápido empeoramiento del estado del enfermo al suspender el tratamiento, no existiendo beneficios a largo plazo. Además, este compuesto también presenta algunos efectos adversos como, por ejemplo, náuseas, vómitos, diarrea e insomnio (Arenas i Gou, 1998).

La **rivastigmina** ha sido aprobada recientemente en 60 países, incluyendo la Unión Europea y Estados Unidos. Este fármaco pertenece al grupo de los carbamatos, los cuáles inhiben la AChE uniéndose directamente al sitio activo con una cinética reversible lenta y actuando durante más de 10 horas, es por ello que se llaman compuestos pseudoirreversibles (Jann, 2000). Estudios preclínicos y bioquímicos indican que este compuesto actúa preferentemente sobre el SNC más que sobre el sistema nervioso periférico (Enz et al., 1993). Otra ventaja es que su distribución no se ve prácticamente afectada en pacientes con enfermedad renal o hepática. Los efectos adversos más comunes se derivan de la inhibición colinérgica gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea, etc.) y sólo tienen lugar a dosis altas (6-12 mg/día), aunque se ven disminuidos o incluso desaparecen con administraciones más frecuentes y a dosis más bajas del fármaco. Al igual que en el caso del donepecilo, aún no se ha descrito que este compuesto presente problemas de hepatotoxicidad. Además de todo esto, se ha visto que el modo de acción y el metabolismo de la rivastigmina hacen poco probable la presentación de interacciones con otras medicaciones (Birks et al., 2000), lo cual es de particular interés en pacientes con EA de edad avanzada que suelen recibir tratamientos concomitantes.

Además de los fármacos citados, dos aminos de origen natural, galantamina y huperzina A, han despertado gran interés. La **galantamina** es un alcaloide menos potente que la tacrina, pero a la vez menos tóxico. Este compuesto es un inhibidor reversible y selectivo de la AChE, de efecto duradero y de tipo competitivo. La galantamina es 50 veces más efectiva inhibiendo la AChE eritrocitaria que la BChE plasmática; sin embargo, este compuesto es 10 veces menos potente en la inhibición de la AChE cerebral que de la AChE eritrocitaria (Atack et al., 1989). Cuando se administra a pacientes con EA (la dosis recomendada es de 16-24 mg/día), se produce una mejora de la realización de los test de memoria, presentándose algunos efectos colinérgicos que pueden ser minimizados aumentando la dosis de forma progresiva (Thomsen and Kewitz, 1990). A pesar de ser un inhibidor débil de la AChE cerebral, posee igual o superior eficacia clínica que algunos fármacos ya disponibles en el mercado, es por ello que recientemente se ha empezado a hablar de la existencia de una modulación alostérica de los receptores nicotínicos (Lilienfeld, 2002). Anteriormente se ha hablado de los cambios que se producen en el sistema colinérgico en la EA, uno de los cuales es la disminución de los receptores nicotínicos. Mediante la modulación alostérica la galantamina se uniría al receptor por un punto diferente al que lo hace el agonista natural, la ACh, y produciría un cambio conformacional del receptor, mejorando la acción de la ACh y, consecuentemente, la neurotransmisión colinérgica (Davies, 1979; Atack et al., 1986).

La **huperzina A** (Fig. 5) ha probado de forma clara presentar beneficios en la EA y en la miastenia gravis. Se trata de un derivado natural del licopodio *Huperzia serrata* que se ha utilizado en China durante siglos para tratar diferentes patologías. Químicamente

es muy diferente al resto de agentes que se están estudiando para el tratamiento de la EA (Tang and Han, 1999). Es un inhibidor reversible, potente y selectivo de la AChE, que se absorbe rápidamente y que penetra en el SNC con facilidad. En comparación con la tacrina y el donepecilo, la huperzina A tiene una duración de acción mayor y un mejor índice terapéutico. Además, ha demostrado producir una mejoría en la memoria de los pacientes tratados, sin efectos colinérgicos periféricos importantes al administrarse a dosis terapéuticas (0.15-0.25 mg/8h). Una de las características más destacables es que este compuesto reduce la muerte neuronal inducida por glutamato (Ved et al., 1997), demostrando así un efecto neuroprotector.

Entre los inhibidores irreversibles de la AChE se encuentra el **metrifonato** (Perry et al., 1978a). Este organofosforado no es en sí mismo un IChE si no que al absorberse es transformado en **diclorvos**, el cual inhibe de forma irreversible tanto la AChE como la BChE. El hecho de que la recuperación de la actividad de la AChE sea lenta permite que la pauta de administración pueda ser de una dosis al día o incluso a la semana. A pesar de la ventaja que supone esta pauta de administración, este compuesto no presenta la especificidad por las formas cerebrales de AChE que tienen la rivastigmina y el donepecilo (Krall, Sramek, and Cutler, 1999).

2.2.5. Efectos de los IChE sobre otros sistemas

Aunque la acción principal de los anticolinesterásicos es la inhibición de la degradación de la ACh, existen otros puntos que pueden ser importantes al contribuir en la eficacia clínica que han demostrado en el tratamiento de la EA (Giacobini, 1996).

a) Acción sobre los síntomas no cognitivos

Existen evidencias experimentales y clínicas que señalan la existencia de interacciones entre el sistema colinérgico y el sistema de aminas biógenas en la EA (Giacobini, 1996). Se ha obtenido información adicional al respecto gracias a experimentos de microdiálisis cerebral en roedores, midiendo simultáneamente los niveles de ACh y de estas aminas en el SNC (Giacobini and Cuadra, 1994; Giacobini, 1996). En estos experimentos se ha visto que los cambios en los niveles extracelulares de ACh cortical tras la administración de IChE se relacionan con aumentos significativos de noradrenalina y dopamina. Estos resultados podrían ayudar a comprender mejor los efectos conductuales y cognitivos de estos fármacos.

En la EA son frecuentes los síntomas no cognitivos (presentes en casi el 90% de los pacientes), siendo la alteración más frecuente la apatía o indiferencia (70% de los pacientes). La depresión profunda ocurre en el 10-17% de los casos, pero en casi el 40% de los pacientes se dan síntomas moderados de depresión. Los síntomas psicóticos, como alucinaciones y síndromes de identificación errónea, aparecen en aproximadamente el 25-50% de los enfermos (Levy et al., 1999). Distintas consideraciones bioquímicas y farmacológicas sugieren que la deficiencia colinérgica presente en la EA podría estar relacionada con los síntomas psicóticos, lo cual se ve confirmado por el hecho de que los agentes anticolinérgicos (por ejemplo, fármacos antiparkinsonianos y antidepresivos) pueden inducir psicosis, mientras que los agentes colinérgicos, como los IChE y agonistas muscarínicos, producen una mejoría en estos síntomas y reducen la agitación de los pacientes (Gorman et al., 1993).

El primer anticolinesterásico que demostró tener efectos beneficiosos en el comportamiento de los pacientes con EA fue la tacrina (Levy, Cummings, and Kahn-Rose, 1999), además existen algunas evidencias de que el donepecilo podría tener también esta propiedad. Dos estudios diferentes prueban que el metrifonato es particularmente efectivo disminuyendo la agitación, las alucinaciones, la depresión, la apatía y las conductas motoras aberrantes presentes en muchos pacientes (Morris et al., 1998; Cummings et al., 1998). De este modo, una ventaja añadida en el uso de IChE sería la posibilidad de anular la administración concomitante de neurolépticos, evitando sus efectos colaterales potenciales. No obstante, actualmente todavía son necesarios más estudios para entender el complejo mecanismo mediante el cual los IChE afectan la conducta.

b) Interacción con la toxicidad de la proteína β A

El resultado de diversos estudios muestra que las formas de PPA generadas por procesamiento normal del péptido dentro de la región β A son neuroprotectoras, mientras que el procesamiento anormal de este péptido da lugar a una proteína β A con acción neurotóxica (Mattson et al., 1993; Yankner et al., 1990). Además, se ha probado la existencia de una relación entre la neurotransmisión colinérgica y la proteína β A, actuando ésta última como un neuromodulador activo fisiológico (Auld, Kar, and Quirion, 1998).

Los agonistas colinérgicos, así como los IChE, parecen regular el procesamiento y la secreción del PPA (Giacobini, 1997). La estimulación colinérgica de los receptores muscarínicos M_1 y M_3 produce un aumento en la secreción de PPA *in vitro* en varias líneas celulares y en miniprismas de corteza cerebral de rata (Nitsch et al., 1992; Haring

et al., 1994; Farber et al., 1995). Por otro lado, la inhibición a largo plazo de las ChE parece resultar en una activación del procesamiento normal del PPA en el cerebro de pacientes con EA, debido al aumento de los niveles sinápticos de ACh (Giacobini, 1994). La tacrina y los inhibidores fisostigmina, eptastigmina y diclorvos aumentan la liberación del PPA en experimentos de superfusión de miniprismas de corteza cerebral de rata (Mori et al., 1995b).

Actualmente, existen cada vez más evidencias de que los receptores nicotínicos están implicados en los procesos de neuroprotección. La nicotina y los agonistas nicotínicos atenúan la toxicidad inducida por la proteína β A en cultivos neuronales (Kihara et al., 1997), efecto que parece estar mediado por los receptores nicotínicos. De igual modo, los IChE tacrina y donepecilo han probado ser capaces de atenuar la toxicidad inducida por β A(25-35) en células PC12 de rata mediante un mecanismo que, al menos en el caso de la tacrina, para darse también vía receptores nicotínicos (Svensson and Nordberg, 1998).

Se cree además que existe una relación funcional entre el PPA y la AChE ya que esta enzima se encuentra presente en los depósitos de proteína β A en la EA (Moran et al., 1993). La AChE es un potente agente amiloidogénico, lo cual implica que su inhibición podría afectar el procesamiento del PPA y disminuir el deterioro cognitivo de los pacientes, frenando así la progresión de la enfermedad.

c) Efectos sobre los receptores colinérgicos

Aunque la principal acción de la tacrina es la inhibición de la degradación de la ACh, este compuesto ha mostrado otras acciones, como inhibir la recaptación de colina,

producir un incremento de la síntesis y liberación de otros neurotransmisores, además de interaccionar con los receptores colinérgicos y con canales iónicos (Wagstaff and McTavish, 1994). Se cree que existen otros IChE con estas propiedades, pero éste es un tema que debe estudiarse con más profundidad.

En la EA el número de receptores muscarínicos no está alterado, incluso puede darse un aumento de éstos, aunque sí se ha probado una disminución en el subtipo M₂ (Giacobini, 1990; Nordberg, 1992). La tacrina ha mostrado interaccionar con los receptores muscarínicos, presentando igual afinidad por los subtipos M₁ y M₂ (Nilsson et al., 1987; Perry et al., 1988; Flynn and Mash, 1989), mientras que la fisostigmina tiene menos afinidad que la tacrina por los receptores muscarínicos así como por los nicotínicos (Nilsson et al., 1987).

La activación de los receptores nicotínicos tiene interés por sus efectos neuroprotectores y tróficos (Belluardo et al., 2000). Se ha observado que un hecho común a distintos procesos neurodegenerativos es la disminución del número de estos receptores, aunque existen resultados contradictorios con relación al subtipo de receptor implicado. Se ha demostrado que los agonistas nicotínicos protegen a las células de la privación de factor de crecimiento neuronal (NGF) (Yamashita and Nakamura, 1996), de lesiones en diversos núcleos cerebrales (Nanri et al., 1997), o de la acción del MPTP (Whitehouse et al., 1982). Además también favorecen el desarrollo de las neuronas colinérgicas incrementando la expresión de algunos factores de crecimiento (Belluardo et al., 2000). Tras la administración de tacrina se ha visto un incremento en la cantidad de estos receptores en ratas, así como en pacientes con EA (Nilsson-Håkansson et al., 1990; Nordberg et al., 1992). Existe un punto interesante que afecta a estos receptores, varios

IACHe, incluyendo tacrina, fisostigmina y galantamina, poseen la capacidad de unirse de forma alostérica al receptor nicotínico, incrementando así la frecuencia de apertura del canal unido al receptor y protegiéndolo de este modo de la desensibilización, con lo cual se da un incremento de la neurotransmisión colinérgica vía receptores nicotínicos funcionales (Svensson and Nordberg, 1996; Pereira et al., 1994; Maelicke et al., 1997).

Los receptores nicotínicos y muscarínicos no sólo están presentes en las terminaciones colinérgicas, si no que también están en las terminaciones monoaminérgicas, hecho que podría explicar el aumento en la actividad de estos sistemas de neurotransmisión producido por la tacrina (Warpman et al., 1996). De igual modo, otros IACHe también dan lugar a un incremento significativo en los niveles de ACh y en los de noradrenalina, dopamina y serotonina en corteza cerebral de rata tras la administración sistémica (Giacobini, 1997; Cuadra, Summers, and Giacobini, 1994; Mori et al., 1995a; Giacobini et al., 1996), lo cual podría resultar de gran importancia en la práctica clínica de la EA.

d) Interacción con los efectos de los estrógenos

Varios estudios epidemiológicos señalan la posibilidad de que los estrógenos mejoren la función cognitiva y disminuyan el riesgo de sufrir la EA en mujeres post-menopáusicas (Henderson, 1997; Yaffe et al., 1998). Los estrógenos estimulan la actividad de la CAT, participan en la señalización de las vías en que interviene el NGF, mantienen la estructura de las sinapsis, aumentan el flujo sanguíneo cerebral, estimulan la vía no-amiloidogénica del procesamiento del PPA y disminuyen la formación de proteína β A *in vitro* (Xu et al., 1998). Estudios recientes han probado que los efectos neuroprotectores de ciertos estrógenos (por ejemplo, 17β -estradiol) podrían estar mediados por el subtipo α_7 del receptor nicotínico (Svensson and Nordberg, 1999).

Parece ser que el uso concomitante de estrógenos (o estrógenos / progesterona) y un IChE puede suponer mayores beneficios que su uso por separado, este efecto podría implicar un mecanismo de acción alostérico sobre los receptores nicotínicos (Schneider et al., 1996; Giacobini, 1998).

2.2.6 Efectos indeseados

Los IChE, ya sean selectivos o no, producen efectos adversos similares y relacionados con el aumento de la actividad colinérgica central o periférica (náuseas, vómitos, diarrea, mareo, etc.). No obstante, se trata en general de compuestos bien tolerados, teniendo en cuenta que los pacientes suelen tener más de 80 años, que a menudo presentan diversas patologías y que reciben varios fármacos simultáneamente. Los efectos indeseados son generalmente leves o moderados, de corta duración (suelen ocurrir durante la primera y segunda semana de tratamiento) y se resuelven espontáneamente al disminuir la dosis, o bien se pueden atenuar con el uso de antagonistas muscarínicos que no penetren en el SNC, como el glicopirrolato (Giacobini, 2000). Sin embargo, estos compuestos deben usarse con cautela en pacientes con asma grave, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, defectos en la conducción cardíaca, hipertensión o bradicardia severas, y no deberían asociarse con otros fármacos que tengan capacidad de inhibición de las ChE.

2.3. *Otras posibles terapias para la EA*

Aunque, como se ha explicado anteriormente, la causa exacta de la pérdida selectiva de neuronas en la EA no es bien conocida, se han propuesto múltiples factores etiológicos que podrían afectar el desarrollo de la enfermedad. Entender la etiología y la patogénesis puede suponer la base del desarrollo de terapias para disminuir o frenar el

progreso de las lesiones. La figura 4 es una representación de los cambios que se producen y de los posibles factores que los influyen. A continuación se describen los diferentes puntos sobre los que se podría incidir y varias opciones terapéuticas que están siendo estudiadas en la actualidad con posible aplicación en el futuro.

2.3.1. Actuación sobre la proteína amiloide (Fig. 4, ① y ④)

La acumulación de proteína β A y la formación de placas están directamente correlacionadas con la gravedad de la demencia que presentan los pacientes (Naslund et al., 2000). La cascada de procesamiento del PPA puede dar lugar a la producción de proteína β -A42, especie tóxica de la proteína β A. El bloqueo de la producción de la proteína β -A42 es, por tanto, un objetivo interesante dentro de la terapéutica de la EA. Como se ha comentado anteriormente, se ha visto que al menos tres enzimas, α -, β - y γ -secretasa, son responsables de la proteólisis del PPA; la α -secretasa se encarga de la proteólisis no amiloidogénica de este péptido, mientras que la β - y γ -secretasa lo hacen por la vía amiloidogénica favoreciendo la producción de proteína β A a partir de su precursor (Fassbender et al., 2001; Scorer, 2001); la enzima γ -secretasa, que realiza el procesamiento del dominio transmembranal del PPA, no se ha identificado aún (Sisodia et al., 2001). Teóricamente, los inhibidores de la β - y γ -secretasa podrían reducir la producción de depósitos de proteína β A, no obstante, es muy probable que estas enzimas posean otros substratos adicionales, por lo que el hecho de inhibirlas podría dar lugar a efectos adversos.

Además del bloqueo de la formación de placas mediante la inhibición de la formación de β -A42, se está estudiando el uso de anticuerpos para eliminar la β -A42. Se ha probado que la inmunización en los ratones transgénicos PD-APP, que sobreexpresan

una de las formas mutantes asociadas a la EA del PPA humano y que presentan muchas de las alteraciones patológicas presentes en la enfermedad, disminuye la formación de placas e induce la eliminación de las ya existentes (Schenk et al., 1999; Bard et al., 2000; Helmuth, 2000). Parece ser que en este mecanismo estaría implicada la activación de células de la microglía por parte de los anticuerpos contra la proteína β A. Sin embargo, se ha suspendido un ensayo clínico que se estaba realizando con esta inmunoterapia debido a que los participantes desarrollaron signos clínicos compatibles con inflamación en el SNC (Check, 2001). Otra posible aproximación para disminuir los depósitos de proteína β A es la quelación de iones metálicos. El cobre y el zinc son abundantes en los depósitos de β A y el clioquinol, antibiótico quelante de estos dos metales, reduce la deposición de esta proteína en ratones transgénicos (Cherny et al., 2001).

2.3.2. Actuación sobre los ovillos neurofibrilares (Fig. 4, ② y ⑤)

La hiperfosforilación anormal de la proteína tau contribuye a su agregación, que a su vez está correlacionada con la severidad de la demencia. Los posibles tratamientos para reducir la formación de ovillos neurofibrilares incluyen varias quinasas que están implicadas en la fosforilación de esta proteína, particularmente la quinasa-glicógeno-sintasa-3 y la quinasa dependiente de ciclina (Fassbender, Masters, and Beyreuther, 2001; Scorer, 2001). Otro posible punto terapéutico sería inhibir la disfunción de tau inducida por β -A42, éste es un tema de reciente estudio y no es todavía de aplicación práctica (Gotz et al., 2001).

2.3.3. Actuación sobre el estrés oxidativo (Fig. 4, ③ y ⑥)

Se ha sugerido que el estrés oxidativo juega un papel crucial en la patofisiología de la EA ya que se da un aumento de la concentración de productos de la oxidación proteica y de la peroxidación lipídica en tejidos post-mortem de sujetos con EA. Estos cambios pueden atribuirse a un incremento de la formación de radicales libres, más que a una disminución de la actividad antioxidante (Palmer, 1999; Miranda et al., 2000). También existen evidencias de que distintos antioxidantes pueden atenuar el estrés oxidativo provocado por la proteína β A. La selegilina, un inhibidor de la monoaminoxidasa con propiedades antioxidantes, y la vitamina E, dadas juntas o por separado parecen retrasar el progreso de la enfermedad (Sano et al., 1997). Por otro lado, se ha descrito que los estrógenos poseen actividad antioxidante, además de las actividades descritas anteriormente, y reducen el riesgo de sufrir EA en mujeres post-menopáusicas (Behl and Moosmann, 2000). En este momento se están llevando a cabo estudios a largo plazo para determinar la habilidad de estos compuestos para cambiar el curso de la enfermedad (Palmer, 2002).

2.3.4. Actuación sobre la excitotoxicidad y el metabolismo energético (Fig. 4, ⑥)

La excitotoxicidad juega un papel claro en los cambios neurodegenerativos que se producen tras un daño cerebral agudo (Palmer, 1998), pero el papel que desempeña este mecanismo en los desórdenes neurodegenerativos crónicos, como la EA, es menos claro. Posiblemente se trataría de una reacción secundaria al metabolismo energético alterado a causa del estrés oxidativo, que hace que las neuronas sean más vulnerables a los mecanismos excitotóxicos (Mattson et al., 1999). La importancia del metabolismo energético en la EA se ve reforzada por evidencias recientes que prueban que

restricciones en la dieta pueden anticipar la aparición de la enfermedad (Mattson et al., 1999).

2.3.5. Actuación sobre la inflamación (Fig. 4, ⑥)

Se ha demostrado que existen cambios inflamatorios en el cerebro de los afectados por la EA, incluyendo aumento de la concentración de citoquinas pro-inflamatorias y proteínas del complemento, junto a la presencia de microglía activada (Finch, 2001). Existen datos epidemiológicos que indican que el uso de fármacos antiinflamatorios esteroideos, como prednisona, y AINEs, como ibuprofeno o indometacina, está asociado a una disminución del riesgo de EA (Lucca, 1999). Los AINEs, además de reducir la formación de β -A42, limitan la producción de placas en ratones que sobreexpresan genes mutantes que causan EA y activan la microglía de forma generalizada (Weggen et al., 2001). No obstante, aunque la acción antiinflamatoria de los AINEs es debida a la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), parece ser que el bloqueo de la formación de β -A42 se realiza de forma directa, es decir, sin la intervención de la COX, posiblemente mediante la inhibición de la γ -secretasa (Lim et al., 2000). El conocimiento de este mecanismo en más profundidad podría ser útil para el desarrollo de nuevos y mejores tratamientos.

2.3.6. Actuación sobre los niveles de colesterol (Fig. 4, ④)

El colesterol ha demostrado producir un incremento en la inmunoreactividad a la proteína β A en conejos alimentados con dietas ricas en este compuesto; además, la hipercolesterolemia incrementa los depósitos de β A y la formación de placas en modelos de ratones que expresan una forma mutante de PPA. Por otro lado, las estatinas, sustancias que producen una disminución del colesterol, disminuyen la

concentración de proteína βA en cobayas, aunque a dosis mucho más altas de las usadas clínicamente. Estudios epidemiológicos también señalan que concentraciones elevadas de colesterol en suero aumentan el riesgo de EA. No obstante, es necesario conocer este tema de forma más detallada antes de poder aplicarlo en el tratamiento de la EA (Golde and Eckman, 2001; Hartmann, 2001).

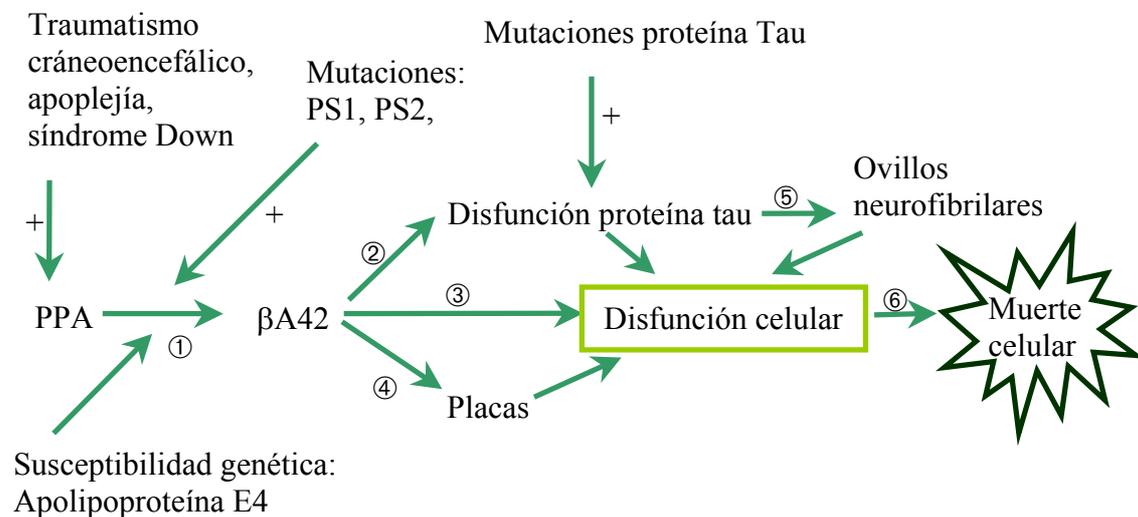


Figura 4. Factores que afectan en la patogénesis de la EA. Los números representan los posibles puntos de actuación terapéutica. Abreviaciones: PPA, péptido precursor de la proteína β -amiloide; βA , proteína β -amiloide; PS, preselinina (Palmer, 2002).

2.4. *Fármacos híbridos tacrina-huperzina A*

Desde 1990, la Unitat de Farmacologia de la Facultat de Medicina de la UAB ha estado colaborando con el Laboratori de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, dirigido por el Dr. Pelayo Camps, con el objetivo de encontrar nuevos derivados anticolinesterásicos que puedan mejorar el perfil terapéutico de los ya existentes y ser, por tanto, empleados en el tratamiento de la EA. La investigación se ha realizado en dos fases, una primera dedicada a la síntesis y evaluación farmacológica de nuevos derivados heterocíclicos obtenidos a partir de la tacrina, y una segunda en que se ha intentado conseguir nuevos fármacos utilizando la posibilidad de hibridación con otro conocido anticolinesterásico que está siendo investigado, la huperzina A.

Fruto de una primera etapa de trabajo, fue la obtención de numerosos derivados con acción anticolinesterásica, algunos de ellos con potencia farmacológica similar a la de la tacrina e incluso con menor toxicidad aguda (Aguado et al., 1994). En la segunda fase, la estrategia seguida fue el análisis de diversos fármacos obtenidos mediante la hibridación de la tacrina con la huperzina A, haciendo múltiples substituciones en diversas partes de la molécula (Badia et al., 1998; Camps et al., 1999; Camps et al., 2000; Camps et al., 2001). Se obtuvieron con ello fármacos que inhibían la AChE con elevada potencia, algunos de ellos en el rango de la nanomolaridad, y con toxicidad aguda relativa menor que la tacrina. Estos fármacos híbridos tacrina-huperzina A, que están demostrando un marcado interés farmacológico, se han denominado *huprinas*, y son el resultado de la síntesis por farmacomodulación conjuntiva de la huperzina A (subestructura carbocíclica) y la tacrina (subestructura 4-aminoquinolina), suprimiendo el grupo etilideno de la huperzina A.

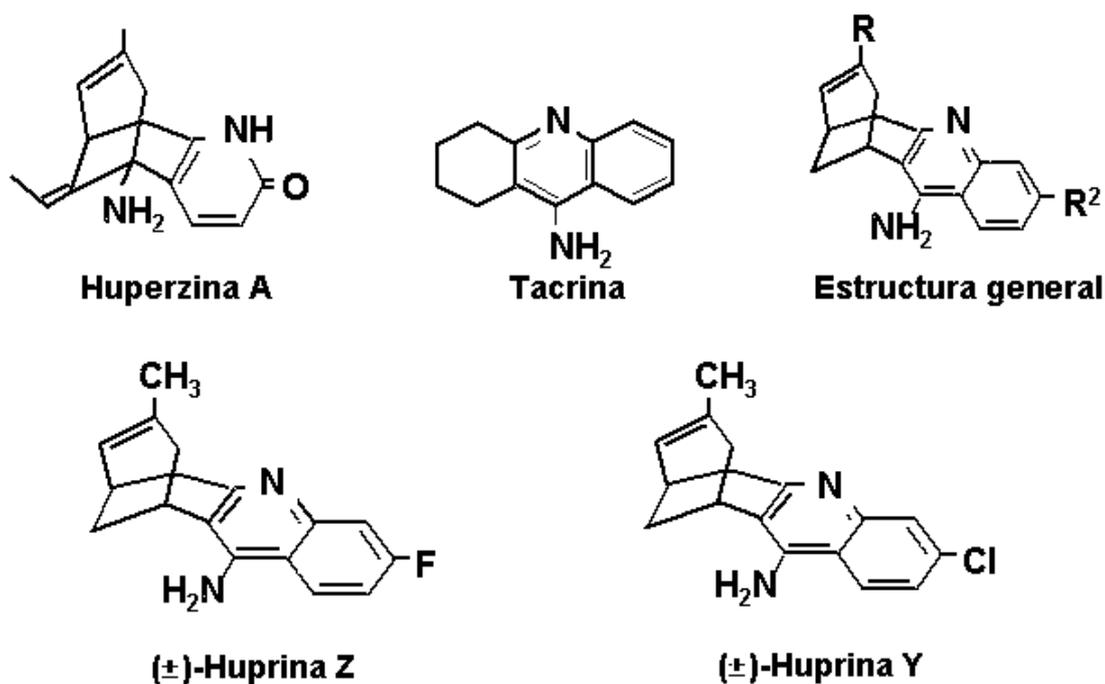


Figura 5. Estructura química de los compuestos huperzina A, tacrina, estructura general de las huprinas, huprina Y y huprina Z.

El trabajo realizado con estos nuevos compuestos se basa en la hipótesis colinérgica de la EA que es la que ha generado el actual abordaje terapéutico de dicha enfermedad. A partir de estudios previos realizados en nuestro departamento, se ha puesto de manifiesto la potentísima actividad anticolinesterásica de las huprinas, superior a la tacrina, huperzina A y a otros anticolinesterásicos utilizados en la actualidad en el tratamiento de la EA. Entre estos fármacos, dos huprinas, **(±)-huprina Y** (rac-12-amino-3-cloro-6,7,10,11-tetrahidro-9-metil-7-11-metanocicloocta[b]quinolina) y **(±)-huprina Z** (rac-12-amino-3-flúor-6,7,10,11-tetrahidro-9-metil-7-11-metanocicloocta[b]quinolina) (Fig. 5) han mostrado en estudios preliminares ser compuestos muy

activos, y es por ello que son el objetivo de estudio de la presente tesis doctoral. Ambos compuestos poseen un grupo metilo en posición 9 y la única diferencia que presentan entre ellos es que la (\pm)-huprina Y, huprina Y a partir de ahora, presenta un átomo de cloro y la (\pm)-huprina Z, huprina Z, uno de flúor en la posición 3.

Objetivos

El principal objetivo de la presente tesis doctoral ha sido realizar la valoración farmacológica específica de los compuestos huprina Y y huprina Z, anticolinesterásicos híbridos tacrina-huperzina A, seleccionados en estudios previos como fármacos de potencial interés para el tratamiento de la EA.

Objetivos específicos:

1. Establecer la actividad inhibitoria enzimática *in vitro* de las huprinas Y y Z sobre la AChE bovina y humana y sobre la BChE humana, y compararla con los compuestos de los cuales derivan, así como establecer las razones de inhibición AChE bovina / AChE humana y BChE / AChE.
2. Determinar si existe una dependencia del tiempo para el efecto anticolinesterásico y si es así, estudiar la reversibilidad de este efecto.
3. Estudiar las características del tipo de inhibición enzimática de la AChE realizada por parte de ambos compuestos.
4. Establecer la actividad anticolinesterásica *ex vivo* en cerebro de ratón de las huprinas para así conocer su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y su eficacia a nivel del SNC, comparándola con la eficacia de otros anticolinesterásicos.
5. Estudiar el curso temporal de los efectos anticolinesterásicos de las huprinas a nivel del SNC en experimentos *ex vivo*.
6. Establecer la dosis a la cual se presentan los primeros efectos indeseables en ratón (*primary over effects*).

7. Conocer la capacidad de ambas huprinas para inhibir las ChE a nivel plasmático en ratón, y tener así una primera aproximación sobre la selectividad de estos compuestos.
8. Establecer su afinidad por los receptores muscarínicos M_1 y M_2 mediante técnicas de fijación de radioligandos.
9. Constatar la actividad agonista muscarínica sobre los receptores M_1 en miniprismas de corteza cerebral de rata, valorando la producción de fosfatos de inositol tras la activación de los mismos.

Material y métodos

1. Material

1.1. Animales de experimentación

Para los estudios *ex vivo* se usaron ratones de la cepa OF-1, macho, con un peso de 37 ± 5 g. En los estudios de fijación de radioligandos y de producción de fosfatos de inositol se utilizaron ratas Sprague-Dawley, macho, con un peso de 350 ± 25 g. Todos los animales fueron suministrados por el estabulario de la Universitat Autònoma de Barcelona. Durante el tiempo de estabulación se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (22 ± 2 °C) y humedad (40-60%), con un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas y con agua y comida *ad libitum*. El procedimiento por el cual los animales fueron sacrificados fue aprobado por la Comissió Ètica de la UAB.

1.2. Reactivos y fármacos

Todos los productos químicos empleados fueron de pureza adecuada para análisis, suministrados por Merck y Panreac.

Tacrina, ácido 5,5'-Ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB), acetilcolina (ASCh), butirilticolina (BSCh), atropina, polietilenimina, tetraisopropilo pirofosforamida (iso-OMPA), 1,5-bis-(4-alildimetilamoniofenil) pentano-3-uno dibromuro (BW284c51), prazosina, mecamilamina y las enzimas AChE bovina y humana y BChE humana fueron obtenidos a través de Sigma Chemical Co (St Louis, U.S.A.); tritón-X-100 de Panreac; eserina de Fluka; carbacol de Merck; la [3 H]-Pirenzepina con actividad específica de 85.6 Ci/mmol de NN Life Science Products, Inc. (Boston, USA); el I-Quinuclidinil[fenil-4- 3 H]benzilato ([3 H]-QNB) con actividad específica de 51.0 Ci/mmol, el [3 H]-inositol (myo-[2- 3 H]inositol) y el líquido de centelleo de Amersham

(Buckinghamshire, UK); la pirenzepina de Boehringer (Barcelona); la resina Dowex 1-X8 (100-200 mesh, forma formiato) de Bio-Rad.

(-)-Huperzina A y donepecilo fueron una generosa donación del Laboratori de Química Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Los compuestos objeto de este estudio, huprina Y y huprina Z, fueron sintetizados en el Laboratori de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona por el grupo de investigadores dirigidos por el Dr. Pelayo Camps.

2. Métodos

2.1. *Determinación de la actividad anticolinesterásica in vitro*

La actividad anticolinesterásica de la huprina Y y la huprina Z se determinó espectrofotométricamente siguiendo el método descrito por Ellman (Ellman et al., 1961). Este método se basa en la reacción siguiente:



La primera parte de la reacción consiste en la degradación de la ASCh por parte de la AChE, produciéndose tiocolina y acetato. En la segunda parte se produce la unión de la tiocolina al reactivo DTNB dando lugar a un producto de color amarillo. De esta forma, la producción de color es un indicador de la cantidad de ASCh degradada por la AChE. La determinación de la actividad inhibitoria de la enzima BChE se realiza de igual modo pero en este caso es la butiriltiocolina (BSCh) la que sirve como substrato.

Como paso previo al estudio de la actividad anticolinesterásica, se determinó la K_m (concentración de sustrato a la cual la enzima funciona al 50% de su velocidad máxima) para la AChE y la BChE. Para ello se añadieron concentraciones crecientes de ASCh o bien BSCh a una cantidad determinada de AChE (0.025 u/ml) bovina o humana o BChE humana (0.035 u/ml), respectivamente. Una vez conocido el valor de esta constante, se trabajó siempre alrededor de esta concentración de sustrato.

A continuación se procedió a determinar la capacidad anticolinesterásica de los distintos fármacos estudiados. Así, la actividad inhibitoria de la AChE se evaluó usando enzima de eritrocitos bovinos y humanos. Se añadieron concentraciones crecientes del inhibidor a una solución que contenía tampón fosfato 0.1 M pH 8.0, DTNB 333 μ M y 0.025 unidades de enzima. Finalmente se añadió ASCh (0.53 mM) como sustrato. La reacción tubo lugar en un volumen final de 3 ml. Las curvas de inhibición se realizaron por triplicado incubando la solución descrita con al menos 12 concentraciones diferentes de cada uno de los inhibidores durante 15 min a 25°C. Uno de los triplicados se incubó en ausencia de inhibidor para permitir que alcanzara el 100% de actividad enzimática y actuar así como control. La reacción se detuvo añadiendo 100 μ l de eserina 1mM y la producción de color se midió a una longitud de onda de 412 nm mediante el espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 equipado con un cambiador automático de 6 células. Se hicieron al menos 6 experimentos para cada fármaco inhibidor. La determinación de la actividad inhibitoria de la BChE se llevó a cabo de forma similar, usando 0.035 unidades de enzima de suero humano y 0.56 mM del sustrato BSCh, en un volumen final de 1ml.

Los datos obtenidos permitieron construir las curvas concentración-inhibición para las huprinas mediante análisis de regresión no lineal usando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software; San Diego, USA), lo cual dio una estimación de la **concentración inhibitoria 50** (CI₅₀), es decir, la concentración de fármaco que inhibe la actividad de la enzima en un 50%. Los resultados se expresaron como la media de CI₅₀ ± EEM (error estándar de la media). Las comparaciones estadísticas se hicieron mediante el test t-Student con un nivel de significación de p<0.05.

Además, se determinó la actividad cruzada para las dos enzimas objeto de estudio (AChE y BChE) con el fin de probar que su actividad podía ser específicamente atribuida a cada uno de ellos. Para esto, un homogeneizado de la enzima y DTNB en las concentraciones antes descritas fue incubado durante 5 min a 37°C con 4 concentraciones diferentes (0.1-100 µM) de iso-OMPA (inhibidor selectivo de la BChE) o BW284c51 (inhibidor selectivo de la AChE), siguiendo el protocolo descrito por Cheng et al. (Cheng and Tang, 1998). A continuación se añadió el substrato y se procedió a la lectura de la absorbancia. Cada experimento se realizó por triplicado y el control (muestra sin inhibidor) representó el 100% de actividad.

2.2. Dependencia del tiempo del efecto anticolinestarásico

La dependencia del tiempo del efecto inhibitorio se determinó para cada huprina con al menos 10 concentraciones crecientes de éstas, tras un periodo de incubación de 30 minutos junto a la AChE. Trascurrido este tiempo, se midió la actividad anticolinesterásica mediante el método de Ellman, tal y como se ha descrito anteriormente. En este conjunto de experimentos, la aparición de producto fue monitorizada a 412 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 equipado con

una cambiador automático de 6 células, en presencia o ausencia de las diferentes concentraciones de inhibidor. El volumen final de incubación fue 1 ml. Se evaluaron los cambios de absorbancia por minuto, es decir, la pendiente. Cada determinación se realizó por triplicado y al menos 4 experimentos completos se llevaron a cabo. De nuevo se determinó la CI_{50} , pero en este caso a los tiempos 0 y 30 min de incubación, mediante regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism. La comparación estadística entre los valores a 0 y 30 min se realizó mediante el test t-Student con un nivel de significación fijado a $p < 0.05$.

2.3. Reversibilidad de la unión

La reversibilidad del proceso de inhibición se determinó mediante diálisis en tubos Visking dialysis (límite de exclusión 8000-15000 Da Serva Feinbiochemica GmbH & Co.). La enzima (0.6 unidades) fue incubada con 25 nM de huprina Y en un volumen total de 6 ml de tampón fosfato. Tras 30 min de incubación a 25°C, la reacción se paró enfriando la muestra mediante un baño de hielo y se determinó la actividad remanente dentro de los tubos de diálisis en 250 μ l de la mezcla añadiendo ASCh 100 μ M como sustrato. Las muestras se dializaron entonces frente a 1000 vol de tampón a 4°C durante 18 h, y se midió de nuevo la actividad remanente dentro de los tubos de diálisis. El mismo protocolo se realizó a 37°C durante 18 h. Los controles se obtuvieron de igual modo pero en ausencia de inhibidor. Las determinaciones se realizaron por triplicado y el número de experimentos fue igual a 3. Esta valoración no se llevó a cabo con la huprina Z debido a que su efecto inhibitorio de la AChE no demostró tener una dependencia del tiempo. La comparación estadísticas entre el valor de inhibición a los 30 minutos y tras 18 h de incubación a 37°C se hizo mediante el test t-Student con un nivel de significación de $p < 0.05$.

2.4. Determinación del tipo de inhibición

Para la determinación del tipo de inhibición de la AChE realizada por ambas huprinas, se hicieron estudios cinéticos siguiendo de nuevo el método de Ellman de la siguiente forma: se midió el incremento de absorbancia por minuto durante 1-3 minutos a 25°C mediante el espectrofotómetro Multiskan Labsystems MS type 352 (Labsystems, Helsinki, Finlandia) a 412 nm, usando 6 concentraciones de ASCh (50, 75, 100, 150, 250, 500 μ M) en presencia de 3 concentraciones de inhibidor (3, 10 y 30 nM huprina Z y 0.1, 0.3 y 1 nM huprina Y) y de la enzima AChE bovina. La huprina Y se preincubó durante 45 min con la AChE para permitir que se alcanzara el estado de equilibrio del proceso. El tipo de inhibición se determinó a partir de la representación de Lineweaver-Burk realizada para la serie de distintas concentraciones de inhibidor. A continuación se calcularon las pendientes de las rectas obtenidas y se representaron frente a la concentración de inhibidor usada. La K_i , constante de disociación del complejo enzima-inhibidor, se extrapoló a partir del punto de intersección de la recta resultante con el eje de abscisas (Segel, 1975). Se realizaron en total 3 experimentos por duplicado para cada uno de los fármacos. La comparación estadística entre los valores de las K_i se realizó mediante el test t-Student con un nivel de significación fijado a $p < 0.05$.

2.5. Determinación de la actividad anticolinesterásica *ex vivo*

2.5.1. Determinación de la DI_{50} del efecto anticolinesterásico en cerebro de ratón

El método utilizado para determinar la actividad anticolinesterásica *ex vivo* fue también el descrito por Ellman, pero con una serie de diferencias respecto al protocolo *in vitro*. Los ratones se trataron por vía intraperitoneal con diferentes dosis de huprina Z o bien

huprina Y. Mediante una serie de experimentos previos realizados en nuestro laboratorio se determinó que la máxima actividad anticolinesterásica de los compuestos se daba a los 20 min post-administración, por lo que se usó este tiempo para sacrificar los animales mediante dislocación cervical. Se extrajeron los cerebros, eliminando el cerebelo, y se homogeneizaron en tampón fosfato 0.1 M pH 8.0 con tritón-X-100 al 0.7% (la función del tritón es romper las membranas para solubilizar la enzima). El volumen de tampón fosfato-tritón se calculó en función del peso del cerebro según la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de tritón (ml)} = \text{Peso cerebro (mg)} / 100 \times 0.4$$

La preparación del tejido se hizo mediante el homogenizador B. Braun Melsungen siguiendo una pauta fija (10 golpes a 900 rpm), durante todo el proceso el tejido se mantuvo a 4°C. A continuación se utilizó una gradilla con múltiples pocillos donde se puso la muestra (diluida 5 veces respecto a la concentración inicial) junto con una solución de tampón fosfato 0.1 M pH 8.0 y DTNB 2 mM. Seguidamente se dejó estabilizar hasta que la lectura de aumento de absorbancia por minuto fue 0, implicando esto que toda la ACh endógena había sido degradada por la AChE cerebral. Una vez llegados a este punto, se añadió el substrato ASCh a una concentración 0.57 mM, coincidiendo aproximadamente con la K_m calculada previamente para la enzima. El volumen final de la solución fue de 400 μ l. Se obtuvieron lecturas en el primer y segundo minuto del aumento de absorbancia por minuto a una longitud de onda de 412 nm usando el espectrofotómetro Multiskan Labsystems MS type 352. La reacción tuvo lugar a temperatura constante (25°C). Como controles se utilizaron cerebros de un mínimo de 3 animales no tratados, representando así la máxima actividad de la enzima

(100%). Debido a la necesaria dilución del tejido en esta técnica, puede producirse una disociación del complejo reversible enzima-inhibidor; para limitar este efecto, la muestra se diluyó tan sólo 20 veces. Se realizaron al menos 6 experimentos por duplicado para cada una de las huprinas. Los porcentajes de inhibición se calcularon comparando la actividad de la AChE en cerebros de ratones tratados con los controles. Se calculó la DI_{50} (dosis que produce un 50% de inhibición de la actividad enzimática) mediante regresión no lineal usando el programa GraphPad Prism software (San Diego, USA) Los resultados se expresaron como la media de DI_{50} y se calculó el intervalo de confianza con un 95% de probabilidad. Además, para comparar con el efecto de las huprinas se utilizó una dosis fija de 10 $\mu\text{mol/kg}$ intraperitonealmente de tacrina, huperzina A y donepecilo, siguiendo el protocolo descrito, en este caso se realizaron 3 experimentos por compuesto, cada uno por duplicado y los resultados se expresaron como la media \pm EEM.

2.5.2. Curso temporal del efecto anticolinesterásico en cerebro de ratón

Para determinar el curso temporal de actuación de los fármacos los animales se trataron con una dosis única aproximadamente igual a la DI_{50} . Las dosis utilizadas fueron 5 $\mu\text{mol/kg}$ de huprina Z y 1.25 $\mu\text{mol/kg}$ de huprina Y. Una vez tratados, se sacrificaron por dislocación cervical a tiempos comprendidos entre 2 minutos y 24 horas. Los cerebros se congelaron y, una vez sacrificados todos los ratones, se homogeneizaron y se hizo la determinación siguiendo el protocolo antes descrito.

En el caso del curso temporal se calcularon dos parámetros: k (constante de eliminación del efecto del fármaco) y $t_{1/2}$ (tiempo de semivida biológica). Para obtener la recta de

desaparición del efecto se siguió un modelo monoexponencial, cuya fórmula es la siguiente:

$$E = E_0 \cdot e^{-k t}$$

donde E es el efecto del fármaco (tanto por ciento de inhibición de la AChE respecto al control), E_0 es el efecto máximo (valor que se toma como valor inicial de esta curva), k es la pendiente de la recta y t es el tiempo. A partir de esta ecuación podemos obtener la siguiente por transformación logarítmica:

$$\ln E = \ln E_0 - kt$$

Cuando t es igual a $t_{1/2}$ obtenemos esta ecuación:

$$t_{1/2} = 0.693 / k$$

Los valores de k representan la media \pm EEM, el $t_{1/2}$ se calculó a partir de k . Se realizaron 3 experimentos para cada huprina, utilizando 6 animales para cada tiempo y realizando cada determinación por duplicado. Los resultados representaron la media \pm EEM. La comparación estadística entre los resultados obtenidos para ambas huprinas se realizó mediante el test t-Student con un nivel de significación igual a $p < 0.05$.

2.5.3. Efecto anticolinesterásico a nivel periférico

Tal y como se ha descrito en el caso de la determinación del curso temporal, se trataron grupos de animales con 5 $\mu\text{mol/kg}$ de huprina Z o bien 1.25 $\mu\text{mol/kg}$ de huprina Y. La

obtención del plasma se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hinz (Hinz et al., 1996). De este modo, una vez transcurridos 20 min, se sacrificaron los animales por dislocación cervical y mediante punción intracardiaca se recogió la máxima cantidad posible de sangre en tubos con 0.1 ml de EDTA 0.3M pH 7.4. Se realizó una centrifugación a 8000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos para separar el plasma. Se añadieron 50 µl de plasma sin diluir a una solución que tampón fosfato 0.1 M pH 8 y DTNB 2 mM, el resto de la determinación se hizo siguiendo el método de Ellman tal y como se ha descrito anteriormente. La cantidad de substrato fue aproximadamente la K_m calculada para las colinesterasas séricas (0.3 mM). Los estudios de efecto anticolinesterásico a nivel periférico se realizaron con un mínimo de 3 experimentos, con 3 animales para cada fármaco y realizando cada determinación por duplicado.

Las comparaciones estadísticas realizadas en los experimentos *ex vivo* para el estudio del efecto sobre las ChE plasmáticas se hicieron mediante el test t-Student con un nivel de significación fijado a $p < 0.05$.

2.6. Estudios de fijación de radioligandos a los receptores muscarínicos

2.6.1. Obtención de las membranas

Se sacrificaron por decapitación ratas Sprague-Dawley de las características citadas anteriormente, se extrajeron los cerebros y se separaron los hipocampos. Éstos se diluyeron en tampón fosfato 10 mM pH 7.4 a razón de 100 mg tejido/15 ml tampón. A continuación se homogeneizaron usando un Polytron (PCU, Suiza), realizando 3 golpes de 5 segundos separados 30 segundos, manteniendo siempre el tejido en un baño de hielo.

2.6.2. Estudios de saturación

En estos experimentos se incubaron por triplicado alícuotas de la suspensión de membranas con concentraciones crecientes de [H^3]-pirenzepina o [H^3]-QNB (en presencia de pirenzepina 10 μ M), en un rango comprendido entre 0.2 y 8 nM. El volumen final de incubación fue de 250 μ l, de los cuales 150 μ l eran de la preparación de tejido y el resto de tampón fosfato 10 mM pH 7.4. La incubación se realizó durante 60 minutos en un baño a 25°C en agitación suave. A continuación se añadieron 4 ml de tampón frío (4°C) y se filtraron rápidamente las muestras sobre filtros de fibra de vidrio Schleicher & Schuell con ayuda de un aparato de filtración al vacío (Cell Harvester Brandel M24R). Con el fin de reducir la fijación inespecífica, los filtros se habían empapado previamente con polietilénimina al 0.1%, al menos durante 30 minutos antes de su utilización, para disminuir la fijación del radioligando al filtro. Después de 3 lavados consecutivos con 4 ml de tampón de incubación a 4°C, los filtros se depositaron sobre viales de contaje y se secaron a 60°C durante 2 horas. Pasado este tiempo se añadieron a los viales 4 ml de líquido de centelleo biodegradable (Amersham Life Science, UK) y se determinó la radiactividad retenida en cada filtro por espectrofotometría de centelleo líquido (contador LKB Wallac 1209 Rackbeta, eficiencia del 60%). La fijación inespecífica, es decir, la proporción de radioligando unido a todo aquello que no sea receptor, se determinó en presencia de una solución de atropina 1 μ M.

Como se ha comentado, en un experimento de saturación se incuban las membranas con concentraciones crecientes de radioligando. Asumiendo que el ligando se une a un número finito de receptores, el fenómeno puede describirse de forma similar al desarrollo de Michaelis-Menten para la interacción enzima-substrato. En su forma más

simple, la unión ligando-receptor puede describirse como una interacción bimolecular del tipo:



Donde [L] es la concentración de ligando libre, [R] la de receptores libres y [LR] la de complejos ligando-receptor. La ecuación que resume este proceso es la siguiente:

$$B = \frac{B_{\max} [L]}{[L] + K_D}$$

en la que B es la cantidad de radioligando fijado en equilibrio, B_{\max} es el número máximo de lugares de fijación y K_D es la constante de disociación del complejo radioligando-receptor (concentración de ligando libre necesaria para obtener un 50% de ocupación). K_D y B_{\max} se miden de una forma sencilla mediante la transformación de Scatchard (Scatchard, 1949). Partiendo de la ecuación anterior, invirtiendo ambos términos y multiplicándolos por B_{\max} se obtiene, después de ordenada, la ecuación de Scatchard:

$$\frac{B}{L} = \frac{B_{\max}}{K_D} - \frac{1}{K_D} B$$

La representación de B/L frente a B da lugar a una recta cuando el ligando se une a un único sitio de fijación, cuya pendiente es $-1/K_D$ y cuyas intersecciones con los ejes de ordenadas y abscisas son respectivamente B_{\max}/K_D y B_{\max} . Sin embargo, la linearización de Scatchard asume que la unión del radioligando se realiza sobre una población

homogénea de receptores, así, para determinar posibles desviaciones de esta premisa, se analizaron los datos experimentales con la linealización de la ecuación de Hill:

$$\log \left[\frac{[B]}{B_{\max} - [B]} \right] = n \log [B] - \log K_D$$

donde n representa la pendiente de la recta y se denomina coeficiente de Hill (n_H). Valores de n_H próximos a 1 indican la existencia de una población homogénea de receptores, mientras que valores distintos ponen de manifiesto la interacción del radioligando con más de un receptor o bien con una población heterogénea de receptores.

Los valores experimentales de fijación se analizaron con el programa LIGAND (Munson and Rodbard, 1980) contenido en el paquete informático RADLIG (ELSEVIER-BIOSOFT). Se realizaron 5 experimentos independientes para cada radioligando, cada uno de ellos por triplicado y los valores obtenidos representaron la media \pm EEM.

2.6.3. Estudios de competición

En estos estudios se valoró la capacidad de las huprinas Y y Z para desplazar la fijación específica de [H^3]-pirenzepina de los receptores muscarínicos M_1 o bien la fijación de [H^3]-QNB (ligando inespecífico de los receptores muscarínicos) en presencia de pirenzepina 10 μ M (para bloquear los receptores M_1) en el caso de los receptores M_2 . Se incubaron por triplicado las muestras con concentraciones crecientes de cada fármaco en presencia de una concentración fija de radioligando próxima a la K_D ([H^3]-pirenzepina 1 nM o bien [H^3]-QNB 2 nM más pirenzepina 10 μ M). La radiactividad

inespecífica se determinó incubando el tejido sin fármaco y con atropina 1 μM . La radiactividad total se midió sustituyendo el fármaco por tampón fosfato pH 7.4. La cantidad de tejido, el medio y las condiciones de incubación fueron idénticas a los usados en los experimentos de saturación.

Los resultados obtenidos en los estudios de competición se analizaron para determinar la CI_{50} , es decir, la concentración de fármaco a la cual se inhibe el 50% de la fijación específica del radioligando, este dato se podría calcular de forma precisa mediante la ecuación de Hill:

$$\log \frac{\%B}{100 - \%B} = -n_H \log [I] + n \log \text{CI}_{50}$$

donde %B es el porcentaje de radioligando desplazado por una concentración [I] de competidor. La representación de $\log [\%B/100-\%B]$ frente a $-\log [I]$ da lugar a una recta la pendiente de la cual es n_H , coeficiente de Hill. El valor de intersección con el eje de abscisas es igual al $-\log \text{CI}_{50}$. Un coeficiente de Hill igual a 1 indica una relación 1 a 1 entre ligando y receptor. Si el valor de n_H es diferente de la unidad, esto indica que se da una interacción más compleja entre ligando y receptor, o bien puede señalar la existencia de una población heterogénea de lugares de fijación. La CI_{50} viene relacionada con la K_i (constante de disociación del competidor frente al sitio de fijación del radioligando) mediante la ecuación de Cheng–Prusoff (Cheng and Prusoff, 1973):

$$K_i = \frac{[\text{CI}_{50}]}{1 + [L] / K_D}$$

Para estos estudios se hicieron un mínimo de 4 experimentos para cada fármaco y receptor, cada experimento se realizó por duplicado. Las CI_{50} , K_i y coeficientes de Hill se calcularon como la media \pm EEM. Las comparaciones estadísticas se hicieron mediante el test t-Student con un nivel de significación fijado en $p < 0.05$. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa de software LIGAND contenido en el paquete informático RADLIG (ELSEVIER-BIOSOFT), ajustando los puntos experimentales mediante regresión no lineal a un modelo de un solo lugar de unión.

2.7. Medida de la hidrólisis de fosfoinosítidos en miniprismas de corteza cerebral

2.7.1. Preparación del tejido

Se sacrificaron ratas Sprague-Dawley mediante decapitación, se extrajo el cerebro y se procedió a diseccionar la corteza cerebral, manteniéndose siempre en hielo. A partir de este tejido se obtuvieron miniprismas de $350 \times 350 \mu\text{m}$ con ayuda de un seccionador de tejidos McIlwain. A continuación se transfirieron los miniprismas a un erlenmeyer que contenía solución Krebs-Henseleit (composición en tabla 1) cuyo pH se había ajustado a 7.4 con carbógeno (95% O_2 -5% CO_2). Seguidamente se incubó el tejido a 37°C en un baño termostático durante 30 minutos con agitación fuerte, para disgregar los miniprismas y permitir la recuperación de la carga energética tras la isquemia sufrida debido al sacrificio del animal.

Tabla 1. Composición de la solución Krebs-Henseleit empleada para la realización de los experimentos de hidrólisis de fosfoinosítidos. El pH de la solución se mantuvo a 7.4 gaseando durante un mínimo de 30 minutos con carbógeno (95% O₂-5% CO₂).

	mM	g/l
NaCl	116.00	6.780
KCl	4.70	0.350
CaCl ₂	1.20	0.176
KH ₂ PO ₄	1.20	0.160
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.20	0.290
Glucosa	11.00	1.980
NaHCO ₃	25.00	2.100

2.7.2. Incorporación de [³H]-inositol a los fosfoinosítidos de membrana

Tras la incubación, se realizaron 3 lavados con tampón Krebs-Henseleit y se transfirieron los miniprismas a un tubo para que sedimentaran por gravedad. Se aspiró el tampón sobrenadante y se resuspendió el tejido en tampón Krebs-Henseleit con [³H]-inositol (17 Ci/mmol) 0.3 μM (éste previamente se había purificado mediante 0.5 ml de resina Dowex 1-X8, forma formiato, 100-200 mesh). Se realizó una incubación de 2 horas a 37°C con agitación suave en un erlenmeyer cerrado herméticamente para conseguir una atmósfera de carbógeno. Cada 30 minutos se renovó esta atmósfera. Finalizado este periodo, se extrajo el medio de marcaje y se lavaron los miniprismas de forma exhaustiva con solución Krebs-Henseleit para eliminar el [³H]-inositol no incorporado por el tejido.

2.7.3. Estimulación de la acumulación de fosfatos de [³H]-inositol

Una vez premarcados los miniprismas con [³H]-inositol, éstos se empaquetaron por sedimentación y se aspiró el sobrenadante. Alícuotas de 50 µl de tejido se transfirieron a tubos de ensayo que contenían Krebs-Henseleit (555 µl en el caso de los tubos utilizados como controles y 500 µl para los que contendrían fármaco). En este caso el tampón llevaba adicionado LiCl 10 mM, con el fin de inhibir la enzima inositol-1-fosfatasa (Berridge et al., 1982) y permitir así la acumulación de los diferentes fosfatos de inositol. Se ha demostrado que la huperzina A presenta una muy baja afinidad hacia los receptores muscarínicos (Tang et al., 1989), afinidad incluso inferior a la que presenta la fisostigmina, es por ello que en el tampón se añadió además (-)-huperzina A 10⁻⁶ M con el fin de evitar que el posible incremento de producción de fosfatos de inositol fuera debido al efecto inhibitorio de la AChE realizado por las huprinas. Como es lógico, la (-)-huperzina A también se utilizó en los estudios con carbacol para conseguir unas condiciones homogéneas en todos los experimentos. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los tubos se gasearon con carbógeno y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. En los tubos que así lo requerían, se incubaron tan sólo 500 µl de Krebs-LiCl y posteriormente se añadieron 55 µl de soluciones a diferentes concentraciones de carbacol (agonista muscarínico clásico), huprina Z o huprina Y. Cuando se utilizaron antagonistas, éstos se añadieron 20 minutos antes que los agonistas, es decir, al inicio del periodo de incubación. Tras añadir los 55 µl de fármaco, se procedió a incubar los tubos durante 40 minutos. A continuación se paró la reacción añadiendo 2 ml de la solución cloroformo/metanol/clorhídrico (20/40/1,v/v/v) a 4°C y se pusieron los tubos en hielo.

Se incluyó una serie de tubos en los cuales el tejido se añadió sobre el medio de incubación con la mezcla cloroformo/metanol/clorhídrico (20/40/1,v/v/v) ya incorporada. Estos tubos se utilizaron para determinar el *tiempo cero* (Lee and Fain, 1992), indicando los fosfatos de inositol presentes en el medio que no son debidos a la estimulación a través de receptores. La cantidad de fosfatos de inositol correspondientes al *tiempo cero* fue restada a cada uno de los valores experimentales obtenidos.

A continuación se añadieron 0.63 ml de cloroformo y 1.23 ml de agua para ayudar a la separación de las fases. Finalmente se agitaron los tubos vigorosamente y se centrifugaron a 1500xg durante 10 minutos para acabar de completar la separación.

2.7.4. Separación de los fosfatos de [³H]-inositol

Los fosfatos de [³H]-inositol presentes en la fase acuosa se separaron mediante cromatografía de intercambio aniónico. Se extrajeron alícuotas de 2 ml de la fase acuosa (superior) se diluyeron con 5 ml de agua y se pasaron a través de columnas de plástico rellenas con 0.5 ml de resina Dowex 1-X8 (forma formiato, 100-200 mesh). El [³H]-inositol se lavó de las columnas con 15 ml de agua. Posteriormente se pasaron 6 ml de formiato sódico 60 mM/ tetraborato sódico 5 mM para eluir el [³H]-glicerofosforilinositol. Los fosfatos de [³H]-inositol se eluyeron con 5 ml de formiato amónico 1 M/ ácido fórmico 0.1 M, según el protocolo descrito por Berridge (Berridge et al., 1982).

Se tomaron alícuotas de 0.5 ml de las fracciones eluidas, se adicionó 4.5 ml de líquido de centelleo y finalmente se procedió a su contaje durante 5 minutos en un contador de centelleo LKB Wallac de emisión β .

Tras la elución de los fosfatos de [³H]-inositol, las columnas se lavaron rutinariamente con 15 ml de ácido fórmico 1 M y 15 ml de tampón Tris-fórmico (10 mM pH 7.4), guardándose después a 4°C en ácido fórmico 0.1 M. Antes de reutilizar las columnas, se equilibró el pH de la resina con 30 ml de tampón Tris-fórmico. Este ciclo de lavado y regeneración se realizó 4 veces sin observarse una disminución en la eficacia de la resina (Minneman and Johnson, 1984).

La cantidad de [³H]-inositol incorporada a los fosfoinosítidos de membrana se determinó en alícuotas de 200 µl de las fases orgánicas. Tras dejar evaporar el cloroformo durante una noche, se añadieron 2 ml de líquido de centelleo y se contó la radiactividad.

2.7.5. Cáculos

Los resultados se expresaron como porcentaje de la radiactividad en la fracción acuosa con respecto a la radiactividad total, es decir, la suma de la radiactividad de ambas fases, ya que ésta es proporcional a la cantidad de [³H]-inositol incorporado y al tamaño de la muestra. Los valores de estimulación con agonista se expresaron como porcentaje sobre el valor basal, que representó el 100%. Se realizaron un mínimo de 5 experimentos para cada fármaco y se calculó la CE₅₀ (concentración eficaz 50; concentración que produce un 50% del efecto máximo observado) para cada uno de ellos, los resultados se expresaron como CE₅₀ ± EEM. Cuando se estudió la reversión de la producción de fosfatos de inositol realizada por inhibidores de distintos receptores, se utilizaron concentraciones de los fármacos (carbacol, huprina Z o huprina Y) próximas a las CE₅₀ previamente determinadas.

Las comparaciones estadísticas de la reversión de la producción de fosfatos de [³H]-inositol se realizaron mediante el test t-Student con un nivel de significación fijado en $p < 0.05$.

Resultados

1. Actividad inhibitoria enzimática *in vitro* sobre la AChE y sobre la BChE

1.1. Actividad cruzada de las enzimas

Antes de iniciar los experimentos que permitieran conocer la capacidad de las huprinas para inhibir las ChE, se determinó la actividad cruzada para las dos enzimas objeto de estudio (AChE y BChE) y así probar que su actividad era específica. En las condiciones descritas en el apartado de métodos, se incubó un homogeneizado de la enzima, sustrato y DTNB con 4 concentraciones diferentes (0.1-100 μM) de iso-OMPA (inhibidor selectivo de la BChE) o BW284c51 (inhibidor selectivo de la AChE). De este modo se vio que el inhibidor iso-OMPA no actuaba sobre la AChE en absoluto, pero en cambio inhibía la BChE con una CI_{50} de $8.00 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ($n=3$). Por otro lado, el compuesto BW284c51 inhibió ambas enzimas, pero con una actividad significativamente inferior sobre la BChE (CI_{50} : $1.00 \pm 0.12 \mu\text{M}$ para la AChE frente a $22.00 \pm 1.15 \mu\text{M}$ para la BChE; $n=3$). A pesar de existir algo de actividad de este último inhibidor sobre la BChE, no se debe concluir que la enzima sea menos pura si no que debe tenerse en cuenta las características del bolsillo acilo de la AChE (más pequeño que el de la BChE) comentadas en la introducción de esta tesis. Esta diferencia explicaría por qué la BChE es sensible a inhibidores de gran tamaño como el iso-OMPA, mientras que la AChE no lo es, y por qué el BW284c51 presenta cierta actividad sobre ambas enzimas.

1.2. Efectos *in vitro* sobre la AChE eritrocitaria bovina y humana y sobre la BChE humana

En primer lugar se procedió a determinar la CI_{50} para cada uno de los fármacos, es decir, la cantidad necesaria para inhibir la actividad máxima de la enzima en un 50%. Las curvas de inhibición se determinaron por triplicado incubando al menos 12 concentraciones del inhibidor durante 15 minutos, y se hicieron un mínimo de 6 experimentos para cada fármaco. Como controles se utilizaron soluciones en ausencia de los fármacos inhibidores, representando así la máxima actividad enzimática (100%), y se calculó el tanto por ciento de inhibición de la enzima para cada una de las concentraciones de fármaco. De este modo se obtuvieron las curvas de inhibición de las enzimas para cada una de las huprinas (Fig. 6). Los mismos experimentos se realizaron también para la tacrina y la huperzina A, aunque las gráficas no se han representado aquí.

En la tabla 2 se representan los valores de las CI_{50} , así como los datos comparando la inhibición de la AChE humana frente a la bovina y frente a la BChE humana para la huprina Y, huprina Z, (-)-huperzina A y tacrina, sirviendo las dos últimas como compuestos de referencia. Ambas huprinas se mostraron más activas que la tacrina y la (-)-huperzina A como inhibidores de la AChE. Respecto a la actividad inhibitoria de la BChE, la tacrina resultó aproximadamente 5 veces más activa sobre la BChE que sobre la AChE humana, mientras que la (-)-huperzina A y las dos huprinas fueron más selectivas de las AChE bovina y humana. Un hecho remarcable es que tanto la huprina Y como la huprina Z mostraron mayor actividad sobre la BChE que la (-)-huperzina A. Por otro lado, ambas huprinas presentaron una mayor selectividad por la AChE humana que por la bovina.

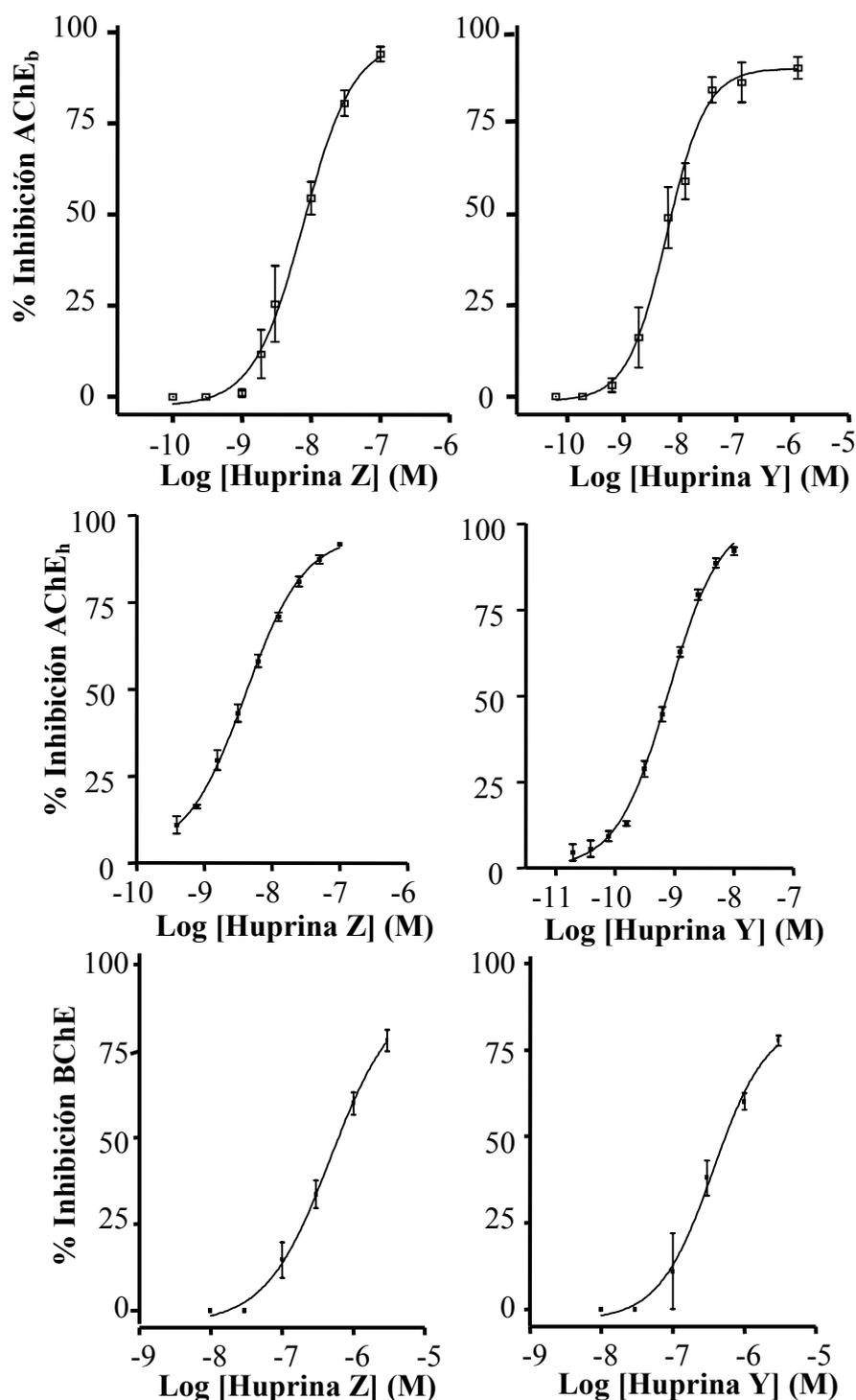


Figura 6. Curvas concentración-respuesta del efecto inhibitorio *in vitro* de la huprina Y y huprina Z sobre la AChE eritrocitaria bovina (AChE_b) y humana (AChE_h) y sobre la BChE sérica humana. Cada punto representa la media del tanto por ciento de inhibición para cada concentración de fármaco \pm EEM, con un mínimo de 6 experimentos. En abscisas se ha representado el logaritmo de la concentración de fármaco.

Tabla 2. Actividad inhibitoria *in vitro* de huprina Y, huprina Z, (-)-huperzina A y tacrina sobre la actividad de las enzimas AChE y BChE

Fármaco	CI ₅₀ (nM)						¹ Ratio AChE bovina/ humana	² Ratio BChE humana/ AChE humana
	AChE bovina	n	AChE humana	n	BChE humana	n		
(±)-huprina Y	6.98±0.42	8	0.78±0.02	6	290.20±49.66	8	8.95	372.05
(±)-huprina Z	5.09±1.05	8	4.58±0.19	6	477.10±30.00	8	1.11	104.17
(-)-huperzina A	74.05±5.50	6	260.03±18.10	6	>10000	6	0.28	>38.45
Tacrina	130.00±10.10	6	205.08±18.00	6	43.90±17.00	6	0.63	0.21

¹ CI₅₀ AChE bovina / CI₅₀ AChE humana

² CI₅₀ BChE humana/ CI₅₀ AChE humana

Los datos representan la media ± EEM del numero de experimentos indicado, cada uno de los cuales fue realizado por triplicado

2. Dependencia del tiempo y reversibilidad de la actividad inhibitoria sobre la AChE bovina

Al estudiar la dependencia del tiempo del efecto inhibitorio realizado por las huprinas Y y Z sobre la AChE bovina, se pudo comprobar que la huprina Y muestra una CI_{50} inferior tras una incubación de 30 minutos del fármaco junto a la enzima comparativamente con lo que ocurre en las mismas condiciones experimentales pero sin incubación previa, lo cual pone de manifiesto un aumento de la actividad anticolinesterásica en función del tiempo (Tabla 3). La huprina Z, en cambio, no mostró esta dependencia del tiempo para el efecto inhibitorio de la AChE.

Tabla 3. Actividad inhibitoria de la AChE bovina realizada por la huprina Y y por la huprina Z a dos tiempos diferentes de incubación

Fármaco	n	CI_{50} (nM)	
		0-min de incubación	30-min de incubación
(±)-huprina Y	4	2.45 ± 0.51	0.59 ± 0.10 ^a
(±)-huprina Z	4	7.41 ± 0.81	7.59 ± 1.22 ^b

^a $p < 0.05$ vs 0-min de incubación (test t-Student)

^b n.s. respecto a 0-min incubación (test t-Student)

Los datos representan la media ± EEM del número de experimentos indicado, cada uno de los cuales fue realizado por triplicado

Para determinar si la inhibición de la AChE realizada por la huprina Y era reversible o no, se incubó la enzima durante 30 minutos a 25°C con una cantidad de este fármaco que produjera aproximadamente una inhibición del 90%, y se dializaron entonces las muestras. Como se puede ver en la figura 7, la actividad no se recuperó totalmente tras una diálisis a 4°C durante toda la noche. Sin embargo, cuando el complejo enzima-inhibidor se dializó a 37°C durante 18 horas, se obtuvo una recuperación total de la actividad enzimática, lo cual indicaría la posibilidad de que un proceso de inhibición *tight-binding* estuviera implicado en el mecanismo de acción de la huprina Y.

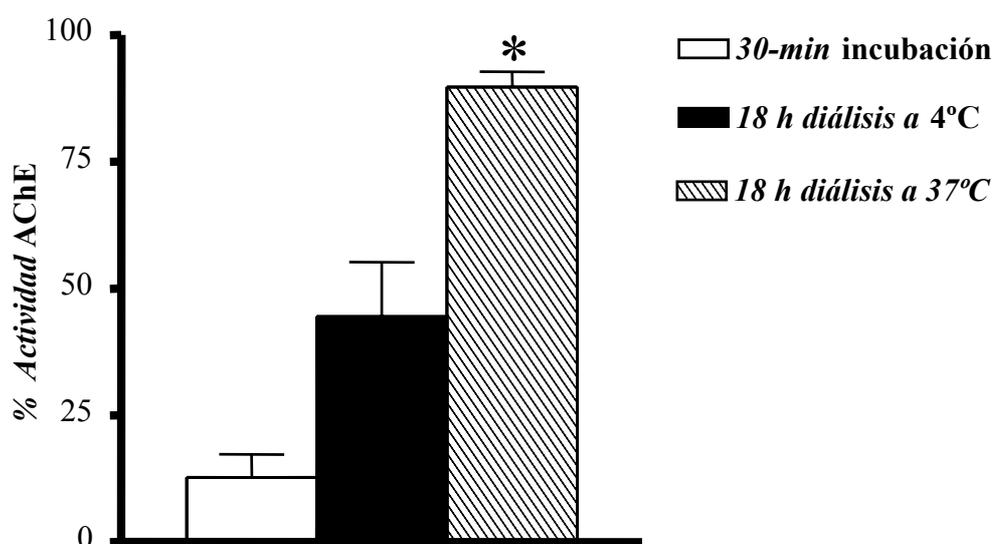


Figura 7. Actividad de la AChE bovina tras 30 minutos de incubación con huprina Y 25 nM (columna blanca) y tras la diálisis durante 18 h a 4°C (columna negra) o a 37 °C (columna rayada). * $p < 0.01$ (test t-Student) para la inhibición de AChE hecha por la huprina Y tras la diálisis a 37 °C, comparada con la actividad tras 30 minutos de incubación sin diálisis. Las barras verticales representan el error estándar de la media de tres experimentos independientes, cada uno de los cuales se realizó por triplicado.

3. Determinación de tipo de inhibición enzimática

En otro grupo de experimentos se determinó el tipo de inhibición de la AChE bovina que realizan ambas huprinas. Para ello se llevaron a cabo estudios cinéticos siguiendo el método de Ellman y usando 6 concentraciones de ASCh en presencia de 3 concentraciones de inhibidor, ya fuera de huprina Y o de huprina Z, y de la enzima AChE bovina. La huprina Y se preincubó durante 45 min con la AChE para permitir que se alcanzara el estado de equilibrio de la inhibición enzimática. El tipo de inhibición se determinó a partir de la representación de Lineweaver-Burk realizada para la serie de distintas concentraciones de inhibidor. A partir de estas representaciones se calcularon las pendientes y se representaron frente a la concentración de inhibidor usada. La K_i se extrapoló a partir del punto de intersección de la recta resultante con el eje de abscisas. La figura 8 (a, b) muestra las representaciones de Lineweaver-Burk (1/velocidad frente a 1/substrato) para ambas huprinas. Estas gráficas prueban la existencia de un patrón de inhibición mixta en los dos casos, ya que tanto la pendiente como el punto de intersección con el eje de ordenadas aumentan al incrementar la concentración de fármaco usada. Las rectas representadas en las figura 8 (c, d) permitieron calcular el valor de K_i ((±)-huprina Y 0.42 ± 0.10 nM; (±)-huprina Z 11.40 ± 0.34 nM; $n = 3$), la cual resultó significativamente inferior en el caso de la huprina Y ($p < 0.001$).

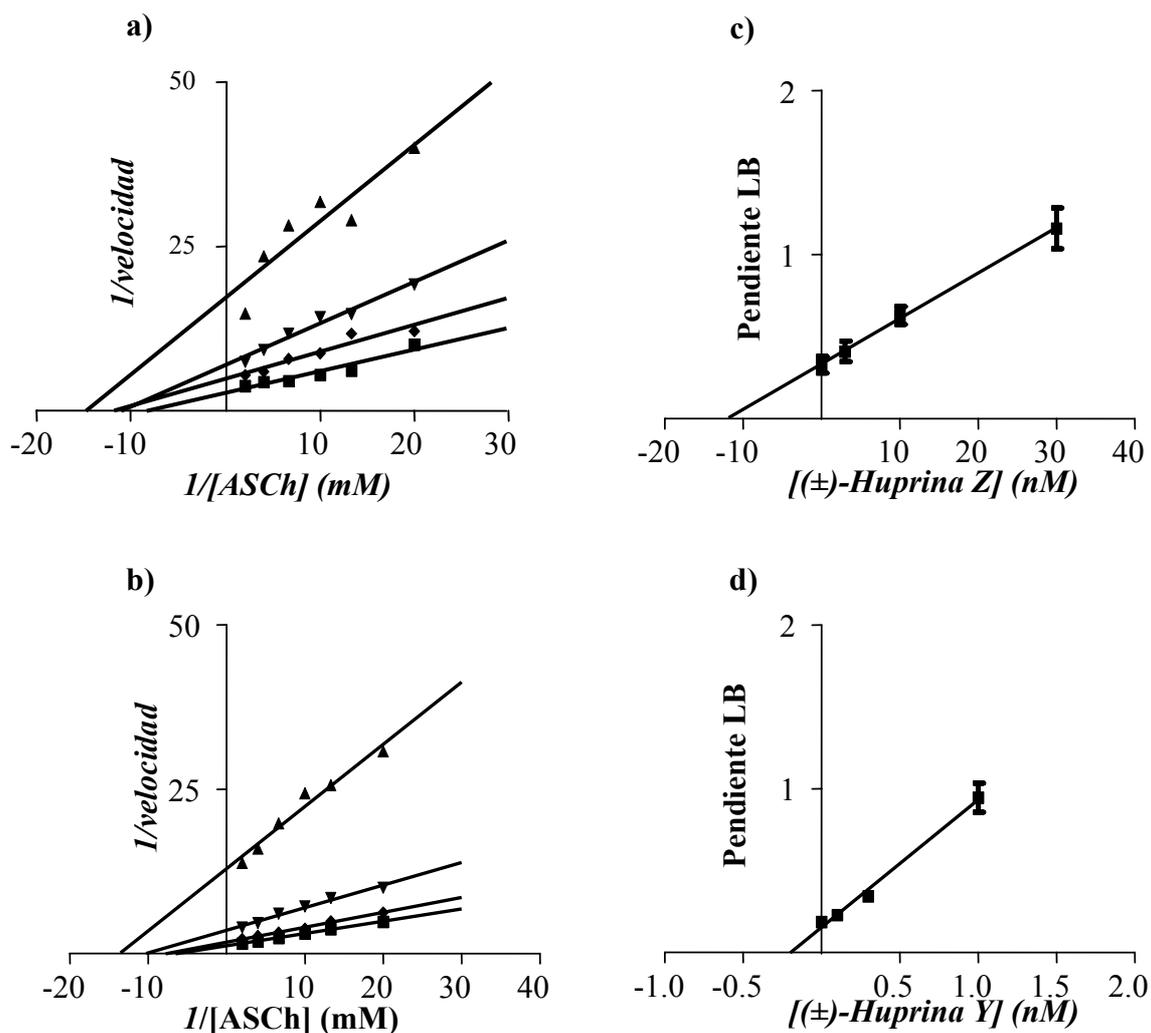


Figura 8. Ejemplo representativo de los experimentos realizados para conocer el tipo de inhibición de la AChE realizada por las huprininas Y y Z. a) y b) son las representaciones de Lineweaver-Burk (LB) en las que se presentan las inversas de la velocidad de hidrólisis del sustrato frente a las inversas de la concentración del mismo. Las concentraciones de huprina Z usadas en a) fueron 0 nM (■), 3 nM (◆), 10 nM (▼) y 30 nM (▲); las concentraciones de huprina Y usadas en b) fueron 0 nM (■), 0.1 nM (◆), 0.3 nM (▼) y 1 nM (▲). c) y d) representan las pendientes de las rectas obtenidas en a) y b) frente a la concentración de inhibidor. Los valores de K_i fueron calculados como el punto de intersección con el eje de abscisas de las representaciones c) y d).

4. Actividad inhibitoria *ex vivo* sobre la AChE de cerebro de ratón

El estudio *ex vivo* de la capacidad inhibitoria de la huprinas se realizó con el fin de tener una estimación de su potencia *in vivo* y de la penetración en el SNC, así como para conocer, además del curso temporal de los efectos anticolinesterásicos, la dosis a la que se presentan los primeros efectos adversos y la capacidad de inhibir las colinesterasas a nivel periférico.

4.1. Determinación de la DI_{50} para la actividad anticolinesterásica *ex vivo*

En estudios previos se había determinado que el pico de inhibición de la enzima, tras administrar intraperitonealmente 2.5 $\mu\text{mol/kg}$ de cada uno de los fármacos, se daba aproximadamente a los 20 minutos post-administración, por este motivo se seleccionó este tiempo para la determinación de las DI_{50} de las huprinas. Los animales se trataron con diferentes dosis de fármaco y se sacrificaron, como se ha indicado, 20 minutos después, a continuación se extrajeron los cerebros y se homogeneizaron, diluyéndolos de forma que la cantidad de enzima endógeno presente en la muestra no fuera un factor limitante. En estas condiciones se midió el tanto por ciento de inhibición de la AChE para cada dosis de fármaco respecto a los animales no tratados (controles). El ajuste de los datos experimentales a una curva concentración-respuesta, mediante regresión no lineal, permitió calcular los valores de DI_{50} de ambas huprinas (Fig. 9). Los resultados obtenidos están representados en la tabla 4. Se puede observar que la huprina Y resultó ser el derivado más activo, siendo su DI_{50} aproximadamente 5 veces inferior a la de la huprina Z, existiendo una diferencia significativa entre ambas sustancias dado que los intervalos de confianza con un 95% de posibilidad no se solapan.

Tabla 4. Inhibición *ex vivo* de la AChE de cerebro de ratón realizada por los fármacos huprina Y y huprina Z

Fármaco	DI ₅₀	IC95%	n
(±)-huprina Y	1.09	(0.39, 2.98)	6
(±)-huprina Z	5.77	(3.24, 10.30)	6

DI₅₀ = dosis de fármaco ($\mu\text{mol/kg}$) que produce un 50% de inhibición de la actividad de la AChE cerebral de ratón.

IC95% = intervalo de confianza para la DI₅₀ con un 95% de probabilidad.

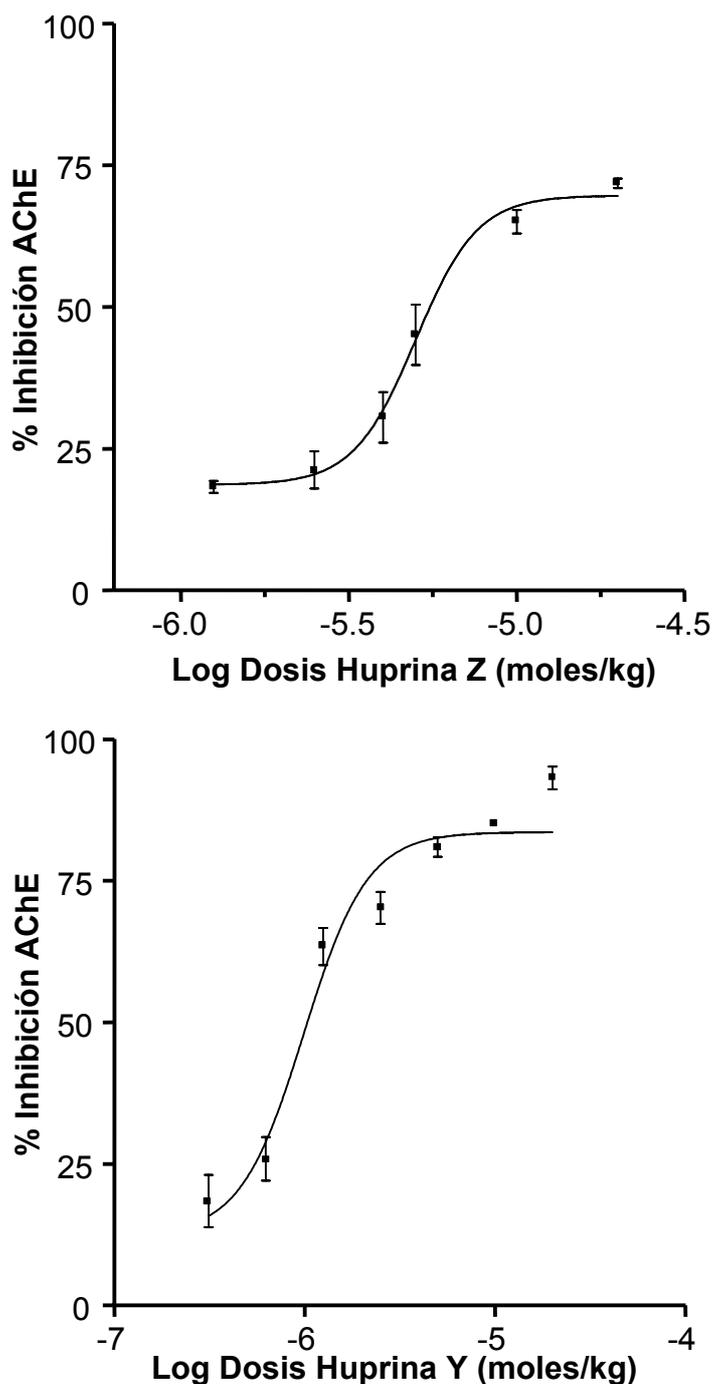


Figura 9. Curva dosis-efecto *ex vivo* de la actividad inhibitoria de huprina Y y huprina Z sobre la AChE de cerebro de ratón. El efecto del fármaco se midió como el tanto por ciento de inhibición de la AChE respecto a los controles. Los valores son la media del tanto por ciento de inhibición para cada dosis \pm EEM (ordenadas). En abscisas se ha representado el logaritmo de las dosis de fármaco utilizadas.

4.2. Curso temporal del efecto anticolinesterásico *ex vivo*

Para realizar el estudio del curso temporal del efecto inhibitorio de la AChE cerebral murina realizado por las huprinas, se utilizaron dosis alrededor de las DI_{50} estimadas previamente. Así, se trataron los animales con 5 $\mu\text{mol/kg}$ de la huprina Z o bien 1.25 $\mu\text{mol/kg}$ de la huprina Y. El valor que se determinó fue de nuevo el tanto por ciento de inhibición de la enzima respecto al control, pero en esta ocasión se realizaron los sacrificios a tiempos comprendidos entre 2 minutos y 24 horas, obteniendo una curva efecto-tiempo característica (Fig. 10). Para poder comparar el efecto de ambos fármacos, se calculó el tiempo de semivida biológica ($t_{1/2}$), es decir, el tiempo que tarda en reducirse a la mitad el efecto del fármaco. Para poder determinar este dato, se tomó la porción de la curva en que disminuye el efecto y se transformó en una recta siguiendo un modelo monoexponencial. Esto permitió calcular el valor de k y, a partir de él, el valor de $t_{1/2}$, ambos parámetros están detallados en la tabla 5. Como puede observarse, no existen diferencias significativas entre el $t_{1/2}$ de la huprina Y y el de la huprina Z, siendo en ambos casos próximo a 1 hora.

Anteriormente se ha comentado que para realizar estos experimentos se utilizó aproximadamente la DI_{50} de ambos fármacos, sin embargo, en la curva efecto-tiempo representada en la figura 10 se puede ver que el efecto máximo conseguido en el caso de la huprina Y fue superior al 50%. Esto es debido a que la dosis inyectada de compuesto fue ligeramente superior a su DI_{50} , simplemente para facilitar su preparación, resultando en un incremento significativo en la inhibición de la enzima al presentar esta huprina una alta actividad sobre la AChE. No obstante, este hecho no afectó a la validez de los

resultados, pudiéndose comparar de igual modo la actividad de la huprina Y con la huprina Z.

Tabla 5. Parámetros de desaparición del efecto inhibitorio de huprina Y y huprina Z sobre la AChE de cerebro de ratón

Fármaco	k	$t_{1/2}$	n
(±)-huprina Y	0.66 ± 0.04	1.048	3
(±)-huprina Z	0.67 ± 0.10^a	1.039	3

k = - pendiente de la recta de desaparición del efecto de los fármacos.

$t_{1/2}$ = tiempo de semivida biológica (horas).

n = número de experimentos (cada experimento representa seis animales para cada tiempo).

^a n.s. respecto a huprina Y ($p > 0.05$, test t-Student)

Los resultados de k son la media \pm EEM del número de experimentos realizados por duplicado.

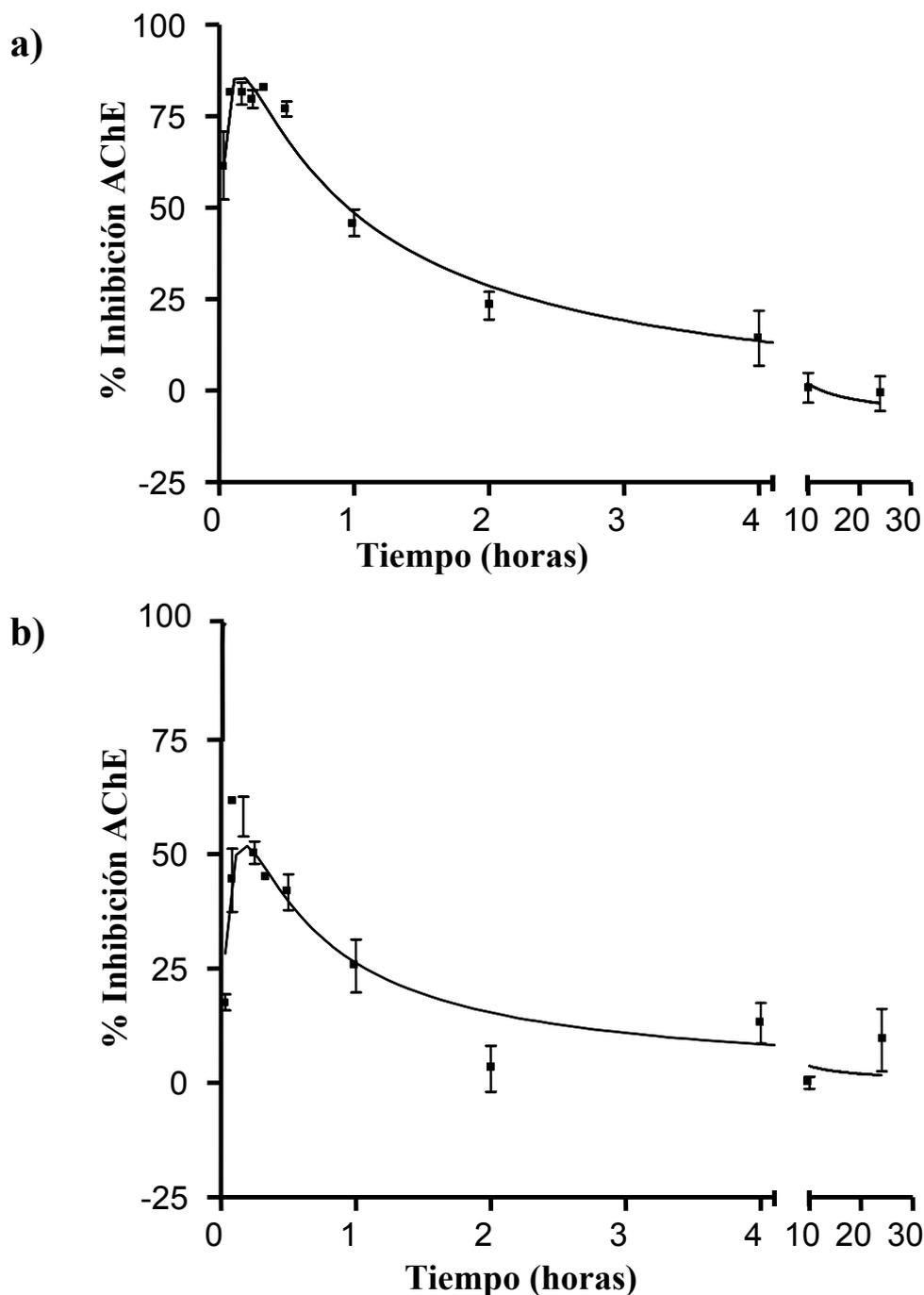


Figura 10. Evolución del efecto de los fármacos huprina Y (a) y huprina Z (b) sobre la AChE de cerebro de ratón respecto al tiempo. Las dosis utilizadas fueron $5 \mu\text{mol/kg}$ para la huprina Z y $1.25 \mu\text{mol/kg}$ para la huprina Y. La actividad del fármaco se representa como el tanto por ciento de inhibición de la AChE respecto a los controles (ordenadas). Cada valor representa la media de la actividad del fármaco para cada tiempo respecto a los controles \pm EEM.

4.3. Comparación del efecto *ex vivo* de las huprinas con otros anticolinesterásicos

Con el fin de conocer la eficacia relativa de las huprinas Y y Z respecto a otros anticolinesterásicos, se realizaron experimentos *ex vivo* con los compuestos donepecilo, tacrina y huperzina A a dosis fijas. En estos experimentos se administraron los distintos compuestos por vía intraperitoneal y se sacrificaron los animales 20 minutos después, siguiendo el mismo protocolo usado para las huprinas. El donepecilo, a una dosis de 10 $\mu\text{mol/kg}$, produjo una inhibición de la AChE cerebral igual a $37.88 \pm 4.27\%$ (n=3). La máxima dosis usada de tacrina, 10 $\mu\text{mol/kg}$, no produjo una inhibición significativa de la enzima. Por otro lado, a dosis de 20 $\mu\text{mol/kg}$, la huperzina A tan sólo inhibió la actividad de la enzima un $41.82 \pm 1.24\%$ (n=4), y a 10 $\mu\text{mol/kg}$ $32.83 \pm 2.11\%$ (n=4). Por tanto, en ninguno de los tres casos se llegó a la determinación de la DI_{50} a pesar de usar dosis elevadas; algunos de los animales que formaban parte del experimento murieron al usar dosis mayores, lo cual impidió seguir con el estudio. En la figura 11 se representa la inhibición de la AChE cerebral de ratón para diferentes compuestos administrados a dosis de 10 $\mu\text{mol/kg}$ por vía intraperitoneal junto a los resultados obtenidos previamente para las huprinas a la misma dosis.

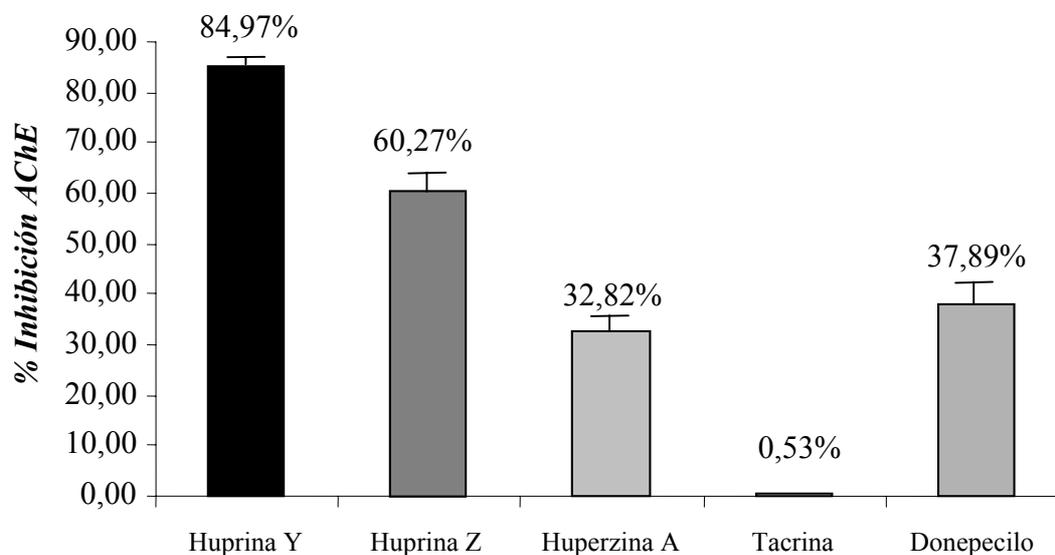


Figura 11. Efecto de diversos anticolinesterásicos sobre la AChE cerebral de ratón. En todos los casos la dosis administrada fue de 10 μ moles/kg por vía intraperitoneal, y el tiempo de sacrificio 20 minutos post-administración. Las barras verticales representan el EEM de un mínimo de tres experimentos independientes, cada uno de los cuales se realizó por duplicado.

4.4. Efectos tóxicos en experimentos *ex vivo*

A la vez que se realizaban los experimentos *ex vivo* para calcular la DI_{50} de las huprinas, se realizó la observación de los animales tratados para determinar la dosis a la que aparecían los primeros efectos tóxicos. Los protocolos éticos prohíben el cálculo de la dosis letal 50 (dosis a la cual mueren el 50% de los animales) por los métodos usados clásicamente, es por ello que se consideró que éste sería el mejor método para tener una idea aproximada del nivel de toxicidad de las huprinas. A las dosis más altas utilizadas

de los compuestos objeto de estudio (30 $\mu\text{mol/kg}$ en el caso de la huprina Y y 40 $\mu\text{mol/kg}$ para la huprina Z) tan sólo se observó un ligero aumento en la salivación y la aparición de un leve temblor, pero en ningún caso se produjo la muerte de los animales.

5. Actividad inhibitoria *ex vivo* sobre las colinesterasas plasmáticas de ratón

Tal y como se ha descrito en el caso de la determinación del curso temporal, se trataron grupos de animales con 5 $\mu\text{moles/kg}$ de huprina Z o bien 1.25 $\mu\text{moles/kg}$ de huprina Y, valores cercanos a las DI_{50} calculadas previamente. Una vez tratados, se sacrificaron los animales por dislocación cervical y mediante punción intracardiaca se recogió la máxima cantidad posible de sangre y se separó el plasma, sirviendo éste como muestra para los experimentos que se realizaron siguiendo el método de Ellman. En ambos casos la inhibición de la enzima periférica fue muy inferior a 50%, valor obtenido a la misma dosis en SNC, lo cual indica una mayor tendencia a actuar sobre la enzima a nivel central.

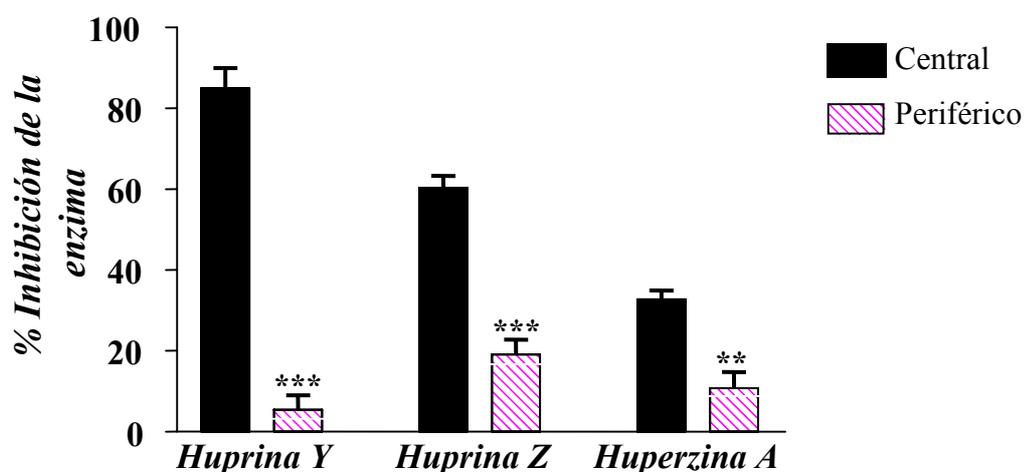


Figura 12. Comparación del efecto anticolinesterásico a nivel central y periférico de las huprinas Y y Z y la huperzina A. Las dosis utilizadas de fármaco fueron, respectivamente, 1.25, 5 y 10 $\mu\text{mol/kg}$. Los valores representan la media de la inhibición enzimática y las barras verticales el error estándar de la media de un mínimo de tres experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por duplicado. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (test t-Student) respecto al efecto central de cada fármaco.

6. Efecto de las huprinas Y y Z sobre los receptores muscarínicos

6.1. Estudios de fijación de radioligandos a los receptores muscarínicos M_1

6.1.1. Estudios de saturación

Mediante los experimentos de saturación se estudió la fijación específica de la [^3H]-pirenzepina, antagonista de los receptores muscarínicos M_1 . Estos experimentos permitieron caracterizar la fijación del radioligando en preparaciones de membranas obtenidas a partir de hipocampo de rata, información necesaria para realizar las curvas de desplazamiento que se determinan a continuación.

La fijación de [^3H]-pirenzepina a los receptores muscarínicos M_1 fue un proceso saturable y de alta afinidad (del orden nanomolar). Además, el análisis de las curvas de saturación obtenidas por regresión no lineal indicó la presencia de una población homogénea de receptores en las preparaciones utilizadas. El posterior análisis de los experimentos de saturación mediante la regresión de Hill mostró un coeficiente de Hill próximo a la unidad, lo cual indicaba que no existía cooperatividad en la fijación del radioligando y confirmó que la [^3H]-pirenzepina se fijaba a una única población de receptores. El valor obtenido para la constante de disociación (K_D) del radioligando tras realizar 5 experimentos independientes, cada uno de ellos por triplicado, fue de 1.75 ± 0.21 nM; el número máximo de sitios de fijación (B_{\max}) fue igual a 25.51 ± 3.60 fmol/mg tejido. En la figura 13 se muestra una curva representativa de los experimentos de saturación con [^3H]-pirenzepina a partir de los cuales se obtuvieron estos datos.

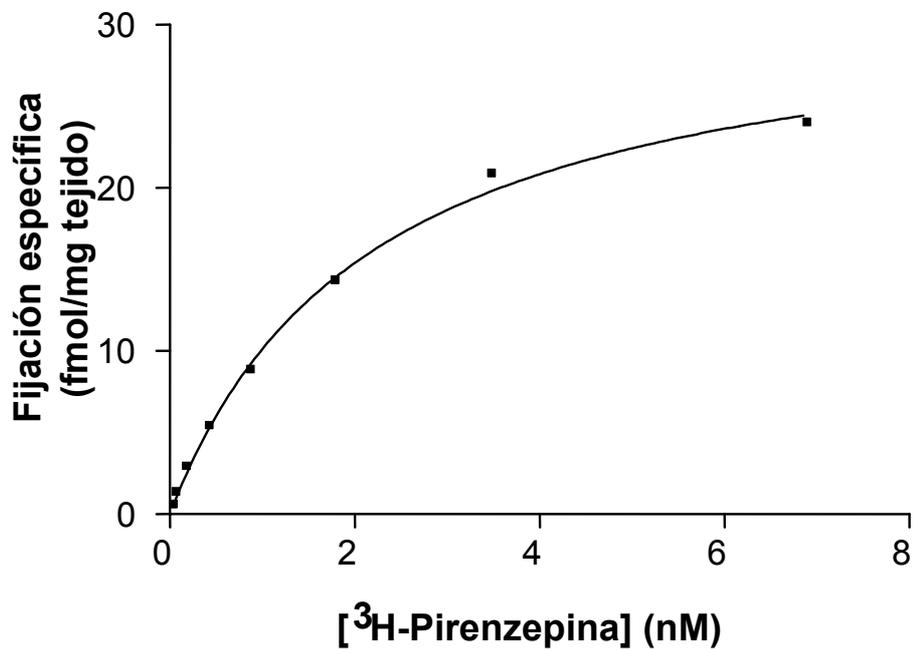


Figura 13. Fijación de [³H]-pirenzepina a membranas de hipocampo de rata: experimento de saturación representativo. En ordenadas se ha representado la fijación específica, obtenida al realizar la diferencia entre la fijación total y la fijación inespecífica. En abscisas se representa la concentración nanomolar de radioligando utilizada.

6.1.2. Estudios de competición

En los experimentos de competición se valoró la capacidad de la huprina Y y de la huprina Z para desplazar la fijación específica de la [³H]-pirenzepina a los receptores M₁. Con este fin, las preparaciones de membranas se incubaron con una concentración de radioligando próxima a la K_D previamente obtenida en los estudios de saturación, junto con concentraciones crecientes de los fármacos objeto de estudio.

Tal y como puede observarse en la figura 14, ambas huprinas inhibieron de forma completa la fijación específica de [³H]-pirenzepina a los receptores muscarínicos M₁. Las curvas de desplazamiento fueron monofásicas con un coeficiente de Hill no significativamente diferente de la unidad. Gracias al ajuste por regresión no lineal realizado mediante el programa informático RADLIG, se comprobó que efectivamente el modelo se adaptaba a un solo sitio de fijación (población homogénea de receptores), y se obtuvieron los valores de CI₅₀, K_i (constante de inhibición de la fijación de [³H]-pirenzepina para cada una de las huprinas) y n_H, los cuales pueden verse en la tabla 6. Como puede observarse, no existen diferencias significativas entre ambas huprinas respecto a la afinidad hacia los receptores muscarínicos M₁, siendo esta afinidad elevada en ambos casos.

Tabla 6. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de inhibición de la fijación de de [³H]-pirenzepina realizada por la huprina Y y por la huprina Z.

Fármaco	CI ₅₀ (M)	K _i	n _H	n
(±)-huprina Y	4.01 ± 1.39.10 ⁻⁷	2.55 ± 0.89.10 ⁻⁷	0.92 ± 0.15	4
(±)-huprina Z	6.12 ± 0.44.10 ⁻⁷ ^a	3.89 ± 0.28.10 ⁻⁷ ^a	0.97 ± 0.08 ^a	6

CI₅₀ = concentración molar de fármaco que produce un 50% de inhibición de la fijación específica del radioligando a los receptores.

K_i = constante de inhibición.

n_H = coeficiente de Hill

n = número de experimentos realizados por triplicado. Los valores representan la media de los resultados ± EEM.

^a n.s. respecto a huprina Y (p>0.05, test t-Student)

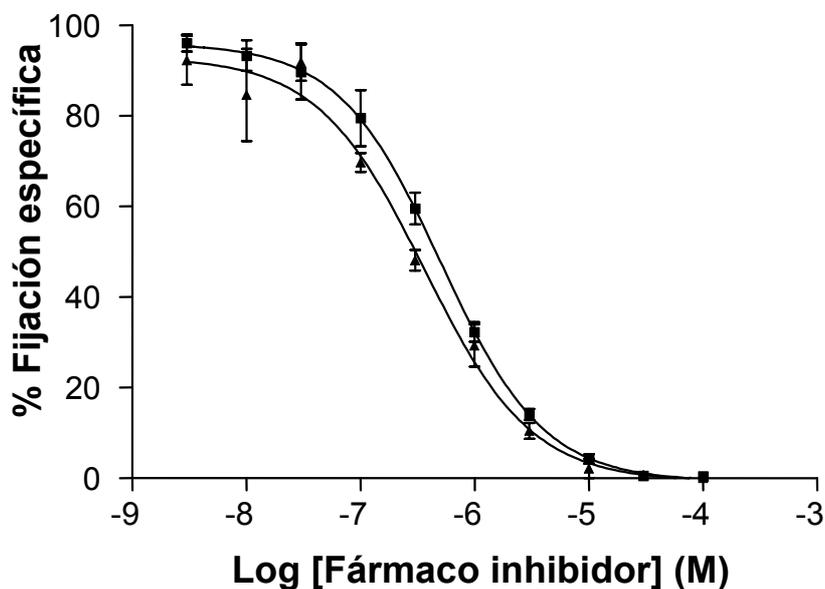


Figura 14. Curvas de inhibición de la fijación específica de [^3H]-pirenzepina en presencia de concentraciones crecientes de huprina Y (▲) o huprina Z (■), en membranas obtenidas a partir de hipocampo de rata. Los resultados corresponden a la media \pm EEM de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado.

6.2. Estudios de fijación de radioligandos a los receptores muscarínicos M_2

6.2.1. Estudios de saturación

En los estudios realizados sobre los receptores muscarínicos M_2 se utilizó como radioligando el [^3H]-QNB, antagonista inespecífico de los receptores muscarínicos, junto a una cantidad fija de pirenzepina (10 μM) para bloquear los receptores M_1 . De nuevo, los experimentos de saturación permitieron caracterizar la fijación de este radioligando a preparaciones de membranas de hipocampo de rata.

La fijación de [³H]-QNB a los receptores muscarínicos fue un proceso saturable y de alta afinidad (del orden nanomolar). Además, el análisis de las curvas de saturación obtenidas por regresión no lineal indicó la presencia de una población homogénea de receptores en las preparaciones utilizadas. El posterior análisis de los experimentos de saturación mediante la regresión de Hill mostró un coeficiente de Hill próximo a la unidad, indicando que no existía cooperatividad en la fijación del radioligando y confirmando así que el [³H]-QNB se fijaba a una única población de receptores. El valor obtenido para la constante de disociación (K_D) del radioligando tras realizar 5 experimentos independientes, cada uno de ellos por triplicado, fue de 4.63 ± 0.91 nM; el número máximo de sitios de fijación (B_{max}) fue igual a 29.56 ± 2.44 fmol/mg tejido. En la figura 15 se muestran los resultados de uno de los experimentos de saturación con [³H]-QNB.

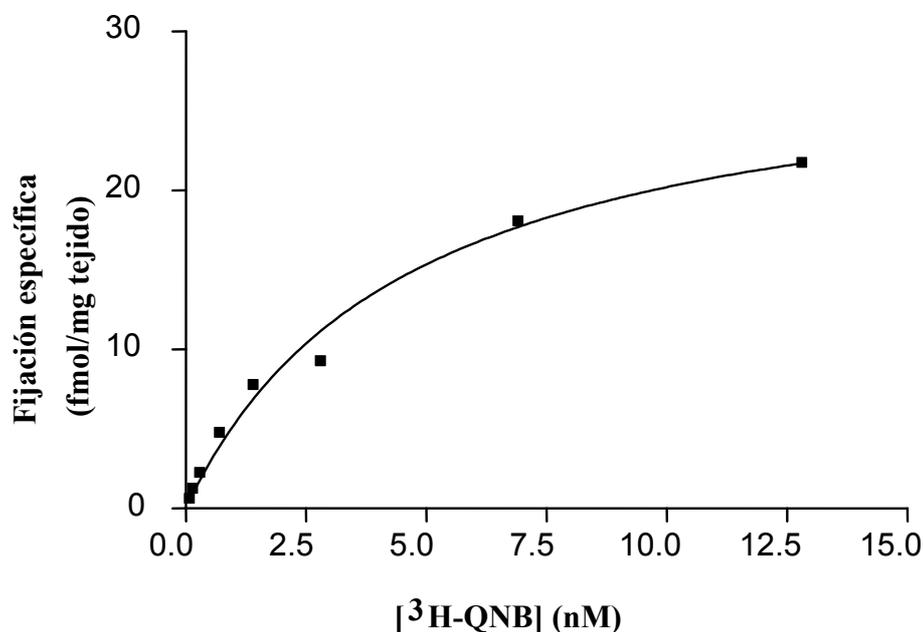


Figura 15. Fijación de [³H]-QNB a membranas de hipocampo de rata: experimento de saturación representativo. En ordenadas se ha representado la fijación específica, obtenida al realizar la diferencia entre la fijación total y la fijación inespecífica. En abscisas se representa la concentración nanomolar de radioligando utilizada.

6.2.2. Estudios de competición

En este caso se estudió la capacidad de la huprina Y y de la huprina Z para desplazar la fijación del [³H]-QNB, junto a una concentración fija de pirenzepina fría, a los receptores muscarínicos M₂. En la figura 16 se muestra la curva de inhibición en el caso de la huprina Y; la curva para la huprina Z no se ha representado debido a que, al presentar el compuesto una muy baja afinidad por los receptores M₂, no se pudo llegar a completar. Los datos se procesaron de igual modo que en los estudios para los receptores M₁ (Tabla 7). Como puede verse, la afinidad por los receptores M₂ de ambas huprinas es baja, y significativamente inferior que la mostrada hacia los receptores M₁.

Tabla 7. Parámetros de inhibición de la fijación de [³H]-QNB junto a pirenzepina realizada por la huprina Y y por la huprina Z.

Fármaco	CI ₅₀ (M)	K _i	n _H	n
(±)-huprina Y	8.15 ± 1.65.10 ⁻⁶	6.91 ± 1.39.10 ⁻⁶	1.27 ± 0.03	4
(±)-huprina Z	>10 ⁻⁵	>10 ⁻⁵	1.15 ± 0.25	4

CI₅₀ = concentración molar de fármaco que produce un 50% de inhibición de la fijación específica del radioligando a los receptores.

K_i = constante de inhibición.

n_H = coeficiente de Hill.

n = número de experimentos realizados por triplicado. Los valores representan la media de los resultados ± EEM.

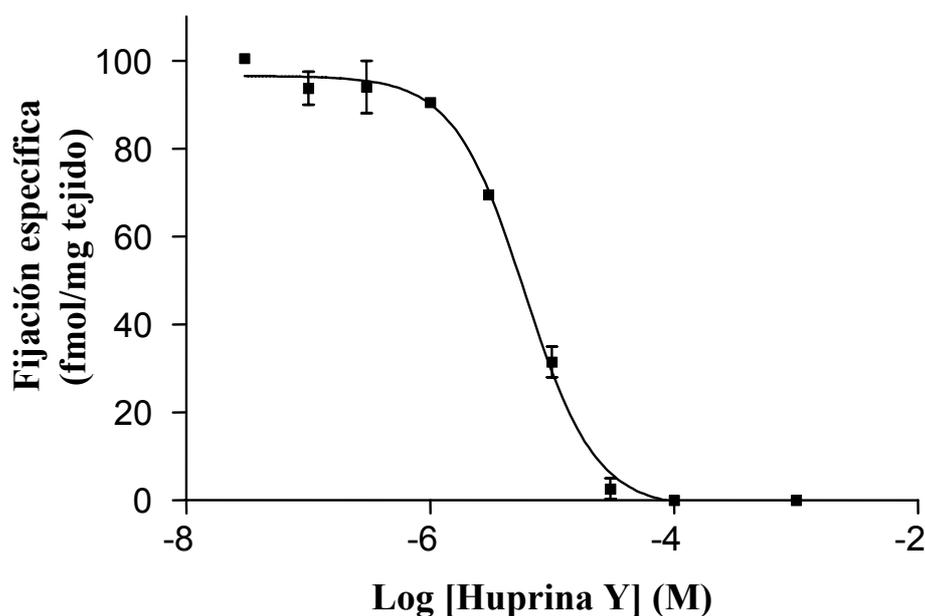


Figura 16. Curva de inhibición de la fijación de [³H]-QNB junto a pirenzepina 10 μ M, en presencia de concentraciones crecientes de huprina Y, en membranas obtenidas a partir de hipocampo de rata. Los resultados corresponden a la media \pm EEM de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado.

6.3. Estudio de la hidrólisis de fosfoinosítidos en miniprismas de corteza cerebral de rata

Una vez probada la afinidad de las huprinas por los receptores muscarínicos M₁ gracias a las técnicas de fijación de radioligandos, el siguiente paso fue comprobar si el papel que ejercían sobre estos receptores era como agonistas o como antagonistas. Para ello se estudió la señal funcional desencadenada por estos compuestos mediante la técnica de hidrólisis de fosfoinosítidos en miniprismas de corteza cerebral de rata, usando como modelo de referencia el carbacol, agonista muscarínico M₁. Todos los experimentos se

realizaron en presencia de una concentración fija de huperzina A con el fin de inhibir la AChE y así descartar que el efecto agonista muscarínico fuera debido a la inhibición de esta enzima que realizan las huprinas.

La estimulación de la acumulación de fosfatos de [³H]-inositol en miniprismas realizada por las huprinas, al igual que la realizada por el carbacol, fue dependiente de la concentración de fármaco. En la figura 17 se muestran las curvas concentración-efecto promedio de un mínimo de 5 experimentos independientes realizados por triplicado. La tabla 8 muestra los valores de estimulación máxima (E_{max}) para la huprina Y, huprina Z y carbacol respecto al control (100%); estos valores se alcanzaron en los tres casos a concentraciones de fármaco del orden de 1-3 mM. El ajuste de las curvas mediante un modelo de regresión no lineal (programa GraphPad) permitió estimar de forma conjunta los valores de CE_{50} (concentración de fármaco que da lugar a un 50% de la estimulación máxima de la producción de fosfatos de inositol), n_H (coeficiente de Hill) y E_{max} , representados en la tabla 8.

Como puede observarse en la tabla 8, los valores de CE_{50} para ambas huprinas indican la existencia de un aumento significativo en la producción de fosfatos de inositol tras su administración, aunque estos valores son aproximadamente 5 veces superiores al valor obtenido para el carbacol. Por otro lado, en el caso del carbacol el coeficiente de Hill no resultó significativamente distinto de 1, indicando que su efecto está mediado por una población homogénea de receptores, como ya es sabido. Sin embargo, en el caso de las huprinas sí existió una diferencia significativa respecto a la unidad.

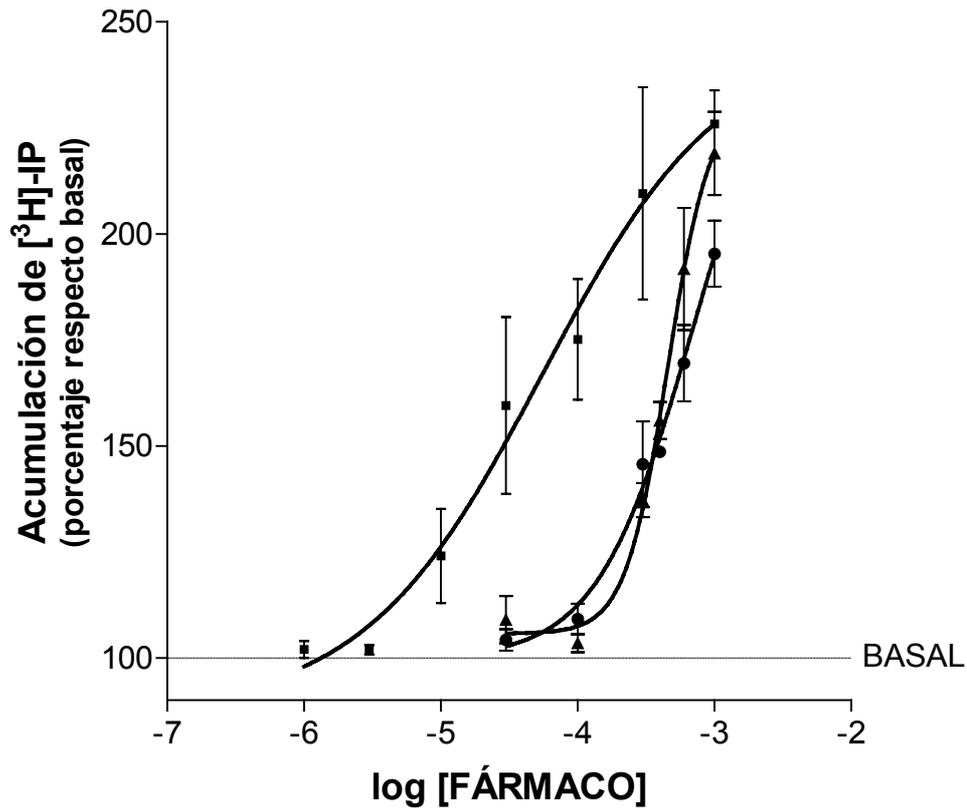


Figura 17. Curva concentración-respuesta para la estimulación por huprina Y (●), huprina Z (▲) y carbacol (■) de la acumulación de fosfatos de $[^3\text{H}]\text{-inositol}$ en miniprismas corticales de cerebro de rata. Los valores, representados como los porcentajes de acumulación de fosfatos de $[^3\text{H}]\text{-inositol}$ tomando el valor basal como 100%, son la media \pm EEM de un mínimo de 5 experimentos independientes realizados por triplicado.

Tabla 8. Efecto de carbacol, huprina Y y huprina Z sobre la acumulación de fosfatos de [³H]-inositol en miniprismas corticales de rata.

Fármaco	E _{max} (%)	CE ₅₀ (M)	n _H	n
Carbacol	225.90 ± 7.90	8.40 ± 0.42 · 10 ⁻⁵	0.95 ± 0.07	5
(±)-huprina Y	195.30 ± 7.81	4.72 ± 1.40 · 10 ⁻⁴	1.71 ± 0.34	5
(±)-huprina Z	219.00 ± 9.80	3.80 ± 0.20 · 10 ⁻⁴	2.80 ± 0.46	5

E_{max} = estimulación máxima por encima del valor basal (100%).

CE₅₀ = concentración de fármaco que produce un efecto igual al 50% de la E_{max}.

n_H = coeficiente de Hill.

Los valores representan la media de los resultados ± EEM de un mínimo de 5 experimentos independientes realizados por triplicado.

Para conocer los receptores activados por las huprinas, se estudió la reversión del efecto sobre la producción de fosfatos de inositol utilizando varios antagonistas conocidos. Como se muestra en la figura 18, el efecto producido por el carbacol (10⁻⁴M) fue revertido de forma prácticamente total por soluciones de los antagonistas muscarínicos atropina 10⁻⁶M (antagonista muscarínico inespecífico) y pirenzepina 10⁻⁵M (antagonista muscarínico M₁). Por otro lado, el efecto de la huprina Y y de la huprina Z a una concentración 4·10⁻⁴M fue revertido aproximadamente en un 50% al utilizar estos dos antagonistas, indicando que el incremento en la producción de fosfatos de inositol producido por las huprinas se debe, al menos en parte, a un efecto agonista sobre los receptores muscarínicos M₁.

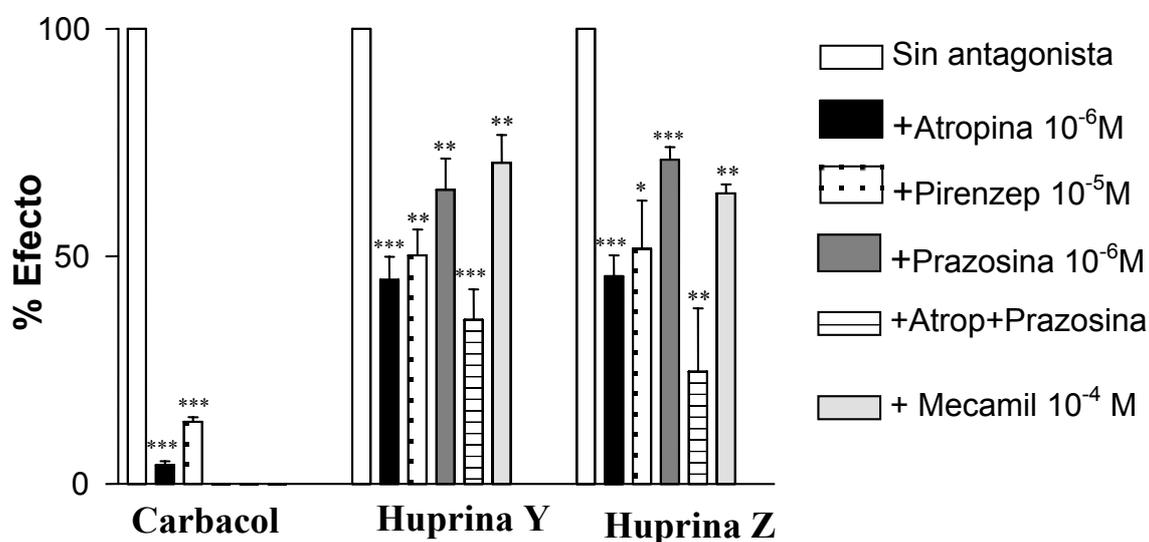


Figura 18. Inhibición realizada por diferentes antagonistas de la acumulación de fosfatos de [³H]-inositol estimulada por carbacol, huprina Y o huprina Z en miniprismas de corteza cerebral de rata. Los resultados son la media \pm EEM de los valores obtenidos en 5 experimentos realizados por triplicado. Se tomó como 100% del efecto el valor obtenido utilizando carbacol 10⁻⁴M o huprina 4.10⁻⁴M en ausencia de antagonista. Pirenzep = pirenzepina; atrop = atropina; mecamil = mecamilamina. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (test t-Student) respecto al 100% del efecto de cada fármaco en ausencia de antagonista.

El antagonista α_1 -adrenérgico prazosina, a una concentración igual a 10⁻⁶M, revirtió aproximadamente un tercio del efecto de ambas huprinas sobre la producción de fosfatos de inositol, señalando así que estos compuestos activan también los receptores adrenérgicos. La mecamilamina, antagonista de los receptores nicotínicos, a una concentración 10⁻⁴M, produjo una inhibición del 30% del efecto de las huprinas. La inhibición en la producción de fosfatos de inositol realizada por varias combinaciones

de estos antagonistas está representada en la figura 18; como puede verse, en ningún caso se llegó a inhibir el 100% del efecto de la huprina Y y Z.

Discusión

La hipótesis colinérgica, como causa de la disfunción cognitiva existente en los procesos neurodegenerativos de la enfermedad de Alzheimer, ha determinado que las aproximaciones farmacológicas para su tratamiento estén basadas clásicamente en la facilitación de la neurotransmisión colinérgica a distintos niveles. Entre los compuestos estudiados, los IChE son los que han mostrado ser de mayor utilidad, sin embargo, la existencia de compuestos de limitada eficacia y con múltiples efectos indeseados ha hecho que aumente el interés por las nuevas terapias. La finalidad de esta búsqueda ha sido encontrar compuestos más activos y seguros, que a la vez actúen mejorando la neurotransmisión de forma más duradera y que posean otras acciones, además de inhibir la AChE, que puedan ser beneficiosos para los pacientes con EA.

Partiendo de esta base, el objetivo primordial de esta tesis doctoral ha sido la evaluación farmacológica de dos compuestos anticolinesterásicos, la huprina Y y la huprina Z, sintetizadas a partir de la combinación de la subestructura carbocíclica de la huperzina A con la estructura 4-aminoquinolina de la tacrina, e introduciendo un grupo metil en la posición 9 y un átomo de cloro (huprina Y) o flúor (huprina Z) en la posición 3. En este sentido, se han realizado diversos estudios *in vitro* que han permitido conocer la actividad de estos compuestos sobre las enzimas AChE y BChE, así como la eficacia relativa para inhibir la AChE humana respecto a la bovina. Además, este tipo de metodología experimental permitió determinar la dependencia del tiempo, la reversibilidad de la actividad anticolinesterásica y el tipo de inhibición enzimática realizada por las huprinas. Los resultados obtenidos mediante experimentos *ex vivo* mostraron la actividad de ambos compuestos al ser administrados en animales vivos, determinando la DI_{50} y el curso temporal del efecto, la penetración de la barrera

hematoencefálica, la toxicidad potencial y la diferencia entre el efecto a nivel central y periférico. Por último, los estudios de fijación de radioligandos y de producción de fosfatos de inositol dieron a conocer la actividad de los compuestos sobre los receptores muscarínicos.

1. Actividad inhibitoria enzimática *in vitro* de las huprinas Y y Z sobre la AChE y la BChE

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran claramente que la huprina Y y la huprina Z son dos potentes inhibidores de la AChE, presentando unas CI_{50} del orden nanomolar, y que además poseen una actividad superior a la mostrada por la tacrina y la huperzina A bajo las mismas condiciones. Por otro lado, las huprinas mostraron una buena selectividad por la AChE frente a la BChE, lo cual se deduce de las razones de $CI_{50} \text{ BChE} / CI_{50} \text{ AChE}$ para ambos compuestos, siendo superior a 300 en el caso de la huprina Y, y aproximadamente 100 para la huprina Z. La huperzina A también mostró una mayor actividad sobre la AChE que sobre la BChE, pero en este caso la CI_{50} de esta última enzima fue muy superior a la presentada por las huprinas. La tacrina inhibió de forma más potente la BChE que la AChE, lo cual coincide con resultados previamente publicados (Hunter et al., 1989).

Clásicamente se ha considerado que la selectividad hacia la AChE vs BChE producía una disminución en la presentación de efectos colinérgicos periféricos (Benzi and Moretti, 1998). No obstante, evidencias recientes muestran que la BChE también juega un papel importante en la hidrólisis de la ACh, por lo que su inhibición también podría aportar beneficios terapéuticos. En el cerebro sano, la AChE supone un 80% del total de ChE, mientras que la BChE representa tan sólo un 20% (Greig et al., 2001),

considerándose que esta última juega un papel poco importante en la regulación de los niveles de ACh. Sin embargo, esto no es así en el cerebro de los pacientes con EA en los que la actividad de la AChE puede disminuir hasta 55-67% de los valores normales y la BChE aumenta su actividad (Perry et al., 1978b). Por tanto, ambas enzimas parecen estar implicadas en la regulación de los niveles de ACh, pudiendo ser así dos objetivos sobre los que incidir para mejorar el déficit colinérgico. También se ha sugerido que la BChE podría tener un papel importante en la etiología y progresión de la EA más allá de la simple regulación de los niveles de neurotransmisor colinérgico (Mesulam et al., 2002). Recientemente se ha caracterizado un ratón que carece del gen que codifica por la AChE y que ha resultado ser viable, aunque más sensible al efecto de los inhibidores selectivos de la BChE, lo cual demuestra aún más claramente que esta última enzima es capaz de hidrolizar la ACh y que es importante en la neurotransmisión colinérgica (Xie et al., 2001). Además, en estos ratones los niveles de BChE son considerablemente superiores a los normales, lo cual indica que ésta, y probablemente también otras enzimas, son capaces de compensar algunas de las funciones de la AChE. Teniendo en cuenta todos estos datos, más importante que la selectividad por el tipo de ChE, sería prioritario que un inhibidor fuera selectivo por el lugar de acción, centrándose el efecto en el SNC, ya que la actividad periférica podría dar un aumento de los síntomas colinérgicos indeseados.

Como se ha comentado antes, la BChE parece tener también una función sobre la progresión de la enfermedad al afectar la agregación de la proteína β -A en los primeros estadios de la formación de placas seniles (Guillozet et al., 1997). Tanto esta enzima como la AChE se acumulan en el interior de las placas y se encuentran en los ovillos neurofibrilares (Mesulam and Geula, 1994). Se ha probado que la inhibición selectiva

de la BChE en cultivos de tejidos produce una disminución en los niveles de PPA a nivel intra y extracelular (Lahiri et al., 2000).

Se ha determinado que la inhibición de las ChE en el líquido cefalorraquídeo producida por la rivastigmina, inhibidor dual de ambas enzimas con potencia similar, se correlaciona claramente con una mejora de la función cognitiva en pacientes con EA (Costa et al., 1999), lo cual proporciona pruebas experimentales sobre los beneficios terapéuticos de una inhibición simultánea de ambas ChE. Así, todas las evidencias parecen señalar que el uso de compuestos con la habilidad de inhibir tanto la AChE como la BChE puede suponer una estrategia terapéutica adicional en el tratamiento de la EA. Como se ha descrito anteriormente, las huprinas Y y Z producen una mayor inhibición de la AChE, sin embargo, también presentan una actividad considerable sobre la BChE, que en cualquier caso es muy superior a la que mostró la huperzina A, lo cual representaría una ventaja teniendo en cuenta lo expuesto.

Siguiendo con los resultados obtenidos *in vitro*, una característica destacable es que ambas huprinas presentaron una mayor actividad sobre la AChE humana respecto a la enzima de origen bovino, especialmente la huprina Y. Este dato contrasta con los obtenidos para la tacrina y la huperzina A, que actuaron con mayor potencia sobre la AChE bovina. La mayor selectividad por la enzima humana de las huprinas representaría una ventaja adicional ya que podría suponer que los datos obtenidos en estudios con animales fueran mejorados al usarse en humanos.

2. Dependencia del tiempo y reversibilidad de la actividad inhibitoria sobre la AChE

Una característica diferencial destacable entre las huprinas estudiadas es que la actividad anticolinesterásica de la huprina Y se ve afectada por la incubación de la enzima con el inhibidor previa a la adición del substrato, mientras que la huprina Z no mostró esta propiedad. Tras una incubación a 25°C durante 30 minutos, la huprina Z no exhibió ningún cambio en su actividad, de lo cual se dedujo que el efecto de este compuesto no depende del tiempo. Sin embargo, en el caso de la huprina Y sí se produjo esta dependencia, por lo que se pasó a estudiar la reversibilidad de su unión a la enzima mediante experimentos de diálisis. La actividad de la AChE no se recuperó totalmente tras una diálisis a 4°C durante toda la noche, lo cual, unido a la gran potencia que presenta el compuesto, indicó la posibilidad de la existencia de un proceso de inhibición reversible tipo *tight-binding*, caracterizado por una rápida asociación y una lenta disociación a la enzima (Dixon and Webb, 1979). Para comprobar esta posibilidad, se incubó el fármaco junto a la enzima a 37°C durante toda la noche, produciéndose una total recuperación de la actividad y confirmándose así la existencia del proceso *tight-binding*. Parece ser que la sustitución del átomo de flúor de la huprina Z por el de cloro de la huprina Y mejora la unión a la AChE. Este hecho probablemente se debe a que, como es sabido, el átomo de cloro se adapta mejor al *bolsillo enzimático* formado por varios residuos aminoacídicos, lo que conduce a una mayor interacción no-electrostática que en el caso del átomo de flúor (Camps et al., 2000).

Como es de esperar, los productos con propiedades *tight-binding* muestran una duración de acción superior al unirse más firmemente a la enzima, lo que puede resultar

beneficioso de cara a la aplicación de un fármaco en el tratamiento de la EA ya que supondría una pauta de administración más cómoda para los pacientes y los cuidadores, y también una potencial reducción de los efectos indeseables.

3. Determinación del tipo de inhibición enzimática

Respecto al tipo de inhibición de la AChE realizada por las huperinas, la representación de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidad} - 1/[\text{substrato}]$) muestra que en ambos casos al incrementar la concentración del inhibidor, la pendiente de la recta aumenta, así como el valor de intersección con el eje de ordenadas, lo cual coincide con la existencia de un patrón de inhibición mixta. Este resultado concuerda con los datos existentes para los compuestos parentales, huperzina A y tacrina (McKinney et al., 1991; Tang and Han, 1999; Snape et al., 1999; Chelliah et al., 1994).

Se ha descrito que la tacrina, al tratarse de una amina catiónica, se une a un punto aniónico/hidrofóbico del centro activo de la AChE (Freeman and Dawson, 1991; Steinberg et al., 1975). Esta unión se da a través de la estructura de múltiples anillos planos y la carga positiva de la tacrina, lo que se cree podría ser la explicación de la presencia de una cinética de inhibición de tipo mixto (Steinberg et al., 1975; Wu and Yang, 1989). Además, su unión a un sitio hidrofóbico podría explicar la potente inhibición observada (Chelliah, Smith, and Fariss, 1994). La huperzina A también se une al centro activo de la enzima mediante una interacción reversible no-covalente con los aminoácidos aromáticos de la *garganta* catalítica (Ashani et al., 1992).

Dado que el valor de CI_{50} depende de la concentración y la K_m de la enzima por el substrato, el cálculo de la constante de afinidad (K_i) permite una comparación más

rigurosa de la potencia de los fármacos, especialmente en casos en los cuales el modo de inhibición no es simplemente competitivo. Al comparar las huprinas entre sí, se puede ver que la K_i es aproximadamente 27 veces superior en el caso de la huprina Z, indicando que la huprina Y presenta una mayor afinidad por la enzima, lo que coincide con el resto de los resultados obtenidos. En cualquier caso, ambas sustancias demuestran tener una afinidad por la AChE superior a los compuestos de los que proceden (Ashani, Peggins, and Doctor, 1992; McKinney et al., 1991; Chelliah, Smith, and Fariss, 1994; Snape et al., 1999).

4. Actividad inhibitoria enzimática *ex vivo* de las huprinas Y y Z sobre la AChE cerebral de ratón

Los resultados de los experimentos realizados *ex vivo* proporcionan una indicación relativa de la capacidad de las huprinas para penetrar la barrera hematoencefálica y llegar así al SNC, y además sirven como un indicativo de la potencia con la que actuarán en el animal *in vivo*. Como se ha podido demostrar, la huprina Y resultó más activa al presentar una DI_{50} 5 veces inferior a la de la huprina Z. La actividad *tight-binding* que posee la huprina Y podría ser una explicación razonable para esta diferencia de potencia. Por otra parte, ambos compuestos resultaron más activos que la huperzina A, la cual tan sólo inhibió la actividad de la enzima en un 30% a la máxima dosis utilizada (10 $\mu\text{mol/kg}$). Se comprobó además que los compuestos objeto de estudio son también más activos que la tacrina, que no mostró efectos inhibitorios a las dosis usadas, y que el donepecilo. Por tanto, en este sentido podemos decir que, al menos en los experimentos realizados sacrificando los animales tras haber recibido una dosis de inhibidor, las huprinas presentan una mayor actividad que tres reconocidos inhibidores de la enzima AChE.

Una de las limitaciones de los experimentos *ex vivo* es la necesaria dilución del tejido que puede dar lugar a una inhibición aparente de la AChE inferior a la real debido a un aumento en la disociación del complejo reversible enzima-inhidor (Bores et al., 1996). Para evitar en lo posible esta disociación, se redujo al máximo la dilución ya que se cree que así se puede minimizar este efecto (Bickel et al., 1991; Bores et al., 1996). No obstante, esta limitación de la técnica podría ser la explicación de la baja inhibición enzimática resultante en el caso de la tacrina y la huperzina A, pero el uso de dosis superiores produjo la muerte de algunos de los animales del estudio, lo cual impidió la determinación de la DI_{50} de estos compuestos. A pesar de esto, los resultados obtenidos permitieron alcanzar el principal objetivo del estudio de estos dos compuestos, que era comparar su potencia con la mostrada por las huprinas. Así pues, los experimentos *ex vivo* permiten concluir que las huprinas estudiadas penetran la barrera hematoencefálica de forma eficaz tras su administración sistémica y que además actúan con una elevada potencia inhibiendo la AChE en el SNC, siendo ambos criterios importantes indicadores del posible éxito terapéutico, además de presentar una mayor eficacia que sus compuestos parentales.

El estudio del curso temporal dio como resultado un tiempo de semivida biológica del efecto inhibitorio de la AChE de aproximadamente 1 hora para ambas huprinas. Este resultado podría interpretarse como una duración corta de la acción de estos compuestos, sin embargo, existen varios aspectos que deben considerarse antes de concluir esto. En primer lugar, el aumento de la disociación del complejo enzima-inhibidor debido a la dilución del tejido también acortaría el tiempo de duración del efecto del fármaco. En segundo lugar, es bien conocido que la tasa metabólica es

diferente para cada especie, siendo proporcional a la superficie corporal, de tal forma que cuanto más pequeño sea un animal, mayor será su tasa metabólica basal (Alvares and Pratt, 1990). Por tanto, cabe esperar que en el ser humano, al tratarse de una especie de mayor tamaño, el tiempo de semivida biológica será más largo, aunque son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

Siguiendo con los resultados obtenidos a partir del estudio del curso temporal del efecto anticolinesterásico, llama la atención que tanto k como $t_{1/2}$ no presenten diferencias significativas entre las huprinas, lo cual contrasta con la naturaleza *tight-binding* que mostró la huprina Y en los estudios *in vitro* y que haría esperar un periodo de acción más largo para esta huprina. Sin embargo, es probable que determinados efectos del metabolismo en el animal *in vivo* hagan que esto no sea así. Además, es clásicamente conocido que, desde un punto de vista metabólico, la unión carbono-flúor es más estable que la unión carbono-cloro (Alvares and Pratt, 1990), por lo cual la huprina Y sería más fácilmente metabolizada. Por otra parte, la actividad *tight-binding* sí podría explicar su mayor potencia al inhibir la AChE, tal y como se ha visto anteriormente.

Los experimentos *ex vivo* permitieron además realizar la observación de los animales tratados con el fin de conocer la dosis a la que se daban los primeros efectos tóxicos (*primary over-effects*). Dosis tan elevadas como 30 y 40 $\mu\text{mol/kg}$ intraperitonealmente de huprina Y y huprina Z, respectivamente, tan sólo produjeron una ligera salivación y la aparición de un leve temblor, sin llegar a síntomas más graves. Contrariamente, como se ha explicado en el apartado de resultados, dosis de 10 $\mu\text{mol/kg}$ de tacrina o 20 $\mu\text{mol/kg}$ de huperzina A produjeron síntomas colinérgicos mucho más evidentes, llegando en algunos casos a producirse la muerte del animal. Por tanto, ambas huprinas

han probado tener un buen índice terapéutico ya que a bajas dosis producen una buena inhibición enzimática, pero además muestran una elevada seguridad ya que dosis altas sólo producen leves síntomas colinérgicos periféricos, además, este índice es mejor que el que mostraron los compuestos de los cuales proceden.

5. Actividad inhibitoria *ex vivo* sobre las colinesterasas plasmáticas de ratón

Tras la determinación del efecto anticolinesterásico *ex vivo* de las huprinas en SNC, se procedió al estudio de este efecto en plasma de ratón siguiendo el protocolo descrito por Hinz et al. (1996), obteniendo así un indicador de la actividad periférica de los compuestos sobre las ChE. La ChE predominante en el cerebro es la AChE, mientras que los tejidos periféricos contienen tanto AChE como BChE, aunque las proporciones entre ambos varían según el tejido (Edwards and Brimijoin, 1982). En cualquier caso, las enzimas periféricas no son el objetivo en el tratamiento de la EA ya que su inhibición produce efectos adversos. El plasma de ratón contiene ambas ChE (García-Ayllon et al., 1999), por lo que se puede considerar que el efecto de los anticolinesterásicos en la actividad total plasmática sería un reflejo de la influencia de éstos sobre los tejidos periféricos (Kosasa et al., 2000).

En el presente estudio se midió la actividad anticolinesterásica en plasma de ratones tratados con una dosis única de huprina Y o huprina Z, aproximadamente igual a la DI_{50} calculada para el SNC. Como compuesto de referencia se utilizó la huperzina A a una dosis de 10 $\mu\text{mol/kg}$. En los tres casos se observó una inhibición muy inferior a la detectada para la enzima central. La proporción de inhibición de la ChE cerebral vs ChE plasmática serviría como una aproximación a la razón entre efectos clínicos y efectos adversos potenciales, por ello cabe esperar que ambas huprinas presenten efectos

indeseados mínimos, lo cual coincide con las observaciones realizadas en los ratones tratados.

Los efectos adversos que presentan los anticolinesterásicos con mayor frecuencia se derivan de la activación del sistema nervioso colinérgico periférico, lo cual se debe probablemente a la inhibición de la AChE periférica, y no de la BChE (Kosasa et al., 2000). Esto podría hacer pensar que el parámetro más indicado para predecir los efectos adversos de un inhibidor de las ChE sería la medición de la actividad de la AChE más que la actividad global de las ChE plasmáticas. Sin embargo, se ha sugerido que las ChE juegan además un papel no relacionado con el sistema colinérgico (Chatonnet and Lockridge, 1989; Massoulié et al., 1993). Así por ejemplo, se considera que la BChE participa en la detoxificación de compuestos naturales ya que está implicada en la degradación de sustancias como la succinilcolina, la heroína, la cocaína y la fisostigmina (Massoulié et al., 1993). También se ha probado que la inhibición de la BChE, en situaciones en que la AChE se encuentra inhibida, resulta en una potenciación de las respuestas colinérgicas en músculo liso traqueal *in vitro* (Adler and Filbert, 1990). Por tanto, es importante evaluar el efecto global de un fármaco sobre AChE y BChE en tejidos periféricos para poder hacer una predicción de su seguridad.

La inhibición preferencial de la actividad colinérgica cerebral frente a la periférica se basa en parte en la distribución del fármaco en cerebro vs plasma. Otro factor implicado es la selectividad del compuesto por la AChE frente a la BChE, dado que en el cerebro de ratón se encuentra principalmente AChE, y en plasma existen ambas enzimas. En otras palabras, un inhibidor selectivo de la AChE no puede inhibir de forma completa la actividad colinesterásica del plasma de ratón. Por ejemplo, se ha descrito que el

donepezilo inhibe preferentemente la enzima cerebral, lo cual es debido al efecto aditivo de la alta razón de concentración de fármaco en cerebro vs plasma y a la fuerte selectividad que muestra hacia la AChE (Rogers et al., 1991). La tacrina, en cambio, no presenta selectividad entre AChE y BChE (Hunter et al., 1989; Rogers, Yamanishi, and Yamatsu, 1991), de modo que su acción preferencial sobre la ChE cerebral se explicaría principalmente por la razón de concentraciones de fármaco cerebral vs plasmática (Kosasa et al., 2000). En el caso de las huprininas, los estudios *in vitro* demuestran que presentan una mayor actividad sobre AChE que sobre BChE, lo cual podría ser una explicación para la mayor actuación a nivel central, aunque por otro lado, también podría resultar de interés conocer la forma de distribución de estos fármacos entre los diferentes tejidos.

6. Efecto de las huprininas Y y Z sobre los receptores muscarínicos

Aunque el uso de fármacos puramente inhibidores de la AChE ha sido el recurso más utilizado para el tratamiento de la EA, su efectividad se ha visto limitada por el deterioro del sistema colinérgico a nivel presináptico que da lugar a una disminución de las reservas de ACh, neurotransmisor que protegen estos fármacos (Dekosky and López, 1998). Por otro lado, estudios post-mortem de cerebros de pacientes afectados por la enfermedad han señalado que no existe una alteración en la densidad de receptores muscarínicos M_1 a nivel de corteza cerebral e hipocampo (Pearce and Potter, 1991). No obstante, se ha postulado la posibilidad de que exista un desacoplamiento entre estos receptores y la proteína G a la que se asocian en condiciones normales (Ladner et al., 1995), a pesar de lo cual la presencia de receptores M_1 podría suponer una buena diana en la terapéutica de la EA. Teniendo en cuenta estos datos, la existencia de un

compuesto que combinara ambas propiedades, inhibición de las ChE cerebrales y agonismo muscarínico M_1 , podría suponer un gran avance en este campo.

Se han descrito 5 tipos de receptores muscarínicos, presentes en el sistema nervioso central y periférico (Bonner, 1989). Los receptores M_1 se localizan predominantemente de forma postsináptica en corteza cerebral, hipocampo y sistema gastrointestinal. Los M_2 se localizan sobre todo a nivel presináptico en las neuronas colinérgicas cerebrales y en tejido cardíaco. El tipo M_3 está en tejidos glandulares, especialmente en glándulas salivares. Los receptores M_4 y M_5 no están bien caracterizados y no se han relacionado con efectos adversos específicos. Estos datos sugieren que una activación selectiva de los receptores muscarínicos M_1 sería la forma más eficaz de mejorar los déficits cognitivos que se presentan en la EA, limitándose a la vez al máximo la presentación de efectos adversos asociada a la activación de otros receptores muscarínicos (Avery et al., 1997).

Por todo esto, el objetivo de la última parte de esta tesis ha sido estudiar el efecto que presentan la huprina Y y la huprina Z sobre los receptores muscarínicos, y más en concreto sobre los receptores M_1 y M_2 . A este respecto se realizaron dos tipos de experimentos, en primer lugar la técnica de fijación de radioligandos permitió conocer la afinidad por dichos receptores. En segundo lugar, el estudio de la producción de fosfatos de [3 H]-inositol en miniprismas de corteza cerebral determinó la capacidad de estos compuestos para activar los receptores M_1 .

En los experimentos en los que se estudió el desplazamiento de la fijación específica de [3 H]-pirenzepina llevado a cabo por las huprinas, se obtuvieron curvas monofásicas, con

valores de n_H próximos a la unidad, lo cual indica que los compuestos compiten por un único lugar de fijación. Ambas sustancias mostraron una alta afinidad por los receptores muscarínicos M_1 , siendo la afinidad de la huprina Y ligeramente superior a la de la huprina Z, como puede verse por los valores de las K_i , $0.25 \pm 0.09 \mu M$ frente a $0.39 \pm 0.03 \mu M$, aunque esta diferencia no es significativa. Por otro lado, el estudio de fijación de radioligandos a los receptores muscarínicos M_2 evidenció una baja afinidad de las huprinas por este tipo de receptor, siendo la K_i para la huprina Y igual a $6.91 \pm 1.39 \mu M$; en el caso de la huprina Z la afinidad resultó tan baja que no se pudo llegar a la determinación del valor de K_i . Estos resultados ponen de manifiesto que tanto la huprina Y como la huprina Z presentan una afinidad significativamente superior por los receptores muscarínicos M_1 que por los M_2 .

Existen estudios que demuestran que la CI_{50} de la huperzina A para el desplazamiento de la fijación de [3H]-QNB es superior a $500 \mu M$ (Tang et al., 1989), lo que prueba que este compuesto presenta una afinidad muy baja por los receptores muscarínicos, en comparación con otros IACHÉ, incluida la fisostigmina ($IC_{50} = 170 \mu M$). La tacrina, en cambio, interacciona con los receptores muscarínicos en cerebros humanos y de roedores, aunque sin distinción entre los subtipos M_1 y M_2 (Nilsson et al., 1987; Perry, et al., 1988; Flynn and Mash, 1989). Hunter et al. (1989) han descrito que la tacrina se une de forma no selectiva tanto a los receptores M_1 ($K_i = 0.60 \mu M$) como a los M_2 ($K_i = 0.88 \mu M$). En otro estudio se ha puesto de manifiesto una CI_{50} de la tacrina por los receptores M_1 igual a $0.7 \mu M$ (Snape et al., 1999). En cualquier caso, de los diversos datos podemos extraer que las huprinas objeto de este trabajo presentan una afinidad por los receptores muscarínicos M_1 superior a la afinidad de la tacrina, y por supuesto, de la huperzina A.

A pesar de presentar una afinidad razonablemente alta por los receptores muscarínicos M_1 , parece ser que la tacrina podría comportarse como un antagonista (Hunter et al., 1989). Este hecho ha sido confirmado en estudios que usan la respuesta de segundo mensajero mediada por receptores (Kiefer-Day et al., 1993), así como mediante el estudio del efecto de la tacrina sobre el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} estimulado por carbacol en neuroblastomas SHSY5Y humanos (Snape et al., 1999). De este modo, el bloqueo de los receptores muscarínicos M_1 , implicados en los procesos de memoria (Messer et al., 1987), podría limitar la eficacia de la tacrina al oponerse a su efecto anticolinesterásico. En cambio, el antagonismo por los receptores M_2 podría ser beneficioso, al estar éstos implicados en la inhibición de la liberación de ACh (Meyer and Otero, 1985), no obstante, parece ser que la baja selectividad entre ambos tipos de receptor daría como resultado final un efecto inhibitorio de los receptores postsinápticos (Kiefer-Day et al., 1991). A este respecto, el hecho de que las huprinas presenten una baja afinidad por los receptores M_2 supondría una ventaja adicional al evitarse así el posible efecto agonista sobre este tipo de receptor, el cual disminuiría la liberación de ACh y restaría así eficacia al efecto de los fármacos.

Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que los agonistas muscarínicos, y en particular aquellos que actúan preferentemente sobre los receptores M_1 , producen una mejoría de los síntomas cognitivos presentes en la EA (Korczyn, 2000). Recientemente se ha descrito que la huprina X, otra de las huprinas derivadas de la combinación entre la tacrina y la huperzina A y cuya estructura es muy similar a la de las huprinas objeto de esta tesis doctoral, presenta una afinidad por los receptores muscarínicos cercana a la de las huprinas Y y Z en el desplazamiento de la fijación de radioligandos (Roman et

al., 2002). En este trabajo se probó además que la huprina X se comportaba como un agonista de los receptores M_1 y M_2 . La mayor afinidad de las huprinas por los receptores M_1 supondría una vía adicional para estimular el sistema colinérgico, además de su actividad como IACHÉ.

Con el fin de discernir si las huprinas Y y Z se comportan como agonistas o como antagonistas de los receptores muscarínicos M_1 , el siguiente paso lógico fue proceder a realizar estudios bioquímicos en los que se determinó la producción de fosfatos de inositol en miniprismas de corteza cerebral de rata. Las preparaciones de miniprismas como la utilizada en el presente trabajo han merecido gran atención como modelos *in vitro* para estudiar diversas funciones fisiológicas y respuestas bioquímicas en el SNC (Brown et al., 1984). Este tipo de preparación conserva durante un periodo determinado de tiempo unas características similares a los tejidos cerebrales *in vivo*, pudiéndose afirmar que presenta propiedades intermedias entre éstos y los cultivos celulares. Por un lado, mantienen las poblaciones celulares originales, así como la citoarquitectura y conexiones celulares a pequeña escala y, por otro, están desprovistos de barrera hematoencefálica, por lo que aseguramos que los tejidos estén en contacto con los compuestos presentes en el medio de incubación. Esta propiedad ha permitido que, por ejemplo, se pudiera estudiar la dependencia de Ca^{2+} en la transmisión sináptica (Richards and Sercombe, 1970), o las bases iónicas de los potenciales neuronales de reposo (Scholfield, 1978). Desde el descubrimiento de las respuestas bioquímicas inducibles mediante neurotransmisores, muchas de ellas sólo presentes en estructuras en las que se mantiene la integridad celular, los estudios *in vitro* con miniprismas han sido de gran utilidad. Lógicamente, estas preparaciones poseen una cierta cantidad de tejido desorganizado y de muerte celular, sobre todo a nivel de la superficie de corte (Misgeld

and Frotscher, 1982), aunque sin duda se encuentran más próximas a las condiciones que se dan en el animal *in vivo* que las preparaciones de membranas a partir de hipocampo de rata usadas para los estudios de fijación de radioligandos. Esto último puede explicar las diferencias que un mismo compuesto puede presentar al ser estudiado mediante estos dos tipos de muestra; dado que las membranas son sistemas más simples, normalmente se encuentra que los compuestos presentan una actividad más clara, más potente; los miniprismas, en cambio, hacen que interfieran muchos más factores sobre la acción de un compuesto, por lo que se podría observar una menor actividad, pero a la vez más real. También cabe destacar que los estudios de fijación de radioligandos reflejan el grado de ocupación del receptor, mientras que las preparaciones de miniprismas han servido para conocer la activación del sistema efector ligado a los receptores, valores que no tienen que coincidir ya que una unión al receptor no implica necesariamente una activación de éste.

El interés de los fosfoinosítidos en cuanto a mecanismos de control celular radica en el hecho de que son rápidamente hidrolizados cuando la célula responde a diversos estímulos, entre ellos los neurotransmisores (Berridge et al., 1983). Cuando estos agonistas interaccionan con el receptor adecuado, tiene lugar una rápida disminución de los fosfoinosítidos. El método seguido en este trabajo ha consistido en medir los niveles de fosfatos de inositol, productos hidrosolubles liberados cuando los fosfoinosítidos son hidrolizados por la fosfolipasa C. No es el objetivo de esta tesis el describir los mecanismos bioquímicos implicados en este proceso, pero sí diremos que son varios los receptores que al activarse producen un incremento en la producción de fosfatos de inositol, entre éstos podemos citar los adrenoceptores α_1 , los H_1 -histaminérgicos, y por supuesto, los receptores muscarínicos (Brown, Kendall, and Nahorski, 1984).

Una modificación que se introdujo en los experimentos de producción de fosfatos de inositol fue la utilización de huperzina A en todas las determinaciones. Como se ha comentado antes, este fármaco presenta una muy baja afinidad hacia los receptores muscarínicos (Tang et al., 1989), por lo cual se convirtió en el candidato ideal para nuestro objetivo. El fin de su utilización fue descartar que el incremento observado en la producción de fosfatos de inositol fuera debido al aumento de la ACh producido por la inhibición de la AChE a que dan lugar las huprinas. Se observó una diferencia significativa entre los experimentos realizados con y sin huperzina A (resultados no incluidos). Existen estudios que prueban que esto no es así en el caso del desplazamiento de radioligandos realizado por la tacrina, en presencia o ausencia de fisostigmina para inhibir la AChE (Musilkova and Tucek, 1991), por lo que no se consideró necesario utilizar huperzina A en este tipo de experimentos.

Los estudios de hidrólisis de fosfoinosítidos demostraron que las huprinas daban lugar a un aumento significativo en la producción de fosfatos de inositol, y que además este aumento era concentración-dependiente. Como producto de referencia se utilizó el carbacol, agonista muscarínico M_1 reconocido, siendo las CE_{50} de las huprinas aproximadamente 5 veces superiores a las de este compuesto. La curva concentración-respuesta del carbacol se adaptó perfectamente a un modelo con coeficiente de Hill igual a 1, confirmándose que actúa sobre una población homogénea de receptores, dato que coincide con los existentes en la bibliografía (Kunysz et al., 1988; Claro et al., 1989; Sallés et al., 1993). En cambio, las curvas para las huprinas presentaron un coeficiente de Hill significativamente diferente a la unidad, lo que hace esperar la

implicación de más de un tipo de receptor en el mecanismo mediante el cual estos fármacos incrementan la producción de fosfatos de inositol.

Como se ha citado previamente, son varios los receptores que pueden incrementar la hidrólisis de fosfoinosítidos produciendo un aumento de la liberación de fosfatos de inositol, por este motivo el siguiente paso, tras comprobar que las huprinas tenían este efecto, fue realizar la reversión de la respuesta mediante la utilización de diversos antagonistas. El incremento de la producción de fosfatos de inositol causado por el carbacol (10^{-4}M) fue revertido en un 86% por el antagonista M_1 pirenzepina (10^{-5}M) y prácticamente en un 100% por el antagonista muscarínico inespecífico atropina (10^{-6}M), estos datos están en concordancia con los estudios que indican que este agonista muscarínico actúa principalmente sobre los receptores muscarínicos M_1 y M_3 (Sallés, Wallace, and Fain, 1993), y coinciden también con el valor del coeficiente de Hill, el cual ya señalaba la actuación del carbacol sobre una población homogénea de receptores. De forma diferente, el efecto de las huprinas sobre la producción de fosfatos de inositol se vio sólo parcialmente revertido al usar los antagonistas muscarínicos, en concreto, la reversión fue de aproximadamente un 50% del efecto al usar atropina o pirenzepina. Al utilizar el antagonista específico α_1 -adrenérgico prazosina (10^{-6}M), se observó una disminución significativa en la producción de fosfatos de inositol, igual a 35.3% en el caso de la huprina Y y a 28.7% para la huprina Z. Al combinar prazosina con atropina a las concentraciones indicadas anteriormente se obtuvo un efecto aproximadamente aditivo. De todo esto podemos extraer varias conclusiones, en primer lugar podemos afirmar que las huprinas son efectivamente agonistas muscarínicos, y en concreto, agonistas de los receptores M_1 . En segundo lugar, se ha probado que éste no es, no obstante, el único mecanismo por el cual las huprinas actúan sobre la hidrólisis de

fosfoinosítidos, si no que existen otros sistemas implicados, entre los cuales parece contarse los adrenoceptores α_1 . El hecho de que los efectos de los antagonistas sean aditivos hace pensar que estamos ante dos formas independientes de estimular la producción de fosfatos de inositol, ya que si se tratara de una activación indirecta de los receptores adrenérgicos a través de los muscarínicos, o viceversa, la inhibición de los unos produciría también la reversión del efecto sobre los otros. Además, en ningún caso se llega al 100% de inhibición por lo que cabe esperar la implicación de algún otro mecanismo, además de la activación muscarínica y adrenérgica.

Los cerebros de pacientes con EA muestran varios cambios neuroquímicos, además de la grave disfunción del sistema colinérgico, incluyendo cambios en los sistemas noradrenérgicos (Bondareff et al., 1982; Mann et al., 1984), serotoninérgico (Curcio and Kemper, 1984; Yamamoto and Hirano, 1985) y peptidérgico (Davies et al., 1980; Rossor and Emson, 1982). Por lo tanto, tratamientos que actúen sobre otros sistemas, además de la inhibición de la AChE, como, por ejemplo, la inhibición de la recaptación de monoaminas y también la estimulación de su liberación, podrían resultar beneficiosos para los enfermos de Alzheimer. El mecanismo por el cual las huprinas activan los adrenoceptores α_1 es todavía desconocido, los posibles mecanismos incluyen una acción directa de los fármacos sobre estos receptores, o bien una acción indirecta al producir una inhibición de la recaptación o un aumento de la liberación de noradrenalina. La tacrina parece tener un efecto inhibitorio de la recaptación de noradrenalina y dopamina (Drukarch et al., 1988; Robinson et al., 1989), sugiriéndose una participación del sistema catecolaminérgico en su mecanismo de acción. Este compuesto no parece actuar sobre los adrenoceptores α_1 , si no que lo hace sobre los adrenoceptores β (Vivas et al., 1995), por lo que podría ser interesante determinar en

futuros estudios si las huprinas también actúan sobre este tipo de receptor. Así mismo, estudios realizados en varias regiones cerebrales de rata sugirieron que, a pesar de existir diferencias entre los receptores muscarínicos y los adrenoceptores α_1 en cuanto a la hidrólisis de fosfoinosítidos, también comparten diversas similitudes en ciertas regiones cerebrales, como corteza cerebral, hipocampo e hipotálamo, donde cabría pensar que estos dos tipos de receptores se encuentren en las misma células y compartan una misma reserva de inosítidos (Gonzales and Crews, 1985).

Se ha observado que algunos IAChE, dependiendo de la ruta de administración, tienen diversos efectos sobre la concentración extracelular de noradrenalina en corteza cerebral (Zhu et al., 1996), entre estos compuestos se incluye la huperzina A (Zhu and Giacobini, 1995). Además, los receptores nicotínicos juegan un papel importante en la regulación de la neurotransmisión noradrenérgica en el sistema central y periférico (Wonnacott, 1997; Sershen et al., 1995), dando lugar los agonistas nicotínicos a un aumento en la liberación de noradrenalina (Kiss et al., 1999). Recientemente se ha descrito que la huprina X antes citada presenta un efecto agonista sobre los receptores nicotínicos y es probable que este efecto se dé mediante un mecanismo de acción alostérico (Roman et al., 2002), aunque este tema se está estudiando más detalladamente. Previo a este trabajo, se realizó un estudio en órgano eléctrico de *Torpedo marmorata* en el que se probó que tanto la huprina X como la huprina Y interaccionan con los receptores nicotínicos (Ros et al., 2001). Todo esto, junto con el hecho de que el incremento en la liberación de fosfatos de inositol producido por las huprinas objeto de este estudio es revertido parcialmente por el antagonista nicotínico mecamilamina, sería una posible explicación del efecto adrenérgico observado. Es decir, las huprinas Y y Z actuarían activando el receptor nicotínico, y éste a su vez

incrementaría la liberación de noradrenalina, que obviamente actuaría como agonista α_1 -adrenérgico, dándose como resultado final un incremento de la producción de fosfatos de inositol por la vía adrenérgica, además de por la muscarínica.

Una observación interesante ha sido la determinación de la existencia de una disminución significativa de los receptores nicotínicos en cerebros post-mortem obtenidos de personas que padecían EA (Nordberg and Winblad, 1986; Warpman and Nordberg, 1995) e *in vivo* en pacientes mediante estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) (Nordberg et al., 1995). Por el contrario, se ha descrito un aumento del número de receptores nicotínicos en ratas tratadas con tacrina (Nilsson-Håkansson, Lai, and Nordberg, 1990), y también en pacientes en tratamientos a largo plazo con este compuesto (Nordberg et al., 1992; Nordberg et al., 1998). Además, diversos IChE, incluyendo tacrina, fisostigmina y galantamina, han probado tener la capacidad de unirse a un punto alostérico de los receptores nicotínicos dando lugar a una activación de los mismos, lo cual puede ser importante para su eficacia clínica (Svensson and Nordberg, 1996; Maelicke and Albuquerque, 2000). Actuando en este punto alostérico del receptor nicotínico, los IChE podrían proteger al canal de la desensibilización y, por lo tanto, mejorar la neurotransmisión colinérgica vía receptores nicotínicos funcionales.

Es importante destacar que la estimulación de los receptores M_1 aumenta la liberación de PPA soluble, y en consecuencia disminuye la formación de proteína βA (Eckols et al., 1995). La existencia de una interacción entre el metabolismo anormal del PPA y la disfunción colinérgica es cada vez más obvia (Perry et al., 1996). El PPA es una proteína transmembranal que es procesada por una α -secretasa en su dominio

extracelular/intraluminal tras la activación de receptores asociados a proteínas G acopladas a su vez a hidrólisis de fosfoinosítidos. La estimulación de receptores colinérgicos acoplados a estos sistemas y a la activación de la protein-kinasa C ha demostrado dar un incremento en la liberación de PPA's en diversos tipos de células (Buxbaum et al., 1990; Buxbaum et al., 1992; Wolf et al., 1995; Nitsch et al., 1996; Slack et al., 1997). La activación mediante agonistas muscarínicos de células PC12 transfectadas con receptores muscarínicos M₁ resultó en la secreción de PPA's, lo cual reduce a su vez la producción de proteína β -A (Danenberg et al., 1995). Por tanto, un empeoramiento de las señales de transducción ligadas al sistema colinérgico a causa de la proteína β -A podría reducir la liberación de PPA's. Dado que el PPA humano protege las neuronas frente a daños de excitotoxicidad aguda y crónica *in vivo* (Masliah et al., 1997), a la vez que disminuye los niveles de proteína β -A, la activación de los receptores muscarínicos M₁ podría jugar además un papel en la neuroprotección, representando esto una ventaja adicional de las huprinas Y y Z como agonistas de estos receptores.

Conclusiones

1. Los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* indican que:
 - a) La huprina Y y huprina Z son dos potentes inhibidores de la AChE, presentando una actividad sobre la enzima superior a la tacrina y la huperzina A en las mismas condiciones.
 - b) Ambas huprinas presentan una actividad superior sobre la AChE que sobre la BChE, aunque la actividad sobre esta última enzima es también destacable, y superior a la realizada por la huperzina A.
 - c) Estos compuestos presentan una mayor selectividad por la AChE humana que por la bovina, lo cual contrasta con los resultados obtenidos para la tacrina y la huperzina A, que actuaron con mayor potencia sobre la AChE bovina.
 - d) La actividad de la huprina Y muestra una dependencia del tiempo para realizar el efecto inhibitorio de la AChE, mientras que esto no es así en el caso de la huprina Z. Además, la huprina Y se une de forma muy estable a la enzima a través de un mecanismo de tipo *tight-binding*.
 - e) La inhibición de la AChE realizada por las huprinas Y y Z es de tipo mixto, lo cual coincide con los datos existentes sobre la tacrina y la huperzina A. El cálculo de la K_i muestra que la huprina Y presenta una afinidad por la enzima significativamente superior a la mostrada por la huprina Z, y esta afinidad es superior en ambos casos a la de los compuestos parentales.

2. Los resultados de los experimentos *ex vivo* indican que:
 - a) Tanto la huprina Y como la huprina Z atraviesan la barrera hematoencefálica y actúan inhibiendo la AChE en el SNC con elevada potencia.

-
- b) La huprina Y es más activa que la huprina Z, y ambos compuestos son más potentes en esta situación que la huperzina A y la tacrina, lo cual coincide con los resultados obtenidos *in vitro*.
 - c) El tiempo de semivida biológica es en ambos casos igual aproximadamente a 1 hora.
 - d) Estos compuestos presentan un buen índice terapéutico ya que a bajas dosis producen una inhibición elevada de la AChE y se necesitan altas dosis para observar los primeros efectos tóxicos (ligera salivación y leve temblor).
 - e) El efecto de las huprinas sobre las colinesterasas plasmáticas es muy inferior al efecto detectado en SNC, por tanto cabe pensar que estos compuestos presenten efectos indeseados mínimos, lo cual coincide con la observación realizada en el apartado anterior.
3. Los resultados del estudio del efecto de las huprinas sobre los receptores muscarínicos indican que:
- a) Estos compuestos presentan una alta afinidad por los receptores muscarínicos M_1 , afinidad superior a la descrita para la huperzina A y la tacrina.
 - b) La afinidad por los receptores muscarínicos M_2 es baja, y significativamente inferior a la que presentan por los receptores M_1 .
 - c) Los estudios de hidrólisis de fosfoinosítidos demostraron que las huprinas daban lugar a un aumento significativo en la producción de fosfatos de [3H]-inositol, y que además este aumento era concentración-dependiente, lo cual prueba que actúan como agonistas muscarínicos M_1 .
 - d) El efecto de las huprinas sobre la producción de fosfatos de [3H]-inositol se vio sólo parcialmente revertido al usar los antagonistas muscarínicos atropina o

pirenzepina, lo cual indica que existen otros tipos de receptores implicados en este proceso.

- e) El antagonista α_1 -adrenérgico prazosina revirtió también en parte la formación de fosfatos de [^3H]-inositol, por lo que las huprinas también actúan sobre estos receptores. Este mecanismo parece independiente del agonismo sobre los receptores muscarínicos M_1 .
- f) La combinación de los antagonistas atropina y prazosina no revierte totalmente el incremento de la producción de fosfatos de [^3H]-inositol inducido por las huprinas, por lo cual cabe esperar la implicación de algún otro mecanismo de acción.
- g) La liberación de fosfatos de inositol producida por las huprinas es revertida parcialmente por el antagonista nicotínico mecamilamina. En relación a esto, el efecto adrenérgico se podría explicar como un mecanismo indirecto a través de la estimulación de receptores nicotínicos.

Como conclusión final podemos decir que tanto la huprina Y como la huprina Z podrían ser de utilidad para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer dadas las características que han demostrado tras su estudio farmacológico, aunque todavía son necesarios más datos para poder utilizarlas clínicamente.

Bibliografía

Adler M and Filbert M (1990) Role of butyrylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle function. *FEBS Lett* **267**:107-110.

Aguado F, Badia A, Baños J, Bosch F, Bozzo C, Camps P, Contreras J, Dierssen M, Escolano C, Görbig D, Muñoz-Torrero D, Pujol M, Simón M, Vázquez M, and Vivas N (1994) Synthesis and evaluation of tacrine-related compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* **29**:205-221.

Alvares A and Pratt W (1990) Pathways of drug metabolism, in *Principles of drug action. The basis of pharmacology* (Pratt W and Taylor P eds) pp 365-422, Churchill Livingstone, New York.

Arenas i Gou T (1998) Donepezil. *Circ Farm* **56**:24-26.

Arendt T, Brückner M, Lange M, and Bigl V (1992) Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development - a study of molecular forms. *Neurochem Int* **21**:381-396.

Ashani Y, Peggins JI, and Doctor B (1992) Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A. *Biochem Biophys Res Commun* **184**:719-726.

Atack J, Perry E, Bonham J, Candy J, and Perry R (1986) Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J Neurochem* **47**:263-277.

Atack J, Yu Q, Soncrant T, Brossi A, and Rapoport S (1989) Comparative inhibitory effects of various physostigmine analogs against acetyl- and butyrylcholinesterases. *J Pharmacol Exp Ther* **249**:194-202.

Auld D, Kar S, and Quirion R (1998) β -amilod peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link? *TINS* **21**:43-49.

Avery E, Baker L, and Asthana S (1997) Potential role of muscarinic agonists in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* **11**:450-459.

Bacq Z (1983) Chemical transmission of nerve impulses, in *Discoveries in Pharmacology, Vol 1: Psycho- and Neuropharmacology* (Parnham M and Bruinvels J eds) pp 49-103, Elsevier, Amsterdam.

Badia A, Baños J, Camps P, and Vivas NM (1998) Synthesis and evaluation of tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Biorg Med Chem* **6**:427-440.

Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke R-L, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, and Yednock T (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* **6**:916-919.

Bartus R, Dean RI, Beer B, and Lippa A (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**:408-414.

Beeri R, Andres C, Lev-Lehman E, Timberg R, Huberman T, Shani M, and Soreq H (1995) Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. *Curr Biol* **5**:1063-1071.

Behl C and Moosmann B (2000) Estrogens and other antioxidants in neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Oxid Stress Dis* **5**:467-485.

Belluardo N, Mudò G, Blum M, and Fuxe K (2000) Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav Brain Res* **113**:21-34.

Benzi G and Moretti A (1998) Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *Eur J Pharmacol* **346**:1-13.

Berridge M, Dawson R, Downes C, Heslop J, and Irvine R (1983) Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem J* **212**:473-482.

Berridge M, Downes C, and Hanley M (1982) Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem J* **206**:587-595.

Bickel U, Thomsen T, Fischer J, Weber W, and Kewitz H (1991) Galanthamine: Pharmacokinetics, tissue distribution and cholinesterase inhibition in brain of mice. *Neuropharmacology* **30**:447-454.

Birks J, Grimley Evans J, Iakovidou V, and Tsolaki M (2000) Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* **4**:CD001191.

Bondareff W, Mountjoy C, and Roth M (1982) Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus coeruleus) in senile dementia. *Neurology* **32**:164-168.

Bondareff W, Mountjoy C, Roth M, and Hauser D (1989) Neurofibrillary degeneration and neuronal loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **10**:709-715.

Bonner T (1989) The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci* **12**:148-151.

Bores G, Huger F, Petko W, Mutlib A, Camacho F, Rush D, Selk D, Wolf V, Kosley RJ, Davis L, and Vargas H (1996) Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J Pharmacol Exp Ther* **277**:728-738.

Bowen D, Smith C, White P, Flack R, Carrasco L, Gedye J, and Davison A (1977) Chemical pathology of the organic dementias: II. Quantitative estimation of cellular changes in post-mortem brains. *Brain* **100**:427-453.

Brown E, Kendall D, and Nahorski S (1984) Inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortical slices: I. Receptor characterisation. *J Neurochem* **42**:1379-1387.

Buxbaum J, Gandy S, Cicchetti P, Ehrlich M, Czernik A, Fracasso R, Ramabhadran T, Unterbeck A, and Greengard P (1990) Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:6003-6006.

Buxbaum J, Oishi M, Chen H, Pinkas-Kramarski R, Jaffe E, Gandy S, and Greengard P (1992) Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:10075-10078.

Camps P, El Achab R, Görbig D, Morral J, Muñoz-Torrero D, Badia A, Baños J, Vivas N, Barril X, Orozco M, and Luque F (1999) Synthesis, in vitro pharmacology, and molecular modeling of very potent tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's Disease. *J Med Chem* **42**:3227-3242.

Camps P, El Achab R, Morral J, Muñoz-Torrero D, Badia A, Baños J, Vivas N, Barril X, Orozco M, and Luque F (2000) New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* **43**:4657-4666.

Camps P, Gómez P, Muñoz-Torrero D, Badia A, Vivas N, Barril X, Orozco M, and Luque J (2001) Synthesis, in vitro pharmacology and molecular modeling of syn-huprines as acetylcholinesterase inhibitors. *J Med Chem* **44**:4733-4736.

Chatonnet A and Lockridge O (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* **260**:625-634.

Check E (2001) Need for vaccine stocks questioned. *Nature* **414**:677.

Chelliah J, Smith J, and Fariss M (1994) Inhibition of cholinesterase activity by tetrahydroaminoacridine and the hemisuccinate esters of tocopherol and cholesterol. *Biochim Biophys Acta* **1206**:17-26.

Cheng D and Tang X (1998) Comparative studies of huperzina A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. *Pharmacol Biochem Behav* **60**:377-386.

Cheng Y and Prusoff W (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**:3099-3108.

Cherny R, Atwood C, Xilinas M, Gray D, Jones W, McLean C, Barnham K, Volitakis I, Fraser F, Kim Y, Huang X, Goldstein L, Moir R, Lim J, Beyreuther K, Zheng H, Tanzi R, Masters C, and Bush A (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30**:665-676.

Claro E, Wallace M, Lee H-M, and Fain J (1989) Carbachol in the presence of Guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) stimulates the breakdown of exogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, phosphatidylinositol 4-phosphate, and phosphatidylinositol by rat brain membranes. *J Biol Chem* **264**:18288-18295.

Costa J, Anand R, Cutler N, Hartman R, Mancione L, Sramek J, and Veroff A (1999) Correlation between cognitive effects and level of acetylcholinesterase inhibition in a trial of rivastigmine in Alzheimer's patients. *Proc Am Psych Assoc Poster* **NR:561**.

Coyle J, Price D, and DeLong M (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* **219**:1184-1190.

Craft S, Teri L, Edland S, Kukull W, Schellenberg G, McCormick W, Bower J, and Larson E (1998) Accelerated decline in apolipoprotein E-epsilon 4 homozygotes with Alzheimer's disease. *Neurology* **51**:149-153.

Cuadra G and Giacobini E (1995) Coadministration of cholinesterase inhibitors and idazoxan: effects of neurotransmitters in rat cortex in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **273**:230-240.

Cuadra G, Summers K, and Giacobini E (1994) Cholinesterase inhibitor effects on neurotransmitters in rat cortex in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **270**:277-284.

-
- Cummings J (1995) Dementia: the failing brain. *The Lancet* **345**:1481-1484.
- Cummings J, Cyrus P, and Ruzicka B (1998) The efficacy of metrifonate in improving the behavioral disturbances of Alzheimer's disease patients. *Am Acad Neurol* **524**:1004.
- Curcio C and Kemper T (1984) Nucleus raphe dorsalis in dementia of the Alzheimer type: neurofibrillary changes and neuronal packing density. *J Neuropathol Exp Neurol* **43**:359-368.
- Danenberg D, Haring R, Heldman E, Gurwitz D, Ben-Nathan D, Pittel Z, Zuckerman A, and Fisher A (1995) Dehydroepiandrosterone augments M1-muscarinic receptor-stimulated amyloid precursor protein secretion in desensitized PC12M1 cells. *Ann N Y Acad Sci* **774**:300-303.
- Davies P (1979) Neurotransmitter-related enzymes in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* **171**:319-327.
- Davies P, Katzman R, and Terry R (1980) Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *Nature* **288**:279-280.
- Davies P and Maloney A (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**:1403.
- Dekosky S and López O (1998) Neurobiología y biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* **27 (Supl 1)**:S 16-S 24.
- Diaz Brinton R, Chen S, Montoya M, Hsieh D, Minaya J, Kim J, and Chu H (2000) The women's health initiative estrogen replacement therapy is neurotrophic and neuroprotective. *Neurobiol Aging* **21**:475-496.
- Dixon M and Webb F (1979) *The enzymes*. Longman, London.

Drukarch B, Leysen J, and Stoof J (1988) Further analysis of the neuropharmacological profile of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA), an alleged drug for the treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci* **42**:1011-1017.

Eckols K, Bymaster F, Mitch C, Shannon H, Ward J, and DeLapp N (1995) The muscarinic M₁ agonist xanomeline increases soluble amyloid precursor protein release from Chinese hamster ovary-m1 cells. *Life Sci* **57**:1183-1190.

Edwards J and Brimijoin S (1982) Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of the rat. *J Neurochem* **38**:1393-1403.

Ellman G, Courtney K, Andres VJ, and Featherstone R (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**:88-95.

Enz A, Amstutz R, Boddeke H, Gmelin G, and Malanowski J (1993) Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* **98**:431-438.

Farber S, Nitsch R, Schulz J, and Wurtman R (1995) Regulated secretion of β -amyloid precursor protein in rat brain. *J Neurosci* **15**:7442-7451.

Fassbender K, Masters C, and Beyreuther K (2001) Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets. *Naturwissenschaften* **88**:261-267.

Finch C (2001) Inflammation in Alzheimer's disease. *Mol Mech Neurodegen Dis* **1**:87-110.

Flynn D and Mash D (1989) Multiple in vitro interactions with and differential in vivo regulation of muscarinic receptor subtypes by tetrahydroaminoacridine. *J Pharmacol Exp Ther* **250**:573-581.

Fratiglioni L and Wang H (2000) Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. *Behav Brain Res* **113**:117-120.

Freeman S and Dawson R (1991) Tacrine: a pharmacological review. *Prog Neurobiol* **36**:257-277.

Garcia-Ayllon M, Gomez J, and Vidal C (1999) Amphiphilic properties of acetylcholinesterase monomers in mouse plasma. *Neurosci Lett* **265**:211-214.

Gentleman S, Graham D, and Roberts G (1993) Molecular pathology of head trauma: altered beta APP metabolism and the aetiology of Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* **96**:237-246.

Giacobini E (1990) Cholinergic receptors in human brain: effects of aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **27**:548-560.

Giacobini E (1993) Pharmacotherapy of Alzheimer disease: new drugs and novel strategies. *Prog Brain Res* **98**:447-454.

Giacobini E (1994) Cholinomimetic therapy of Alzheimer's disease: does it slow down deterioration?, in *Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction* (Racagni G, Brunello N, and Langer S eds) pp 51-57, New York: International Academy of Biomedical and Drug Research/Karger.

Giacobini E (1996) Cholinesterase inhibitors do more than inhibit cholinesterase, in *Alzheimer disease: from molecular biology to therapy* (Becker R and Giacobini E eds) pp 187-204, Boston: Birkhäuser.

Giacobini E (1997) From molecular structure to Alzheimer therapy. *Jpn J Pharmacol* **74**:225-241.

Giacobini E (1998) Aging, Alzheimer's disease, and estrogen therapy. *Exp Gerontol* **33**:865-869.

Giacobini E (2000) Cholinesterase inhibitors: from the Calabar bean to Alzheimer therapy, in *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors* (Giacobini E ed) pp 181-226, Martin Dunitz Ltd, London.

Giacobini E and Cuadra G (1994) Second and third generation cholinesterase inhibitors: from preclinical studies to clinical efficacy, in *Alzheimer disease: therapeutic strategies* (Giacobini E and Becker R eds) pp 155-171, Boston: Birkhäuser.

Giacobini E, DeSarno P, Clark B, and McIlhany M (1989) The cholinergic receptor system of the human brain - neurochemical and pharmacological aspects in aging and Alzheimer. *Prog Brain Res* **79**:335-343.

Giacobini E, Zhu X-D, Williams E, and Sherman KA (1996) The effect of the selective reversible acetylcholinesterase inhibitor E2020 on extracellular acetylcholine and biogenic amine levels in rat cortex. *Neuropharmacology* **35**:205-211.

Golde T and Eckman C (2001) Cholesterol modulation as an emerging strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discov Today* **6**:1049-1055.

Gonzales R and Crews F (1985) Cholinergic- and adrenergic-stimulated inositide hydrolysis in brain: interaction, regional distribution, and coupling mechanism. *J Neurochem* **45**:1076-1084.

Gorman D, Read S, and Cummings J (1993) Cholinergic therapy of behavioral disturbances in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* **6**:229-234.

Gotz J, Chen F, van Dorpe J, and Nitsch R (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* **293**:1491-1495.

Green P and Simpkins J (2000) Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int J Dev Neurosci* **18**:347-358.

Greig N, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway H, Perry T, Lee B, Ingram D, and Lahiri D (2001) A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin* **17**:159-165.

Guillozet A, Smiley J, Mash D, and Mesulam M (1997) Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann Neurol* **42**:909-918.

Haring R, Gurwitz D, Barg J, Pinkas-Kramarski R, Heldman E, Pittel Z, Wengier A, Meshulam H, Marciano D, Karton Y, and et al. (1994) Amyloid precursor protein secretion via muscarinic receptors: reduced desensitization using the M1-selective agonist AF102B. *Biochem Biophys Res Commun* **203**:652-658.

Hartmann T (2001) Cholesterol, A β and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **24**:S45-S48.

Hellström-Lindahl E, Moore H, and Nordberg A (2000) Increased levels of tau protein in SH-SY5Y cells after treatment with cholinesterase inhibitors and nicotinic agonists. *J Neurochem* **74**:777-784.

Helmuth L (2000) Further progress on a β -amyloid vaccine. *Science* **289**:375.

Henderson V (1997) Estrogen replacement therapy for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drugs* **8**:343-351.

Hinz V, Grewig S, and Schmidt BH (1996) Metrifonate and dichlorvos: effects of a single oral administration on cholinesterase activity in rat brain and blood. *Neurochem Res* **21**:339-345.

Holmes C (2002) Genotype and phenotype in Alzheimer's disease. *Brit J Psychiat* **180**:131-134.

Holmstedt B (2000) Cholinesterase inhibitors: an introduction, in *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors* (Giacobini E ed) pp 1-8, Martin Dunitz Ltd, London.

Hunter A, Murray T, Jones J, Cross A, and Green A (1989) The cholinergic pharmacology of tetrahydroaminoacridine *in vivo* and *in vitro*. *Br J Pharmacol* **98**:79-86.

Itoh Y, Amano N, Inoue M, and Yagishita S (1997) Scanning electron microscopical study of the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* **94**:78-86.

Jann M (2000) Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* **20**:1-12.

Kar S, Seto D, Gaudreau P, and Quirion R (1996) Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci* **16**:1034-1040.

Kiefer-Day J, Abdallah E, Forray C, Lee N, Kim O, and El-Fakahany E (1993) Effects of tacrine on brain muscarinic receptor mediated second messenger signals. *Pharmacology* **47**:98-110.

Kiefer-Day J, Campbell H, Towles J, and El-Fakahany E (1991) Muscarinic subtype selectivity of tetrahydroaminoacridine: possible relationship to its capricious efficacy. *Eur J Pharmacol* **203**:421-423.

Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Kimura J, Kume T, Kochiyama-Maeda T, and Akaike A (1997) Nicotinic receptor stimulation protects neurons against β -amyloid toxicity. *Ann Neurol* **42**:159-163.

Kiss J, Vizi E, and Westerink B (1999) Effect of neostigmine on the hippocampal noradrenaline release: role of cholinergic receptors. *Neuroreport* **10**:81-86.

Korczyń A (2000) Muscarinic M₁ agonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Exp Opin Investig Drugs* **9**:2259-2267.

Kosasa T, Kuriya Y, Matsui K, and Yamanishi Y (2000) Inhibitory effect of orally administered donepezil hydrochloride (E2020), a novel treatment for Alzheimer's disease, on cholinesterase activity in rats. *Eur J Pharmacol* **389**:173-179.

Krall W, Sramek J, and Cutler N (1999) Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer disease. *Ann Pharmacother* **33**:441-450.

Kunysz E, Michel A, and Whiting R (1988) Functional and direct binding studies using subtype selective muscarinic receptor antagonist. *Br J Pharmacol* **93**:491-500.

Ladner C, Celesia G, Magnuson D, and Lee J (1995) Regional alterations in M₁ muscarinic receptor-G protein coupling in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**:783-789.

Lahiri D, Farlow M, Hintz N, Utsuki T, and Greig N (2000) Cholinesterase inhibitors, β -amyloid precursor protein and amyloid β -peptides in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* **176**:60-67.

Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, and Wisniewski H (1995) Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol (Berl)* **89**:35-41.

Lee H and Fain J (1992) Magnesium-dependent inhibition of agonist-stimulated phosphoinositide breakdown in rat cortical slices by excitatory amino acids. *J Neurochem* **59**:953-962.

Levy M, Cummings J, and Kahn-Rose R (1999) Neuropsychiatric symptoms and cholinergic therapy for Alzheimer's disease. *Gerontology* **45**:15-22.

Lilienfeld S (2002) Galantamine - a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev* **8**:159-176.

Lim G, Yang F, Chu T, Chen P, Beech W, Teter B, Tran T, Ubeda O, Ashe K, Frautschy S, and Cole G (2000) Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci* **20**:5709-5714.

Lin L, Georgievska B, Mattsson A, and Isacson O (1999) Cognitive changes and modified processing of amyloid precursor protein in the cortical and hippocampal system after cholinergic synapse loss and muscarinic receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:12108-12113.

Lockridge O, Bartels C, Vaughan T, Wong C, Norton S, and Johnson L (1987) Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* **262**:549-557.

Lucca U (1999) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and Alzheimer's disease: update on recent data and their therapeutic implications. *CNS Drugs* **11**:207-224.

Maelicke A and Albuquerque E (2000) Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* **393**:165-170.

Maelicke A, Coban T, Storch A, Schrattenholz A, Pereira E, and Albuquerque E (1997) Allosteric modulation of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor ion channel activity by noncompetitive agonists. *J Recept Signal Transduct Res* **17**:11-28.

Mandelkow E (1999) The tangled tale of tau. *Nature* **402**:588-589.

Mann D, Yates P, and Marcyniuk B (1984) A comparison of changes in the nucleus basalis and locus coeruleus in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **47**:201-203.

Masliah E, Westland C, Rockenstein E, Abraham C, Mallory M, Veinberg I, Sheldon E, and Mucke L (1997) Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries in vivo. *Neuroscience* **78**:135-146.

Massoulié J (2000) Molecular forms and anchoring of acetylcholinesterase, in *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors* (Giacobini E ed) pp 81-101, Martin Dunitz Ltd, London.

Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, and Vallette F (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* **41**:31-91.

Mattson M, Barger S, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky V, and Rydel R (1993) β -Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **16**:409-414.

Mattson M, Pedersen W, Duan W, Culmsee C, and Camandola S (1999) Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann N Y Acad Sci* **893**:154-175.

McDowell I (2001) Alzheimer's disease: insights from epidemiology. *Aging (Milano)* **13**:143-162.

McGeer P and McGeer E (1998) Mechanism of cell death in Alzheimer's disease - immunopathology. *J Neural Transm* **54**:159-166.

McKeon-O'Malley C, Saunders A, Buss A, and Tanzi R (1998) Potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Emerging Therapeutic Targets* **2**:157-159.

McKinney M, Miller J, Yamada F, Tuckmantel W, and Kozikowski A (1991) Potencies and stereoselectivities of enantiomers of huperzine A for inhibition of rat cortical acetylcholinesterase. *Eur J Pharmacol* **203**:303-305.

Messer W, Thomas G, and Hoss W (1987) Selectivity of pirenzepine in the central nervous system. II. Differential effects of pirenzepine and scopolamine on performance of a representational memory task. *Brain Res* **407**:37-45.

Mesulam M and Geula C (1994) Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann Neurol* **36**:722-727.

Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, and Quinn B (2002) Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol Dis* **9**:88-93.

Meyer E and Otero D (1985) Pharmacological and ionic characterizations of the muscarinic receptors modulating [³H]acetylcholine release from rat cortical synaptosomes. *J Neurosci* **5**:1202-1207.

Meyer M, Tschanz J, Norton M, Welsh-Bohmer K, Steffens D, Wyse B, and Breitner J (1998) APOE genotype predicts when - not whether - one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat Genet* **19**:321-322.

Minneman K and Johnson R (1984) Characterization of alpha₁-adrenergic receptors linked to [³H]inositol metabolism in rat cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther* **230**:317-323.

Miranda S, Opazo C, Larrondo L, Muñoz F, Ruiz F, Leighton F, and Inestrosa N (2000) The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid β -peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **62**:633-648.

Misgeld U and Frotscher M (1982) Dependence of the viability of neurons in hippocampal slices on oxygen supply. *Brain Res Bull* **8**:95-100.

Moran M, Mufson E, and Gómez-Ramos P (1993) Colocalization of cholinesterases with β -amyloid protein in aged and Alzheimer's brain. *Acta Neuropathol (Berl)* **85** :362-369.

Mori F, Cuadra G, and Giacobini E (1995a) Metrifonate effects on acetylcholine and biogenic amines in rat cortex. *Neurochem Res* **20**:1081-1088.

Mori F, Lai C-C, Fusi F, and Giacobini E (1995b) Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. *Neuroreport* **6**:633-636.

Mori H and Ihara Y (1991) Neurofibrillary tangles, dystrophic neurites (curly fibers), and abnormal phosphorylation of tau. *Brain Pathol* **1**:273-277.

Morris J, Cyrus P, Orazem J, Mas J, Bieber F, Ruzicka B, and Gulanski B (1998) Metrifonate benefits cognitive, behavioral, and global function in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* **50**:1222-1230.

Mountjoy C (1986) Correlations between neuropathological and neurochemical changes. *Br Med Bull* **42**:81-85.

Muir J (1996) Acetylcholine, aging, and Alzheimer's Disease. *Pharmacol Biochem Behav* **56**:687-696.

Munson P and Rodbard D (1980) Ligand: a versatile computerised approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* **107**:220-239.

Musilkova J and Tucek S (1991) The binding of cholinesterase inhibitors tacrine (tetrahydroaminoacridine) and 7-methoxytacrine to muscarinic acetylcholine receptors in rat brain in the presence of eserine. *Neurosci Lett* **125**:113-116.

Nanri M, Kasahara N, Yamamoto J, Miyake H, and Watanabe H (1997) GTS-21, a nicotinic agonist, protects against neocortical neuronal cell loss induced by the nucleus basalis magnocellularis lesion in rats. *Jpn J Pharmacol* **74**:285-289.

Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis K, Davis P, Greengard P, and Buxbaum J (2000) Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *J Am Med Assoc* **283**:1571-1577.

Nilsson-Håkansson L, Lai Z, and Nordberg A (1990) Tetrahydroaminoacridine induces opposite changes in muscarinic and nicotinic receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol* **186**:301-305.

Nilsson L, Adem A, Hardy J, Winblad B, and Nordberg A (1987) Do tetrahydroaminoacridine (THA) and physostigmine restore acetylcholine release in Alzheimer brain via nicotinic receptors. *J Neural Transm* **70**:357-368.

Nitsch R, Slack B, Wurtman R, and Growdon J (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**:304-307.

Nitsch R, Wurtman R, and Growdon J (1996) Regulation of APP processing. Potential for the therapeutical reduction of brain amyloid burden. *Ann N Y Acad Sci* **777**:175-182.

Nordberg A (1992) Neuroreceptor changes in Alzheimer's disease. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **4**:303-328.

Nordberg A, Amberla K, Shigeta M, Lundqvist H, Viitanen M, Hellström-Lindahl E, Johansson M, Andersson J, Hartvig P, Lilja A, Langstrom B, and Winblad B (1998) Long-term tacrine treatment in three mild Alzheimer patients: effects on nicotinic receptors, cerebral blood flow, glucose metabolism, EEG and cognitive abilities. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **12**:228-237.

Nordberg A, Lilja A, Lundqvist H, Hartvig P, Amberla K, Viitanen M, Warpman U, Johansson M, Hellström-Lindh E, Bjurling P, and et al. (1992) Tacrine restores cholinergic nicotinic receptors and glucose metabolism in Alzheimer patients as visualized by positron emission tomography. *Neurobiol Aging* **13**:747-758.

Nordberg A, Lundqvist H, Hartvig P, Lilja A, and Långström B (1995) Kinetic analysis of regional (S)(-)¹¹C-nicotine binding in normal and Alzheimer brains: in vivo assessment using positron emission tomography. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **9**:21-27.

Nordberg A and Winblad B (1986) Reduced number of ³H-nicotine and ³H-acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains. *Neurosci Lett* **72**:115-119.

Palmer A (1998) Excitatory amino acids and neurodegeneration. *Front Neurobiol* **3**:195-226.

Palmer A (1999) The activity of the pentose phosphate pathway is increased in response to oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **106**:317-328.

Palmer A (2002) Pharmacotherapy for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends Pharmacol Sci* **23** :426-433.

Palmer A and Gershon S (1990) Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic? *FASEB J* **4**:2745-2752.

Parascandola J and Jasensky R (1974) Origins of the receptor theory of drug action. *Bull Hist Med* **48**:199-220.

Pearce B and Potter L (1991) Coupling of M₁ muscarinic receptors to G protein in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **5**:163-172.

Pearlson G, Ross C, Lohr W, Rovner B, Chase G, and Folstein M (1990) Association between family history of affective disorder and the depressive syndrome of Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* **147**:452-456.

-
- Pepeu G (1988) Acetylcholine and brain aging. *Pharmacol Res Commun* **20**:91-97.
- Pereira E, Alkondon M, Reinhardt S, Maelicke A, Peng X, Lindstro J, Whiting P, and Albuquerque E (1994) Physostigmine and galanthamine: probes for a novel binding site on the $\alpha 4\beta 2$ subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in fibroblast cells. *J Pharmacol Exp Ther* **270**:768-778.
- Perry E (1986) The cholinergic hypothesis. Ten years on. *Br Med Bull* **42**:63-69.
- Perry E, Court J, Lloyd S, Johnson M, Griffiths M, Spurden D, Piggott M, Turner J, and Perry R (1996) Beta-amyloidosis in normal aging and transmitter signaling in the human temporal lobe. *Ann N Y Acad Sci* **777**:388-392.
- Perry E, Perry R, Blessed G, and Tomlinson B (1977) Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* **1**:189.
- Perry E, Perry R, Blessed G, and Tomlinson B (1978a) Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neurophatol Appl Neurobiol* **4**:273-277.
- Perry E, Smith C, Court J, Bonham J, Rodway M, and Atack J (1988) Interaction of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroaminoacridine (THA) with human cortical nicotinic and muscarinic receptor binding in vitro. *Neurosci Lett* **91**:211-216.
- Perry E, Tomlinson B, Blessed G, Bergmann K, Gibson P, and Perry R (1978b) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J* **2**:1457-1459.
- Rang H, Dale M, and Ritter J (1999) Cholinergic transmission, in *Pharmacology* pp 110-138, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Richards C and Sercombe R (1970) Calcium, magnesium and the electrical activity of guinea-pig olfactory cortex *in vitro*. *J Physiol* **211**:571-584.

Robinson T, De Souza R, Cross A, and Green A (1989) The mechanism of tetrahydroaminoacridine-evoked release of endogenous 5-hydroxytryptamine and dopamine from rat tissue prisms. *Br J Pharmacol* **98**:1127-1136.

Rogers S, Farlow M, Doody R, Mohs R, and Friedhoff L (1998) A 24-week, double-blind, placebo controlled-trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* **50**:136-145.

Rogers S, Yamanishi Y, and Yamatsu K (1991) E2020: the pharmacology of a piperidine cholinesterase inhibitor, in *Cholinergic basis for Alzheimer therapy* (Becker R and Giacobini E eds) pp 314-320, Birkhäuser, Boston, MA.

Roman S, Vivas N, Badia A, and Clos M (2002) Interaction of a new potent anticholinesterasic compound (\pm)huprine X with muscarinic receptors in rat brain. *Neurosci Lett* **325**:103-106.

Ros E, Aleu J, Gómez de Aranda I, Muñoz-Torrero D, Camps P, Badia A, Marsal J, and Solsona C (2001) The pharmacology of novel acetylcholinesterase inhibitors, (\pm)-huprines Y and X, on the *Torpedo* electric organ. *Eur J Pharmacol* **421**:77-84.

Rossor M and Emson P (1982) Neuropeptides in degenerative diseases of the central nervous system. *Trends Neurosci* **5**:399-401.

Sallés J, Wallace M, and Fain J (1993) Differential effects of alkylating agents on the multiple muscarinic receptor subtypes linked to activation of phospholipase C by carbachol in rat brain cortical membranes. *J Pharmacol Exp Ther* **264**:521-529.

Sano M, Ernesto C, Thomas R, Klauber M, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman C, Pfeiffer E, Schneider L, and Thal L (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment of Alzheimer's disease. The Alzheimer's disease cooperative study. *N Engl J Med* **336**:1216-1222.

Scatchard G (1949) The attractions of proteins for small molecules. *Ann N Y Acad Sci* **51**:660-672.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu-Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, and Seubert P (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**:173-177.

Schneider L, Farlow M, Henderson V, and Pogoda J (1996) Effects of estrogen replacement therapy on response to tacrine in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* **46**:1580-1584.

Scholfield C (1978) Electrical properties of neurones in the olfactory cortex slice *in vitro*. *J Physiol* **275**:535-546.

Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor S, Friedmann T, and Taylor P (1986) Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* **319**:407-409.

Scorer C (2001) Preclinical and clinical challenges in the development of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Drug Discov Today* **6**:1207-1219.

Segel I (1975) *Enzyme kinetics: behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. John Wiley and Sons, New York.

Selkoe D (1994) Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**:438-447.

Seo J, Kim S, Kim H, Park C, Jeong S, Lee J, Choi S, Chang K, Rah J, Koo J, Kim E, and Suh Y (2001) Effects of nicotine on APP secretion and A β - or CT(105)-induced toxicity. *Biol Psychiatry* **49**:240-247.

Sershen H, Toth E, Lajtha A, and Vizi E (1995) Nicotine effects on presynaptic receptor interactions. *Ann N Y Acad Sci* **757**:238-244.

Siek G, Katz L, Fishman E, Korosi T, and Marquis J (1990) Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. *Biol Psychiatry* **27**:573-580.

Sisodia S, Annaert W, Kim S, and DeStrooper B (2001) γ -secretase: never more enigmatic. *Trends Neurosci* **24**:S2-S6.

Slack B, Breu J, Muchnicki L, and Wurtman R (1997) Rapid stimulation of amyloid precursor protein release by epidermal growth factor: role of protein kinase C. *Biochem J* **327**:245-249.

Snape M, Misra A, Murray T, De Souza R, Williams J, Cross A, and Green A (1999) A comparative study in rat of the in vitro and in vivo pharmacology of the acetylcholinesterase inhibitors tacrine, donepezil and NXX-066. *Neuropharmacology* **38**:181-193.

Steinberg G, Mednic M, Maddox J, and Rice R (1975) A hydrophobic binding site in acetylcholinesterase. *J Med Chem* **18**:1057-1061.

Sugimoto H, Himura Y, Yamashi Y, and Yamatsu K (1992) Synthesis and antiacetylcholinesterase activity of 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-indanon-2-yl)methyl]piperidine (E2020) and related compounds. *Bioorg Med Chem Lett* **2**:871-876.

Sussman J, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, and Silman I (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**:872-879.

Svensson A and Nordberg A (1996) Tacrine interacts with an allosteric activator site on $\alpha 4\beta 2$ nAChRs in M10 cells. *Neuroreport* **7**:2201-2205.

Svensson A and Nordberg A (1998) Tacrine and donepezil attenuate the neurotoxic effect of AB(25-35) in rat PC12 cells. *Neuroreport* **9**:1519-1522.

Svensson A and Nordberg A (1999) β -estradiol attenuate amyloid- β -peptide toxicity via nicotinic receptors. *Neuroreport* **10**:3485-3489.

Tang X, De Sarno P, Sugaya K, and Giacobini E (1989) Effect of huperzine A, a new cholinesterase inhibitor, on the central cholinergic system of the rat. *J Neurosci Res* **24**:276-285.

Tang X and Han Y (1999) Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from Chinese herb. *CNS Drug Rev* **5**:281-300.

Taylor P, Luo Z, and Camp S (2000) The genes encoding the cholinesterases: structure, evolutionary relationships and regulation of their expression, in *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors* (Giacobini E ed) pp 63-80, Martin Dunitz Ltd, London.

Thomsen T and Kewitz H (1990) Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine in vitro and in vivo. *Life Sci* **46**:1553-1558.

Tomlinson B, Blessed G, and Roth M (1968) Observations on the brains of non-demented old people. *J Neurol Sci* **7**:331-356.

Ved H, Koenig M, Dave J, and Doctor B (1997) Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate. *Neuroreport* **8**:963-967.

Vivas N, Màrmol F, Sallés J, Badia A, and Dierssen M (1995) Action on noradrenergic transmission of an anticholinesterase: 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine. *Neuropharmacology* **34**:367-375.

Wagstaff A and McTavish D (1994) Tacrine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* **4**:510-540.

Wang H, Lee D, D'Andrea M, Peterson P, Shank R, and Reitz A (2000) Beta-amyloid (1-42) binds to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* **275**:5626-5632.

Warpman U and Nordberg A (1995) Epibatidine and ABT-418 reveal selective losses of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors in Alzheimer brains. *Neuroreport* **6**:2419-2423.

Warpman U, Zhang X, and Nordberg A (1996) Effect of tacrine on in vivo release of dopamine and its metabolites in the striatum of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* **277**:917-922.

Weggen S, Eriksen J, Das P, Sagi S, Wang R, Pietrzik C, Findlay K, Smith T, Murphy M, Bulter T, Kang D, Marquez-Sterling N, Golde T, and Koo E (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **414**:212-216.

Whitehouse P, Price D, Clark A, Coyle J, and DeLong M (1981) Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol* **10**:122-126.

Whitehouse P, Price D, Struble R, Clark A, Coyle J, and DeLong M (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **215**:1237-1239.

Wisniewski T, Dowjat W, Buxbaum J, Khorkova O, Efthimiopoulos S, Kulczycki J, Lojkowska W, Wegiel J, Wisniewski H, and Frangione B (1998) A novel Polish presenilin 1 mutation (P117L) is associated with familial Alzheimer's disease and leads to death as early as the age of 28 years. *Neuroreport* **9**:217-221.

Wolf B, Wertkin A, Jolly Y, Yasuda R, Wolfe B, Konrad R, Manning D, Ravi S, Williamson J, and Lee V (1995) Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid beta-protein production in human neuronal NT2N cells. *J Biol Chem* **270**:4916-4922.

Wonnacott S (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* **20**:92-98.

Wu C and Yang J (1989) Tacrine protection of acetylcholinesterase from inactivation by diisopropylfluorophosphate: a circular dichroism study. *Mol Pharmacol* **35**:85-92.

Xie W, Stribley J, Chatonnet A, Wilder P, Rizzino A, McComb R, Taylor P, Hinrichs S, and Lockridge O (2001) Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* **293**:896-902.

Xu H, Gouras G, Greenfield J, Vincent B, Naslund J, Mazzealli L, Fried G, Jovanovic J, Seeger M, Relkin N, Liao F, Checler F, Buxbaum J, Chait B, Thinakaran G, Sisodia S, Wang R, Greengard P, and Gandy S (1998) Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer β -amyloid peptides. *Nat Med* **4**:447-451.

Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, and Grady D (1998) Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA* **279**:688-695.

Yamamoto T and Hirano A (1985) Nucleus raphe dorsalis in Alzheimer's disease: neurofibrillary tangles and loss of large neurons. *Ann Neurol* **17**:573-577.

Yamashita H and Nakamura S (1996) Nicotine rescues PC12 cells from death induced by nerve growth factor deprivation. *Neurosci Lett* **213**:145-147.

Yankner B, Duffy L, and Kirschner D (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* **250**:279-282.

Zhu X-D, Cuadra G, Brufani M, Maggi T, Pagella P, Williams E, and Giacobini E (1996) Effects of MF-268, a new cholinesterase inhibitor, on acetylcholine and biogenic amines in rat cortex. *J Neurosci Res* **43**:120-126.

Zhu X-D and Giacobini E (1995) Second generation cholinesterase inhibitors: effect of (L)-Huperzine-A on cortical biogenic amines. *J Neurosci Res* **41**:828-835.

Anexo



Characterisation of the anticholinesterase activity of two new tacrine–huperzine A hybrids

Maria del Mar Alcalá^a, Nuria María Vivas^a, Susana Hospital^a, Pelayo Camps^{a,b},
Diego Muñoz-Torrero^{a,b}, Albert Badia^{a,*}

^a Dpt. de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

^b Laboratori de Química Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

Received 21 August 2002; received in revised form 24 January 2003; accepted 27 January 2003

Abstract

The effects of two tacrine–huperzine A hybrids, (±)-huprine Y and (±)-huprine Z, have been evaluated. Bovine and human acetylcholinesterase (AChE) and human butyrylcholinesterase (BChE) inhibition were assayed by Ellman's method. The two huprines were more active than both tacrine and (–)-huperzine A as inhibitors of both human and bovine AChE, and they acted as mixed-type AChE inhibitors. Moreover, (±)-huprine Y exhibited a *tight binding* character seen in the experiments of reversibility of bovine AChE inhibitory activity. In addition, both compounds were more active toward AChE than toward BChE. Also, the selectivity for the human AChE was greater than for the bovine enzyme. In *ex vivo* studies performed in mice, both drugs showed a clear inhibitory activity of brain AChE, 20 min after *i.p.* injection, (±)-huprine Y being more potent than (±)-huprine Z [ID₅₀ 1.09 (0.39–2.98) vs. 5.77 (3.29–10.30) μmol/kg]. The time-course study of the inhibitory effect displayed a *t*_{1/2} of 1 h for the two compounds. These results show that these drugs are two potent, central AChE inhibitors of potential interest in the treatment of AD. © 2003 Published by Elsevier Science Ltd.

Keywords: Alzheimer's disease; AChE inhibitor; Huperzine A; Tacrine; (±)-Huprine Z; (±)-Huprine Y

1. Introduction

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder associated with a selective loss of cholinergic neurons in the brain (Davies and Maloney, 1976) and characterised by cognitive and memory deficiencies. The losses are accompanied by decreases in the acetylcholine neurotransmitter as well as in the respective enzymes which synthesise and degrade acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase (AChE) (Perry et al., 1977; Bowen et al., 1982). Accordingly, enhancement of the central cholinergic neurotransmission has been seen as one of the most promising strategies for treatment of Alzheimer's disease, mainly by means of reversible AChE inhibitors. The first AChE inhibitor

approved by the US Food and Drug Administration was tacrine (Fig. 1). However, its severe side-effects represent an important drawback. Thus, new centrally-acting reversible AChE inhibitors, such as donepezil (Sugimoto et al., 1995) and rivastigmine (Enz et al., 1993), have recently been approved. In addition, huperzine A (Fig. 1), a novel *Lycopodium* alkaloid isolated from the Chinese herb, *Huperzia serrata*, is a reversible, potent and selective AChE inhibitor used in traditional herbal medicine which induces significant improvement in the memory of aged subjects and patients with Alzheimer's disease without any noticeable side effects (Tang and Han, 1999).

Recently, we have reported the synthesis, preliminary *in vitro* pharmacology, and molecular modelling of a series of tacrine–huperzine A hybrids (huprines) of General Structure 1 (Fig. 1) as AChE inhibitors (Camps et al., 1999, 2000b). These compounds combine the carbobicyclic substructure of (–)-huperzine A with the 4-aminquinoline substructure of tacrine. Several of these com-

* Corresponding author. Tel.: +34-3-581-19-52; fax: +34-3-581-29-86.

E-mail address: albert.badia@uab.es (A. Badia).

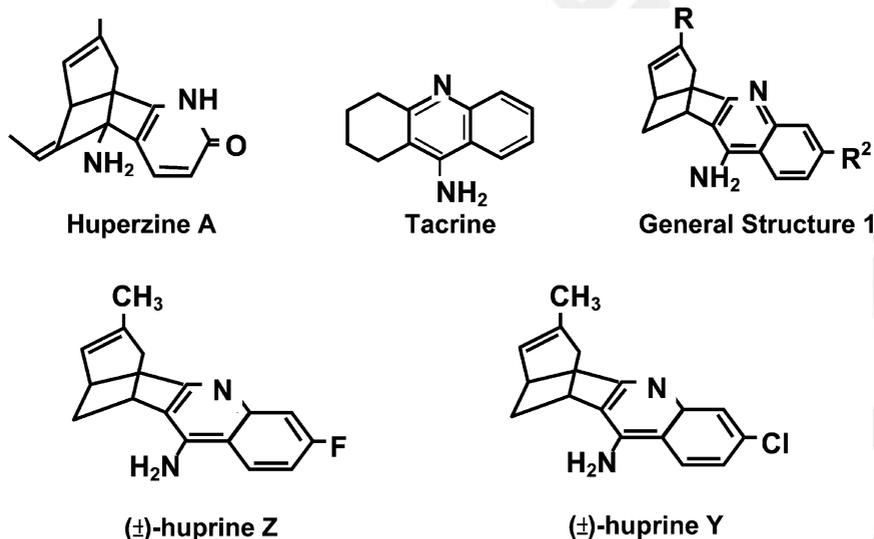


Fig. 1. Structure of huperzine A, tacrine, General Structure 1, (±)-huprine Z and (±)-huprine Y.

pounds exhibited higher AChE inhibitory activity than both tacrine and (–)-huperzine A. Among the several synthesised compounds, the biochemical properties of (–)-huprine X, which binds to AChE with one of the highest affinities yet reported (Camps et al., 2000a), have been described. Now, two new huprines have been selected, with a methyl group at Position 9, and with the only variation of halogen at Position 3, with (±)-huprine Y linking with chlorine and (±)-huprine Z with fluorine (Fig. 1), as two of the most interesting derivatives. In the present study, the following aspects have been considered: the inhibitory effects on both bovine and human AChE and human BChE, the type of inhibition, the time-dependence and the reversibility of the process and brain ex vivo AChE inhibitory activity.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and chemicals

Tacrine, DTNB, acetylthiocholine, butyrylthiocholine, tetraisopropyl pyrophosphoramidate (iso-OMPA), 1,5-bis-(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide (BW284c51) and the enzymes were purchased from Sigma, and eserine was bought from Fluka. (–)-Huperzine A, (±)-huprine Y and (±)-huprine Z were a generous donation by Dr. P. Camps from the Laboratori de Química Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.

2.2. Cholinesterase inhibitory activity

AChE inhibitory activity was evaluated spectrophotometrically at 25 °C by the method of Ellman (Ellman et al., 1961) using AChE from both bovine and human

erythrocytes and acetylthiocholine iodide (0.53 mM) as substrate; this concentration was near the K_m previously calculated for the enzyme. The reaction took place in a final volume of 3 mL of 0.1 M phosphate-buffered solution, pH 8.0, containing 0.025 units of AChE and 333 μ M 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB), a solution used to produce the yellow anion of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. Inhibition curves were performed in triplicate by incubating with at least 12 concentrations of inhibitor for 15 min. One triplicate sample without inhibitor was always present to yield 100% of AChE activity. The reaction was stopped by the addition of 100 μ L 1 mM eserine, and the colour production was measured at 412 nm. BChE inhibitory-activity determinations were carried out similarly, using 0.035 units of human serum BChE and 0.56 mM butyrylthiocholine, which was approximately the K_m calculated for the enzyme, in a final volume of 1 mL.

Cross reactivity for the two envisaged enzymes (AChE and BChE) was tested to demonstrate that their activity was specifically attributed. A homogenate of the enzyme, substrate and DTNB in the concentrations described above was preincubated for 5 min at 37 °C with four different concentrations (0.1–100 μ M) of either iso-OMPA (selective inhibitor of BChE) or BW284c51 (selective inhibitor of AChE). One triplicate sample without inhibitor represented 100% of enzyme activity.

Data from concentration–inhibition experiments of AChE inhibitors were calculated by non-linear regression analysis, using the GraphPad Prism programme package (GraphPad Software; San Diego, USA), which gave estimates of the IC_{50} (concentration of drug producing 50% of enzyme-activity inhibition).

2.3. Time-dependence and reversibility of bovine AChE inhibitory activity

Time-dependence of the inhibitory processes was determined for the compounds with at least 10 increasing concentrations of inhibitor, after an incubation period of 30 min. After this time, the anticholinesterase activity was assayed by the method of Ellman. In this set of experiments, the appearance of the product was monitored at 412 nm in a Perkin–Elmer Lambda-2 spectrophotometer equipped with an automatic six-cell changer, in the absence and presence of the different inhibitor concentrations. The final incubation volume was 1 mL. The changes in absorbance per minute, the slope, were calculated.

The reversibility of the inhibition process was assayed by dialysis (Visking dialysis tubing, exclusion limit 8000–15000 Da; Serva Feinbiochemica GmbH & Co.). The enzyme (0.6 units) was incubated with 25 nM of (\pm)-huprine Y in a total volume of 6 mL phosphate buffer. After 30 min incubation at 25 °C, the reaction was stopped by chilling it in an ice-bath, and the remaining activity was measured in 250 μ L of the enzyme–inhibitor mixture with 100 μ M acetylthiocholine as substrate. The samples were then dialysed against 1000 vol buffer at 4 °C for 18 h, and the remaining activity inside the dialysis tubing was again measured. The same protocol was also performed at 37 °C for 18 h. Controls were taken throughout the same procedure in the absence of inhibitors.

2.4. Determination of type of AChE inhibition

To assess the type of enzyme inhibition of the huprines, kinetic studies were performed in the following manner: substrate hydrolysis rates were measured at 25 °C for 1–3 min, using six concentrations of substrate (50, 75, 100, 150, 250 and 500 μ M) in the presence or absence of three concentrations of inhibitor (0.1, 0.3 and 1 nM (\pm)-huprine Y and 3, 10 and 30 nM (\pm)-huprine Z) against bovine AChE. (\pm)-Huprine Y was preincubated for 45 min with AChE in order to attain the steady-state inhibition of enzyme-catalysed substrate hydrolysis. In both cases, data were plotted by the method of Lineweaver–Burk to reveal the mechanism of inhibition. Replots of the slopes versus the inhibitor concentrations gave estimates of K_i , the dissociation constant for inhibitor-binding to AChE (Segel, 1975).

2.5. Ex vivo AChE inhibitory activity

Groups of six OF1 mice were treated i.p. with different doses of (\pm)-huprine Y and (\pm)-huprine Z, (–)-huperzine A and tacrine. The animals were sacrificed 20 min later and the brains quickly removed and frozen on dry ice. Residual AChE activity was determined as pre-

viously described by the method of Ellman using brain homogenate preparations, excluding the cerebellum, as a source of the enzyme. Due to the necessary dilution of the tissue sample, the ex vivo technique may cause dissociation of a reversible enzyme–inhibitor complex. In order to limit this, only a final dilution factor of 20-fold was used. Percentages of inhibitions were calculated by comparing AChE activity in the brains of drug-treated mice with activity from untreated controls. ID₅₀ (dose of the drug producing 50% of enzyme-activity inhibition) of anticholinesterase activity was determined by non-linear regression analysis using GraphPad Prism software (San Diego, USA).

The duration of action was evaluated in another set of experiments. Groups of OF1 mice were treated i.p. with, approximately, the ID₅₀ of (\pm)-huprine Y and (\pm)-huprine Z and the animals were sacrificed at several stages post-dose administration. The phase of the anticholinesterase effect decay was analysed by means of a monoexponential model, and two parameters were determined: k (extinction constant of anticholinesterasic drug effect) and $t_{1/2}$ (half-time of drug effect extinction). The two values were also calculated by means of GraphPad Prism software using non-linear regression analysis.

All protocols described above were approved by the Animals Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona and comply with the current laws of Spain, which are in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). All efforts were made to minimise animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.6. Statistical analysis

All results are expressed as the mean \pm S.E. mean. Statistical significance of the observed differences was assessed by two-tailed Student's t test. $P < 0.05$ was the threshold for statistical significance.

3. Results

3.1. Cholinesterase inhibitory activity

Some experiments were performed to determine the cross reactivity of AChE and BChE used in our study. Thus, the specific BChE inhibitor, iso-OMPA, did not inhibit AChE at all, but rather inhibited BChE with an IC₅₀ of $8.00 \pm 0.10 \mu$ M ($n = 3$). On the other hand, the AChE inhibitor BW284c51 inhibited both enzymes, but with a lower activity over BChE (IC₅₀: $1.00 \pm 0.12 \mu$ M for AChE and $22.00 \pm 1.15 \mu$ M for BChE; $n = 3$).

The data comparing bovine and human AChE and human BChE inhibition as well as the ratio between the AChE and BChE inhibitory activity for the (\pm)-huprines

Table 1

In vitro inhibitory effects of (±)-huprine Y, (±)-huprine Z, (–)-huperzine A and tacrine on AChE and BChE activity

Drugs	IC ₅₀ (nM)		Ratio bovine/human AChE ^a		Ratio human BChE/human AChE ^b			
	Bovine AChE	n	Human AChE	n	Human BChE	n		
(±)-huprine Y	6.98 ± 0.42	8	0.78 ± 0.02	6	290.20 ± 49.66	8	8.95	372.05
(±)-huprine Z	5.09 ± 1.05	8	4.58 ± 0.19	6	477.10 ± 30.00	8	1.11	104.17
(–)-huperzine A	74.05 ± 5.50	6	260.03 ± 18.10	6	>10000	6	0.28	>38.45
Tacrine	130.00 ± 10.10	6	205.08 ± 18.00	6	43.90 ± 17.00	6	0.63	0.21

Data are the mean ± SEM of number of experiments indicated, each one in triplicate.

^a IC₅₀ bovine AChE/IC₅₀ human AChE.

^b IC₅₀ human BChE/IC₅₀ human AChE.

Y and Z and tacrine and (–)-huperzine A, as reference compounds, can be seen in Table 1. The two huprines were more active than both tacrine and (–)-huperzine A as AChE inhibitors, but they showed an intermediate BChE inhibitory activity. In addition, these huprines showed greater selectivity for human AChE than for bovine AChE.

3.2. Time-dependence and reversibility of bovine AChE inhibitory activity

(±)-Huprine Y showed a lower IC₅₀ value after incubation of the enzyme for 30 min than when the activity was measured without previous incubation (Table 2). In contrast, (±) huprine-Z did not show this time-dependence of the inhibitory process. Thus, only the reversibility of the inhibitory process by (±)-huprine Y was studied. As can be seen in Fig. 2, activity was not fully recovered after dialysis overnight at 4 °C. However, when the enzyme–inhibitor complex was dialysed at 37 °C for 18 h, a complete recovery of the activity resulted, indicating that a reversible *tight-binding* inhibitory process could be involved.

Table 2
AChE inhibitory activity of (±)-huprine Y and (±)-huprine Z at two different incubation times

Drug	N	IC ₅₀ (nM)	
		0-min incubation	30-min incubation
(±)-huprine Y	4	2.45 ± 0.51	0.59 ± 0.10 ^a
(±)-huprine Z	4	7.41 ± 0.81	7.59 ± 1.22 ^b

IC₅₀ (concentration which inhibited 50% of AChE activity from bovine erythrocytes after 0- and 30-min incubation of the enzyme with the inhibitor).

^a $P < 0.05$ vs. 0-min incubation.

^b n.s. (Student's *t*-test).

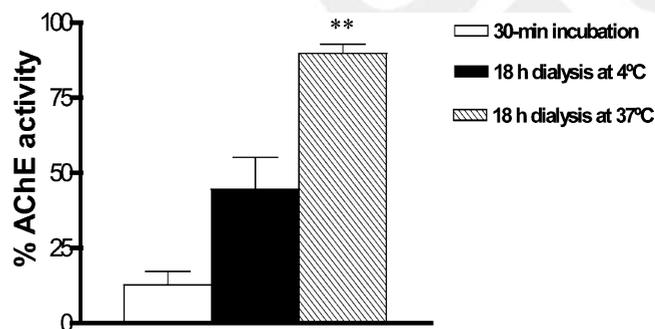


Fig. 2. Bovine AChE activity after 30-min incubation with 25 nM (±)-huprine Y (white column) and after dialysis for 18 h at 4 °C (black column) or at 37 °C (striped column). ** $P < 0.01$ for AChE activity of (±)-huprine Y after dialysis at 37 °C, compared with 30-min incubation without dialysis. Vertical bars are the standard error of the mean of three independent experiments, each one in triplicate.

3.3. Determination of type of AChE inhibition

Fig. 3(a,b) shows the Lineweaver–Burk representations of the inhibition of bovine AChE by (±)-huprine Y and (±)-huprine Z. The plots of these representative experiments indicate a pattern of inhibition of the mixed-type for both drugs, as they increased the slope and y-intercept of the double reciprocal plot. Replots represented in Fig. 3(c,d) allowed for the calculation of an estimate of K_i ((±)-huprine Y 0.42 ± 0.10 nM and (±)-huprine Z 11.40 ± 0.34 nM; $n = 3$).

3.4. Ex vivo AChE inhibitory activity

In previous studies, the times for peak inhibition after i.p. administration were determined. The dose of 2.5 μmol/kg was administered and the maximal inhibition of AChE appeared approximately 20 min post-administration of the huprines (results not shown). Thus, this time was selected to determine the ID₅₀ for the several compounds. The results obtained under the chosen conditions appear for each compound in Table 3. It can be

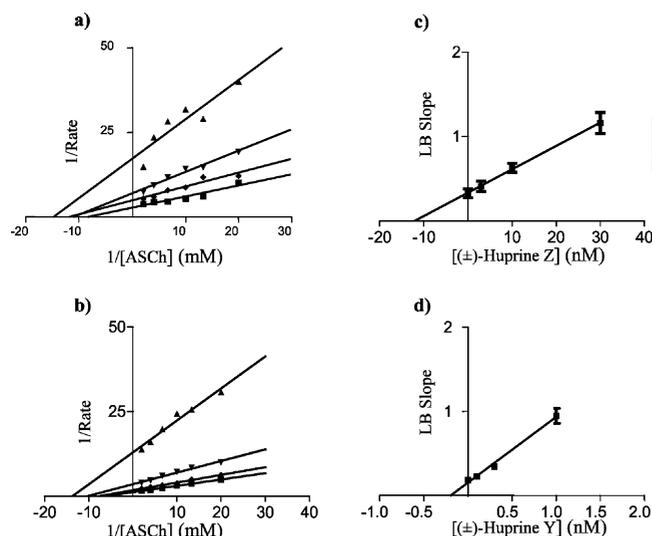


Fig. 3. Representative steady-state inhibition of AChE hydrolysis of ASCh. (a) and (b) are the Lineweaver–Burk (LB) plots of rates of ASCh hydrolysis and substrate concentrations. (±)-Huprine Z concentrations in (a) were 0 nM (■), 3 nM (◆), 10 nM (▼) and 30 nM (▲). (±)-Huprine Y concentrations in (b) were 0 nM (■), 0.1 nM (◆), 0.3 nM (▼) and 1 nM (▲). (c) and (d) are the slopes in (a) and (b) replotted against the inhibitor concentration. K_i values were calculated as the x -intercept of the plots represented in graphs (c) and (d).

Table 3

Ex vivo inhibitory effects of (±)-huprine Y and (±)-huprine Z on mouse-brain AChE

Drug	ID ₅₀ (μmol/kg)	CI95%	<i>n</i>
(±)-huprine Y	1.09	(0.39, 2.98)	6
(±)-huprine Z	5.77	(3.24, 10.30)	6

Data are the mean ± SEM of experiments indicated, each one in triplicate. CI95% is the confidence interval for ID₅₀ with $P < 0.05$.

observed that (±)-huprine Y was the most active derivative. (±)-Huprine Y and (±)-huprine Z at doses as high as 30 and 40 μmol/kg, respectively, only showed slight increases of salivation and some tremors. At the maximal dose used of 10 μmol/kg, tacrine did not inhibit cerebral AChE, while (–)-huperzine A only inhibited it by approximately 30%; higher doses of these compounds caused the death of some of the animals, which precluded the determination of the ID₅₀.

When the time-course of the anticholinesterasic effect of huprines was studied, a dose close to the previous ID₅₀ determined was administered. The estimated values of k were $0.66 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2}$ was 1.048 h for (±)-huprine Y, and $0.67 \pm 0.10 \text{ h}^{-1}$ and 1.039 h for (±)-huprine Z, without significant differences between them (Fig. 4).

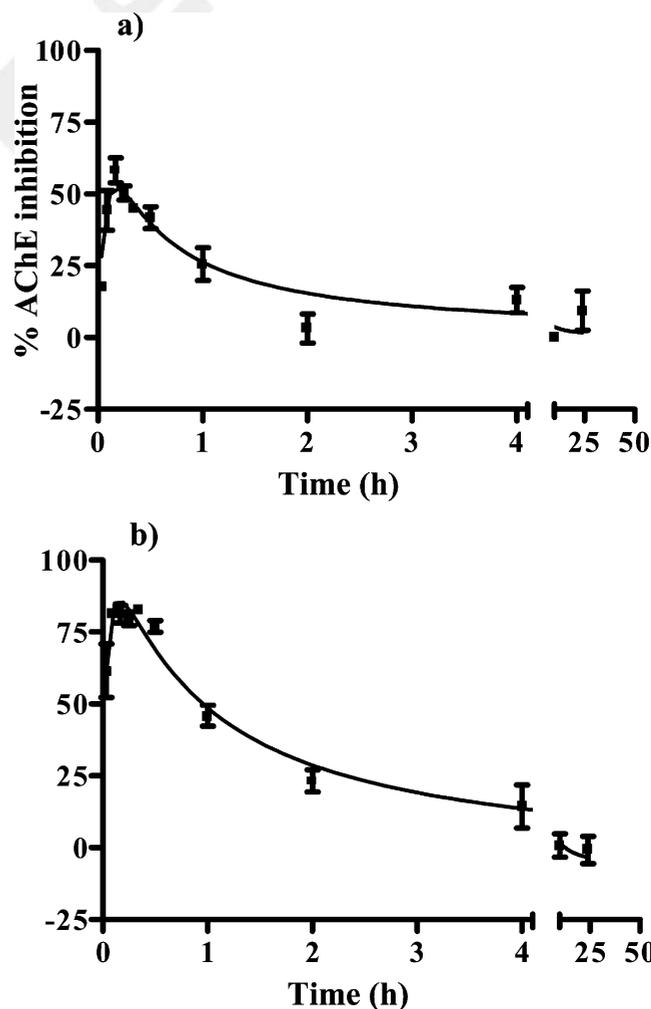


Fig. 4. Ex vivo time-course of the inhibitory effect of (±)-huprine Z (a) and (±)-huprine Y (b) on mouse-brain AChE. Vertical bars are the standard error of the mean ($n = 3$).

4. Discussion

Our results clearly demonstrate that (±)-huprine Y and (±)-huprine Z are more potent as AChE inhibitors than their parent compounds tacrine and (–)-huperzine A. In addition, the two huprines displayed good selectivity in the ratio of AChE to BChE activity. It has recently been established that BChE has an important function in the constitutive hydrolysis of acetylcholine, which could play a more extensive role in normal cholinergic transmission in central nervous system (CNS) (Greig et al., 2001; Mesulam et al., 2002). In contrast to (–)-huperzine A, the two huprines show an intermediate level of activity upon BChE. This dual inhibitory action on both AChE and BChE indicates potential therapeutic benefits of the two huprines in the treatment of Alzheimer's disease and related dementias as opposed to (–)-huperzine A.

An important differential characteristic between the two huprines is that the inhibitory activity of (±)-huprine

Y is both affected by incubation of the enzyme with the inhibitor before the addition of substrate and also seems to display a reversible *tight-binding* inhibitory process. It is possible that the replacement of F of (\pm)-huprine Z by Cl in (\pm)-huprine Y improves the binding to AChE; this effect probably arises from a better fit of the chlorine atom in the pocket formed by residues of several amino acids, leading to an increase in the non-electrostatic interaction relative to the fluorine compound, as has previously been demonstrated (Camps et al., 2000b).

Because the reciprocal plots for both huprines against bovine AChE show both increasing slopes and increasing intercepts with higher inhibitor concentrations, this indicates a pattern of inhibition that is often termed “mixed inhibition”. These results agree with those previously described for both parent compounds, tacrine and (–)-huperzine A (McKinney et al., 1991; Snape et al., 1999).

The *ex vivo* results provide a relative indication of central nervous system penetration and *in vivo* potencies of the huprines. (\pm)-Huprine Y was approximately five times more active than (\pm)-huprine Z, which could be explained by its *tight-binding* activity. On the other hand, both huprines were more potent than (–)-huperzine A and tacrine, and displayed minor secondary effects.

The $t_{1/2}$ of 1 h in the case of mice could be interpreted as a short length of time, however, some things should be considered in interpreting this result. First of all, the necessary dilution of the tissue in the *ex vivo* technique could lead to an increase in the rate of dissociation of the inhibitor–enzyme complex. Secondly, it is well known that the metabolic rate is higher in small mammals (Alvares and Pratt, 1990) such as mouse; thus, it is expected that in human beings the $t_{1/2}$ will be longer.

It should be noted that k and $t_{1/2}$, constant and half-time of the extinction of the effects, respectively, of the two huprines show similar values in the time-course study. This contrasts with the *tight-binding* nature of the AChE inhibition of (\pm)-huprine Y in *in vitro* studies, which could presuppose a longer period of action than (\pm)-huprine Z. It is probable that aspects related to the *in vivo* metabolism of the drugs could explain the lack of the differences observed in the time-course. Thus, it is classically known that, from a metabolic point of view, the carbon–fluorine bond is more stable than the carbon–chlorine bond (Alvares and Pratt, 1990).

In conclusion, (\pm)-huprine Y and (\pm)-huprine Z are two very potent and mixed AChE inhibitors with a greater potency than the parent compounds tacrine and (–)-huperzine A, with good penetration in the central nervous system. Of the two compounds, (\pm)-huprine Y elicited a reversible *tight-binding* activity, which may account for its high potency in *ex vivo* studies. All together, these findings make both (\pm)-huprine Y and (\pm)-huprine Z interesting candidates for further studies

in connection with their possible use in the treatment of Alzheimer’s disease.

Acknowledgements

This study was partly supported by CICYT (Project SAF99-0088), the Comissionat per Universitat i Recerca of the Generalitat de Catalunya (Project 1999SGR-00119) and Fundació TV3 (Project 004/97). MM Alcalá has had a Fellowship from the Comissionat per Universitat i Recerca of the Generalitat de Catalunya and she now has a Severo Ochoa Fellowship from the Fundació Ferrer Investigació. The authors would like to thank Mr. Chuck Simmons, a native English-speaking university instructor of English, for the revision and correction of the English of this article.

References

- Alvares, A.P., Pratt, W.B., 1990. Pathways of drug metabolism. In: Pratt, W.B., Taylor, P. (Eds.), Principles of Drug Action. The Basis of Pharmacology. Churchill Livingstone, New York, pp. 365–422.
- Bowen, D.M., Benton, J.S., Spillane, J.A., Smith, C.C., Allen, S.J., 1982. Choline acetyltransferase activity and histopathology of frontal neocortex from biopsies of demented patients. *J. Neurol. Sci.* 57, 191–202.
- Camps, P., El Achab, R., Görbig, D.M., Morral, J., Muñoz-Torrero, D., Badia, A., Baños, J.E., Vivas, N.M., Barril, X., Orozco, M., Luque, F.J., 1999. Synthesis, *in vitro* pharmacology, and molecular modeling of very potent tacrine–huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer’s disease. *J. Med. Chem.* 42, 3227–3242.
- Camps, P., Cusack, B., Mallender, W.D., El Achab, R., Morral, J., Muñoz-Torrero, D., Rosenberry, T.L., 2000a. Huprine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for the treatment of Alzheimer’s disease. *Mol. Pharmacol.* 57, 409–417.
- Camps, P., El Achab, R., Morral, J., Muñoz-Torrero, D., Badia, A., Baños, J.E., Vivas, N.M., Barril, X., Orozco, M., Luque, F.J., 2000b. New tacrine–huperzine A hybrids (huprines): highly potent *tight-binding* acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer’s disease. *J. Med. Chem.* 43, 4657–4666.
- Davies, P., Maloney, A.J.F., 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer’s disease. *Lancet* 2, 1403.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, B., Featherstone, R.M. Jr., 1961. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Enz, A., Amstutz, R., Boddeke, H., Gmelin, G., Malanowski, J., 1993. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer’s disease. *Prog. Brain Res.* 98, 431–438.
- Greig, N.H., Utsuki, T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H.W., Perry, T., Lee, B., Ingram, D.K., Lahiri, D.K., 2001. A new therapeutic target in Alzheimer’s disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* 17, 159–165.
- McKinney, M., Miller, J.H., Yamada, F., Tuckmantel, W., Kozikowski, A.P., 1991. Potencies and stereoselectivities of enantiomers of huperzine A for inhibition of rat cortical AChE. *Eur. J. Pharmacol.* 203, 303–305.
- Mesulam, M., Guillozet, A., Shaw, P., Quinn, B., 2002. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol. Dis.* 9, 88–93.

- Perry, E.K., Perry, T.H., Blessed, G., Tomlinson, B.E., 1977. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* 1, 189.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley and Sons, New York (pp. 107–111, 132–134).
- Snape, M.F., Misra, A., Murray, T.K., De Souza, R.J., Williams, J.L., Cross, A.J., Green, A.R., 1999. A comparative study in rats of the in vitro and in vivo pharmacology of the acetylcholinesterase inhibitors tacrine, donepezil and NXX-066. *Neuropharmacology* 38, 181–193.
- Sugimoto, H., Iimura, Y., Yamanishi, Y., Yamatsu, K., 1995. Synthesis and structure–activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl] piperidine hydrochloride and related compounds. *J. Med. Chem.* 38, 4821–4829.
- Tang, X.C., Han, Y.F., 1999. Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from Chinese herb. *C.N.S. Drug Rev.* 5, 281–300.