



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: ESTRUCTURAS QUELANTES
COMO AGENTES TERAPÉUTICOS FRENTE A
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Autor: SONIA ALLAY BAKHTAOUI

Fecha: Junio 2019

Tutor: Prof. JUAN FRANCISCO GONZÁLEZ MATILLA

CONTENIDO

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Hipótesis colinérgica	4
1.2. Hipótesis β-amiloide	5
1.3. Hipótesis de la homeostasis de los metales	6
2. OBJETIVO	7
3. METODOLOGÍA	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1. Quelación	8
4.2. DP-109	10
4.3. XH1	10
4.4. Clioquinol y derivados	12
4.5. Otros compuestos	16
4.5.1. Derivados de β -aminopiridina.....	16
4.5.2. Fenol-amino derivados	17
5. CONCLUSIONES	18
BIBLIOGRAFÍA	18

RESUMEN

En las últimas décadas el número de personas afectadas de Alzheimer ha aumentado de manera considerable, lo que ha motivado, tanto a las empresas farmacéuticas como a diversos grupos de investigación, la búsqueda de una cura eficaz de este tipo de demencia. Una de las nuevas formas de tratamiento se basa en la hipótesis de la homeostasis de los metales, que afirma que la acumulación de las placas amiloides, posibles causantes del Alzheimer, pueda ser debida a un aumento de biometales en el cerebro por un fallo en la homeostasis de los mismos. Por ello, con la estructura de estos nuevos fármacos se busca eliminar dichos metales mediante un proceso de quelación, atrapándolos y eliminándolos del cerebro, consiguiendo deshacer las placas. Estas nuevas moléculas tienen en común la presencia de heteroátomos con un par libre de electrones que funcionan como dadores en el enlace quelante, permitiendo establecer el enlace con los iones metálicos para poder quitarlos del cerebro.

1. INTRODUCCIÓN

Las demencias son un grupo de enfermedades que afectan a la vida diaria de las personas que las padecen, impidiéndolas realizar su día a día con normalidad. La demencia en sí está definida por la OMS como “síndrome que implica el deterioro de la memoria, el intelecto, el comportamiento y la capacidad para realizar actividades de la vida diaria”¹. Dentro de las demencias, el Alzheimer es la más común, siendo entre un 60 y un 70% de los enfermos con demencia los afectados por el mismo.

A día de hoy, hay más de 46 millones de personas con demencia, y se detecta un nuevo caso cada 3 segundos. Además, se pronostica que para el año 2050, si no se ha encontrado una cura efectiva, el número de casos se puede triplicar² (Fig. 1). De hecho, sólo en EEUU se considera que puede llegar a 16 millones las personas de 65 años o más afectadas por Alzheimer debido, sobre todo, al aumento de la esperanza de vida gracias a los avances médicos³.

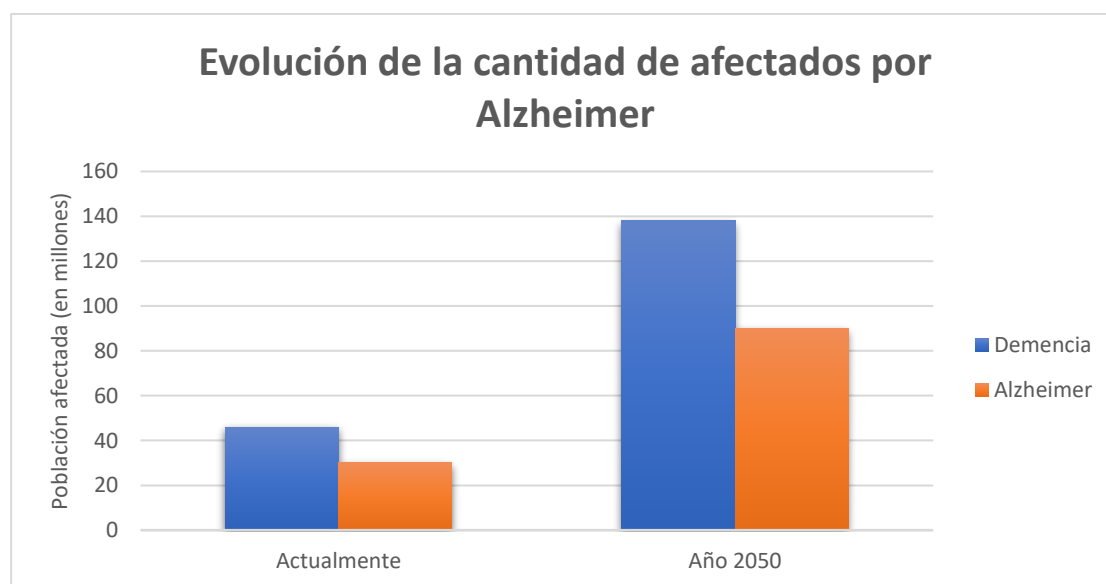


Fig. 1.

Todos estos datos resaltan la magnitud de un problema aún sin solución, lo que hace necesaria la búsqueda de una cura que mejore, no solo las estadísticas, sino también la calidad

de vida de estas personas. Es importante ver que el interés de esta cura no está sólo por los propios pacientes, sino también por los familiares cercanos, ya que más de la mitad de las personas tienen algún contacto con el Alzheimer². Esto es debido a que los pacientes, por las características de la propia enfermedad, acaban siendo dependientes, requiriendo un cuidado y una atención constantes, agravando el problema social.

El síntoma más característico de esta enfermedad es la pérdida de memoria de manera progresiva, degradando la vida de los pacientes. En numerosas ocasiones, esta pérdida de memoria se acompaña de cambios en el comportamiento y la personalidad, agitación o disartria, que hacen muy difícil la capacidad de interacción del enfermo con el entorno⁴.

Sin embargo, se sigue sin saber la causa de esta enfermedad, aunque se conoce cada vez mejor la cascada biológica que lleva a la muerte progresiva de las neuronas, signo indiscutible que da lugar a toda la sintomatología del Alzheimer⁵. Además, tampoco se conocen los factores de riesgo, aunque se considera que la genética juega un papel muy importante. De hecho, las personas que tienen familiares de primer grado con esta enfermedad tienen más riesgo de padecerla⁶.

Existen varias hipótesis para combatir la enfermedad de Alzheimer, destacando por su aceptación entre los investigadores: la colinérgica, la β -amiloide y la relacionada con la homeostasis de los metales.

1.1. Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica considera que la causa del Alzheimer se debe a un descenso en los niveles de acetilcolina (ACh) debido a una disminución de la enzima acetilcolintransferasa (AChT). Esta enzima sintetiza el neurotransmisor en el citoplasma de las neuronas a partir de acetil-CoA y colina⁷. Esta hipótesis ha sido prioritaria durante las dos últimas décadas del siglo XX.

La acetilcolina es utilizada tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, a través de los receptores colinérgicos, que pueden ser de dos tipos: nicotínicos y muscarínicos. Dentro del SNC participa en funciones tan importantes como la memoria, el paso del sueño a la vigilia, el aprendizaje, la atención, respuesta al estrés o la información sensorial⁸. Es por ello que las alteraciones en el sistema colinérgico tienen un impacto directo en numerosas enfermedades y alteraciones cognitivas, entre ellas, las demencias como el Alzheimer.

Cuando la ACh ya ha realizado su función, es hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en la sinapsis. Esta enzima presenta un residuo serina por el que da lugar a la hidrólisis. El proceso de hidrólisis es el siguiente (Fig. 2):

1. Ataque nucleófilo al grupo carbonilo de la ACh
2. Acilación de la AChE
3. Se libera colina, que es captada por la neurona para volver a formar ACh, a través de la enzima AChT
4. Hidrolisis del intermediario acetil-enzima para la regeneración de la AChE
5. Liberación de acetato⁹

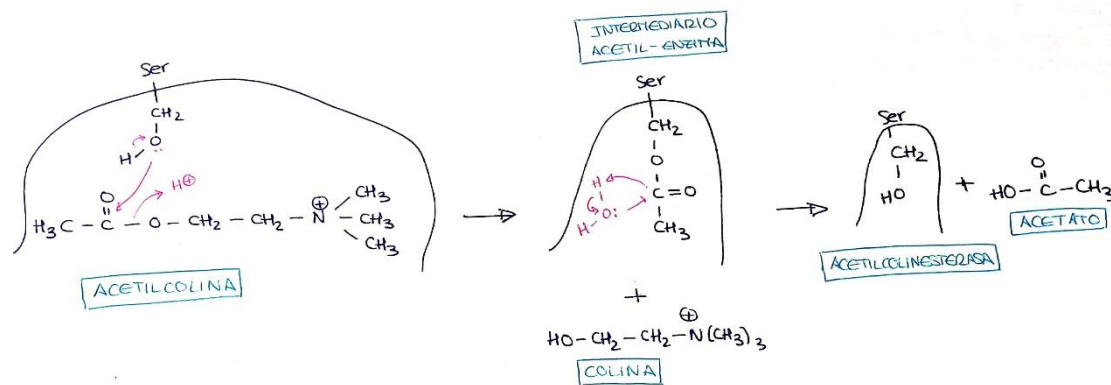


Fig. 2. Proceso de hidrólisis de la ACh mediado por la AChE

Con respecto a la memoria, hay que tener en cuenta la participación del núcleo basal de Meynert. Este núcleo se encuentra en los ganglios basales del cerebro, más específicamente, en la porción ventral de los mismos, y emplea acetilcolina como neurotransmisor¹⁰.

La importancia del núcleo de Meynert en el Alzheimer es muy grande, dado que se observa una degeneración en las neuronas que forman este núcleo en los pacientes con esta enfermedad, dando lugar a la tan característica pérdida de memoria¹¹. Sin embargo, no hay un consenso sobre cuál es el porcentaje de afectación del núcleo, ni tampoco la parte más afectada del mismo. Algunos estudios determinan que hay una afectación neuronal de hasta el 50% en la parte anterior del núcleo del Meynert, mientras que no hay una pérdida significativa del número de células neuronales en las partes intermedias y posterior¹². Sin embargo, en otro estudio afirman que en la parte anterior sólo están afectadas el 13% de las células neuronales, frente a un 41% en la parte intermedia y un 57% en la posterior¹³. Estas diferencias pueden deberse al uso de diferentes criterios para el conteo de células en cada uno de los estudios.

Por otro lado, la alteración del sistema colinérgico no sólo influye en la memoria, también se ha visto que algunos síntomas psiquiátricos que afectan a los pacientes con Alzheimer, como la agitación, pueden deberse a una disminución de los marcadores colinérgicos y serotoninérgicos, junto con un aumento de la proteína Tau, de la que se hablará más adelante¹⁴.

1.2. Hipótesis β -amiloide

Desde el punto de vista fisiopatológico, los pacientes con Alzheimer presentan nudos neurofibrilares y depósitos o placas de proteínas amiloides, intracelulares y extracelulares respectivamente, en ciertas regiones del cerebro. Las zonas más afectadas suelen ser el hipocampo, la amígdala, la corteza entorrinal y el prosencéfalo basal, implicados en la memoria, la orientación, el aprendizaje y el comportamiento emocional. Dentro de estas partes, se ha visto que las neuronas que usan acetilcolina y glutamato son las que más placas y nudos neurofibrilares tienen¹⁵.

Sin embargo, la hipótesis β -amiloide, por sí misma, no puede explicar la complejidad de esta enfermedad. A esto se suma que los depósitos o placas amiloides parecen ser de aparición tardía y no una causa misma de la enfermedad¹⁶. Además, no hay una relación directa entre el número de placas y el deterioro cognitivo que se da en el Alzheimer⁷.

A grandes rasgos, esta hipótesis afirma que hay un desequilibrio entre la producción y el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP), que es la enzima que sintetiza a los péptidos β -amiloides. El desequilibrio da lugar a un aumento de los péptidos, lo que da lugar a que se agreguen entre sí en conformaciones beta que son insolubles, dando lugar a las placas seniles. En sí la APP es sintetizada por la enzima α -secretasa y degradada por las enzimas β - y γ -secretasas¹⁷.

Los nudos neurofibrilares se forman a partir de agregados de la proteína Tau, dando lugar a acúmulos intracelulares fibrilares. La proteína Tau, en condiciones normales, se encuentra en las neuronas con el objetivo de formar los microtúbulos gracias a su interacción con la tubulina. Sin embargo, en los pacientes con Alzheimer se ha visto que dicha proteína se encuentra hiperfosforilada en sus residuos serina y treonina, además de haber sufrido modificaciones oxidativas, algo anormal y que acaba dando lugar a los nudos neurofibrilares.

Con respecto a los depósitos amiloides, se han detectado dos formas, la β -amiloide-40 y la β -amiloide-42, aunque es la segunda la más abundante en los enfermos con Alzheimer ya que tiene más tendencia a agregarse y formar las placas, mientras que la primera se encuentra mayoritariamente en los fluidos biológicos. Por otro lado, se ha visto que, dentro de las formas, los oligómeros son 10 veces más tóxicos que las fibrillas y los agregados de las mismas, y hasta 40 veces más que los monómeros¹⁸. Es más, estos oligómeros, que son solubles, se ven más difícilmente y pueden ser los iniciadores del Alzheimer. Por el contrario, las fibrillas son insolubles y son muy fáciles de detectar.

Este mismo estudio afirma que pueden ser los oligómeros β -amiloide-42 los que acaban dando lugar a los oligómeros Tau, que son neurotóxicos y cuya acumulación acaba desencadenando la sintomatología de la enfermedad¹⁸. Además, se ha visto que estos oligómeros son producidos por la acción conjunta de neuronas y los astrocitos asociados a ellas¹⁶.

Es importante tener en cuenta que los monómeros y los oligómeros β -amiloide-42 no son siempre perjudiciales. Las neuronas, en condiciones normales y debido a su actividad sináptica, los segregan, siendo beneficiosos si están a bajas concentraciones. Sin embargo, una acumulación de los monómeros a nivel intracelular hace que se agreguen y se liberen al exterior en forma de los oligómeros tóxicos. Esta agregación puede ser potenciada por la fosforilación llevada a cabo por la proteín-kinasa-A, lo que aumenta también la neurotoxicidad de los monómeros¹⁸.

1.3. Hipótesis de la homeostasis de los metales

El cerebro es un órgano que necesita iones metálicos para realizar una serie de procesos, ya sea porque participan en la sinapsis (como el Zn^{2+}) o forman parte de metaloproteínas como la enzima citocromo-C oxidasa (el Fe) o la superóxido dismutasa (el Cu o el Zn).

A grandes rasgos esta teoría se basa en que una acumulación de los iones metálicos en el cerebro, por una alteración en los mecanismos de homeostasis de las células o la absorción de ellos, puede acabar dando lugar al Alzheimer, ya que se ha visto que la concentración de iones metálicos es hasta 7 veces mayor en los pacientes con Alzheimer que en los sanos¹⁹. Se cree que hay dos procesos por los que acaban dando lugar a esta enfermedad: puede ser por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por los péptidos β -amiloides, y/o por la agregación de dichos péptidos. Ya desde finales de los años 90 se ha encontrado la presencia de los iones Cu^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} en las placas seniles debido a su unión a los péptidos β -amiloides²⁰. Los iones más importantes son el cobre, el zinc, el aluminio y el hierro.

Con respecto al cobre, se ha encontrado una concentración extracelular mayor en los pacientes con Alzheimer con respecto a los que no, y eso podría deberse a que está unido a los péptidos β -amiloides. Además, se cree que genera radicales hidroxilo muy tóxicos a través de la reacción de Fenton, que acaban dando lugar a muerte neuronal debido al estrés oxidativo²¹.²². Estos radicales puede que se formen a partir de la unión del cobre a los péptidos β -amiloides, que hace que se reduzca el Cu(II) a Cu(I) y produzca peróxido de hidrógeno, responsable de la formación de dichos radicales. Por otro lado, se cree que la formación de los nudos neurofibrilares puede estar potenciada por la interacción entre el cobre y la proteína Tau, pero no está muy clara esta asociación²³. Aunque se ha visto que la concentración de este ion extracelularmente está aumentada, la concentración intracelular disminuye en los pacientes con Alzheimer, lo que afecta a la actividad de ciertas enzimas que requieren este metal para su actividad, como la cobre/zinc superóxido y la citocromo-C oxidasa²⁴.

En el caso del zinc, se ha visto que en condiciones fisiológicas in vitro puede inducir la agregación de los péptidos β -amiloides en depósitos resistentes a la proteasa. Además, se ha visto que su concentración aumenta en las placas y en los espacios interneuronales en los pacientes con Alzheimer con respecto a los sanos, pero disminuye su concentración en el resto del cuerpo, por ejemplo, en la sangre y en el suero²⁵. Sin embargo, se cree que puede tener un papel protector, ya que la unión entre el zinc y los péptidos β -amiloides hace que estos últimos cambien su conformación, impidiendo que el cobre pueda unirse y se formen los radicales libres y el peróxido de hidrógeno, evitando el estrés oxidativo²⁶. Por otro lado, en condiciones reductoras sí se ha visto que potencia la hiperfosforilación del péptido Tau uniéndose a él²⁷. Sin embargo, hay diferencias con respecto a si la concentración del ion es baja o alta; si es baja, se produce una agregación en forma de fibrillas. Por el contrario, si es alta, se producen agregados granulares²⁸.

El hierro, por el contrario, no se ha demostrado que participe directamente en la agregación de los péptidos β -amiloides, aunque esto sí se da in vitro. La toxicidad de este metal viene sobre todo por el hecho de que potencia que los péptidos β -amiloides se agreguen de una manera menos ordenada a lo habitual, lo que es más perjudicial para el cerebro²⁹. Se ha demostrado que la concentración de hierro está aumentada hasta 3 veces en los espacios interneuronales en pacientes con Alzheimer. Sin embargo, a través de la reacción de Fenton, el hierro puede acabar dando lugar a radicales libres, y estos, a radicales hidroxilo, lo que es causa de estrés oxidativo, parecido al explicado con el cobre²². Con respecto al péptido Tau, el Fe^{3+} se puede unir a la forma hiperfosforilada de Tau, lo que puede acabar dando lugar a los nudos neurofibrilares, aunque esto no se da si se tiene Fe^{2+} .³⁰

Con el aluminio se ha visto que puede inducir la agregación de los péptidos β -amiloides, aunque no hay consenso para determinar que esta pueda ser una causa del Alzheimer debido a la gran exposición de la sociedad a este metal.

2. OBJETIVO

En este trabajo se realiza una revisión bibliográfica sobre la hipótesis de la desregulación de la homeostasis de algunos bio-metales como posible causa de la enfermedad de Alzheimer. También es objeto de esta revisión el estudio de los fármacos quelantes, que son y han sido objeto de investigación, como agentes terapéuticos para tratar este tipo de demencia.

3. METODOLOGÍA

El trabajo se realizó mediante una búsqueda bibliográfica, empleando buscadores como PubMed, Google Scholar o Scielo. Además, los ensayos clínicos se buscaron en la página web de Clinicaltrial.gov. Para ello se emplearon palabras clave como Alzheimer, fármacos quelantes, homeostasis de los metales.

Las estructuras químicas se dibujaron empleando el programa ChemSketch, las gráficas con Excel y los dibujos a mano o con Paint.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se ha explicado anteriormente, una de las hipótesis como causa de EA es un desajuste en la homeostasis de algunos biometales, ya que se sabe que algunos iones metálicos participan en la agregación de los péptidos β -amiloides y pueden dar lugar al estrés oxidativo.

Así, una de las dianas para las nuevas generaciones de fármacos busca impedir las interacciones entre los iones metálicos y los péptidos β -amiloides. Una forma de lograrlo es atrapando los metales, y que, de esta manera, dejen de estar libres mediante el empleo de agentes quelantes.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos medicamentos se van a utilizar para el tratamiento de una enfermedad de tipo neurodegenerativo, por lo que han de tener una serie de características fisicoquímicas que garanticen su acceso a la zona cerebral y, una vez allí, tener una acción selectiva para que no se acelere la degeneración cerebral.

En primer lugar, estas moléculas tienen que ser de bajo peso molecular, lo que les permitirá atravesar la barrera hematoencefálica. No solo esto, sino que además no tienen que estar cargadas (o tener una baja carga) y ser estables, para garantizar que se cruce la barrera. Otra característica a tener en cuenta es que tienen que tener bajos efectos secundarios y una baja toxicidad.

Por otro lado, como ya se ha explicado, es importante la selectividad de los fármacos para disminuir su toxicidad. Para ello, tienen que quelar los iones metálicos necesarios, y no tener una acción inespecífica, ya que esto último acabaría afectando a otras moléculas, como las metaloenzimas, que son imprescindibles para el correcto funcionamiento del cerebro.

Para explicar la acción quelante de los fármacos en investigación, hemos seleccionado las siguientes moléculas:

- DP-109, por ser una de las primeras que se investigó
- XH-1, por su estructura simétrica y sus dos zonas de unión que la hacen tener una acción doble
- Clioquinol, por la gran cantidad de derivados que se han ido desarrollando a partir de esta molécula, además de que ha llegado hasta la fase II de los ensayos clínicos.

En los tres casos he comentado el proceso de investigación para determinar la efectividad o falta de ella en el tratamiento del Alzheimer.

4.1. Quelación

Los agentes quelantes pueden ser inorgánicos u orgánicos, y se caracterizan por unirse a iones metálicos formando un quelato, que es una estructura en forma de anillo. Para que esta unión pueda ser posible es importante que el átomo o el grupo químico que vaya a realizar la

unión quelante tengan un par de átomos libres. Principalmente se suele recurrir al azufre, nitrógeno y oxígeno, que se pueden unir al metal, o ligando, de diferente forma:

- formando dos enlaces covalentes,
- un enlace covalente y uno coordinado,
- o dos enlaces coordinados, si el agente quelante es bidentado.

Los tres átomos antes mencionados (S, N y O) suelen participar en la unión quelante mediante una serie de grupos químicos, entre los que se encuentran: -SH, -S-S-, -NH₂, =NH, -OH, -OPO₃H o -C=O. Los ligandos, en función del número de enlaces que forman en el complejo ligando-metal, pueden ser clasificados como:

- ligandos monodentados: forman una unión simple agente quelante-ligando,
- ligandos bidentados y
- ligandos multidentados

Los dos últimos dan lugar a una serie de estructuras en forma de anillo debido a la unión del ion metálico con dos o varios átomos (Fig. 3).

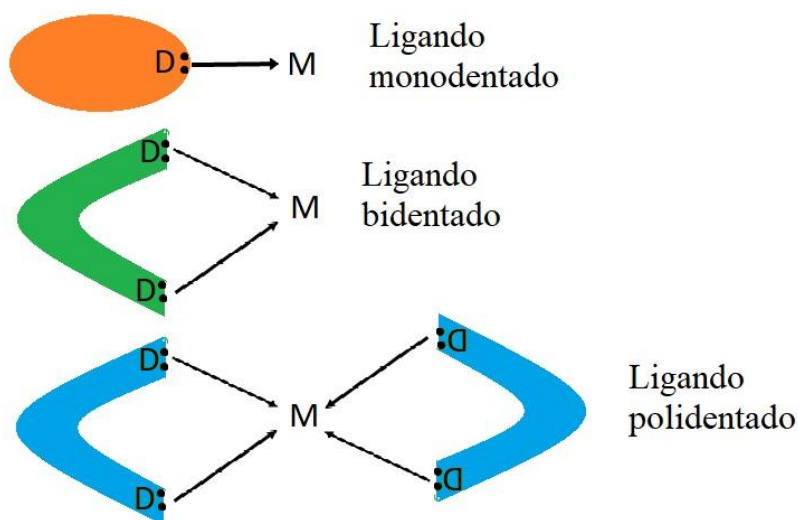


Fig. 3. Tipos de unión átomo-ligando, donde M es el ion metálico y D, los átomos donantes de un par de electrones que dan lugar al complejo quelante.

En esta unión, el par solitario del heterátomo forman un complejo de coordinación. Sin embargo, como no hay ni ganancia ni pérdida de electrones, la carga del ion se mantiene como estaba. Esto, conocido como carga iónica neta, es muy importante para determinar cómo se va a comportar el complejo quelante dentro del organismo, es decir, para comprender sus características farmacocinéticas y poder saber a dónde va a dirigirse.

La estabilidad del complejo depende de una serie de factores, como es la propia constante de estabilidad. Esta a su vez depende de la naturaleza del agente quelante y el metal. Sin embargo, la constante no es decisiva para determinar cuál es la unión que se formará preferiblemente en una zona determinada del organismo, por lo que es importante tener en cuenta también la concentración del metal y la estabilidad de los anillos quelantes que se formen.

Otro factor a tener en cuenta es el pH. A grandes rasgos, en condiciones de pH alto los metales suelen dar lugar a hidróxidos, que son insolubles, por lo que el agente quelante no puede unirse a ellos. Por el contrario, a un pH bajo son estos agentes los que son inestables³¹.

4.2. DP-109

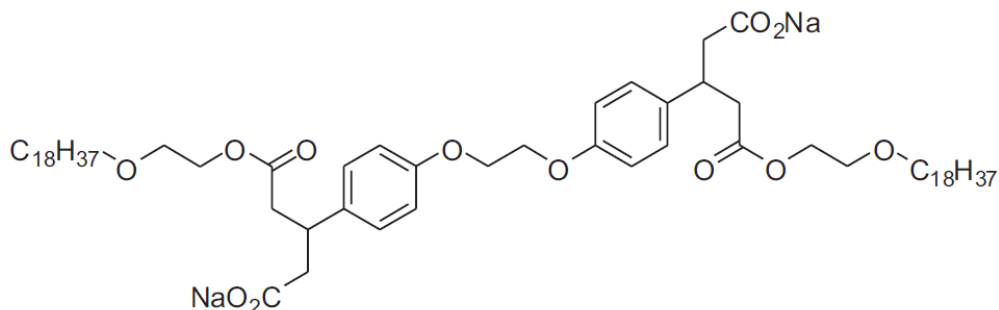


Fig. 4. Compuesto DP-109

Es un agente quelante de naturaleza lipofílica (Fig. 4). En una investigación realizada por la universidad de Ulsan, en Seúl (Corea del Sur) se ha visto que esta molécula reduce la agregación de los péptidos β -amiloides y la consecuente formación de las placas amiloides que acaban dando lugar al Alzheimer. Esto se consigue gracias a que quela diversos metales, entre los que se encuentran el zinc, hierro y el cobre. Dicha investigación se ha llevado a cabo en ratones de sexo femenino con 18 meses de edad de la cepa Tg2576, que tienen un gen transgénico de la proteína precursora de los péptidos β -amiloides (ratones hA β PP-transgénico Tg2576)³². Para ello, se ha dividido los ratones en dos grupos:

- un grupo control, al que se le administró un placebo
- otro grupo al que se le administró 5mg/kg por día de DP-109

La investigación fue llevada a cabo durante tres meses. Tras este periodo, los ratones fueron sacrificados y se analizaron sus cerebros. Se empleó la tinción de rojo Congo para la identificación de las placas amiloides compactas y el posterior uso de un microscopio para medir el área de las mismas. Además, se midió la concentración de los péptidos β -amiloides 40 y 42 mediante la reacción antígeno-anticuerpo ELISA, con la intención de comprobar la cantidad de depósitos β -amiloides difusos.

Finalmente, se observó que el grupo de ratones tratados con el fármaco DP-109 tenían, significativamente, menos cantidad de depósitos amiloides difusos, así como una menor área cerebral afectada por las placas amiloides. Todo esto comparándolo con el grupo control.

Con respecto a la cantidad de péptidos β -amiloides 40 y 42, tanto solubles como insolubles, se ha visto una reducción significativa en la cantidad de insolubles (como se dijo anteriormente, son los perjudiciales) y un aumento de los solubles. Esto comparando el grupo tratado con el control.

En el caso de la fluorescencia detectada para medir el zinc libre, la medida fue significativamente más baja en el grupo tratado que en el control. Es decir, la cantidad de este metal disminuyó tras administrar durante 3 meses el fármaco DP-104.

4.3. XH1

Debido a la dificultad para tratar el Alzheimer por carecer de una diana específica y una baja seguridad clínica, el uso de los medicamentos quelantes no se ha podido potenciar. Es por ello que un grupo de investigación en EEUU ha desarrollado el XH1, una molécula lipofílica

que presenta dos zonas, una para unirse a los depósitos amiloides y otra para quelar los metales, ambas unidas por enlaces amidas. La parte empleada para unirse a los depósitos amiloides tiene una estructura tipo 4-benzotiazolen-2-il-fenilamina, mientras que para la segunda parte se empleó el quelante pentaacetato de dietilentriamina (DTPA) como modelo (Fig. 5).

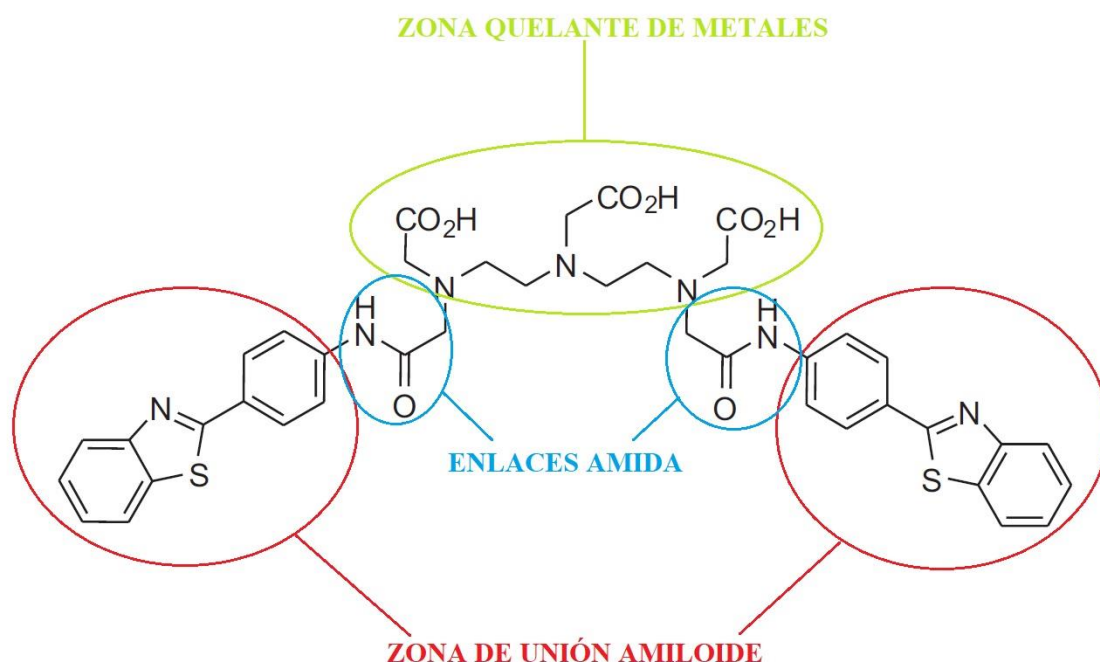


Fig. 5. XH-1

Gracias a diferentes ensayos se cree que la parte lipofílica de la zona de unión a los depósitos amiloides interacciona con la zona C-terminal de los péptidos β -amiloides-40, también lipofílicos. Por otra parte, la zona hidrofílica de la zona quelante de metales interaccionaría con una de las α -hélices de los mismos tipos de péptidos.

Para el estudio de esta molécula, se empleó ratones femeninos transgénicos tipo PS1(M146V) \times APPTg2576, de unos 6 meses de edad. Para asegurarse que eran adecuadas para el experimento, los ratones fueron genotipados para comprobar que eran transgénicos en los genes APP (proteína inductora de péptidos β -amiloides) y PS1 (prenisilina-1, se encarga de la ruptura de la APP). Se les dividió en dos grupos, el control y el tratado. A este último grupo se les administró, durante 4 semanas, una dosis diaria de 25mg/kg de XH1. A toda la población se le monitorizó las funciones vitales para comprobar que el fármaco no produjese ningún efecto tóxico.

Tras el periodo de 4 semanas, los ratones fueron sacrificados y se extrajo el cerebro. Cada mitad de este fue utilizada para diferentes pruebas: una mitad para una comprobación bioquímica y la otra para inmunohistoquímica. En la parte en la que se realizó el análisis bioquímico, se midieron los péptidos β -amiloides-40 mediante la prueba colorimétrica de ELISA. En la otra mitad del cerebro, se usaron anticuerpos anti- β -amiloide-40 y anti- β -amiloide-42, y diaminobencidina (DAB) como cromógeno.

Por otro lado, se realizó un ensayo in vitro para comprobar el efecto del fármaco XH1 en la reducción de los precipitados β -amiloides inducidos por Zn (II). Se usó para comparar otro agente cuya acción quelante es conocida por ser potente, el pentaacetato de dietilentriamina (DTPA). Para ello, se incubó la misma concentración de ambas moléculas (25 μ M) con Zn(II) unido a histidina (10 μ M).

En el ensayo in vivo con los ratones PS1(M146V)xAPPTg2576 se vio una disminución en el número de las placas amiloides gracias al ensayo inmunohistoquímico. Sin embargo, este es de tipo cualitativo, por lo que, para dar un resultado más exacto, de tipo cuantitativo, se realizó la prueba bioquímica con ELISA para medir la concentración de péptidos β -amiloides-40. Tras esto se observó que no hay diferencias significativas en el grupo tratado y el control en el tejido estriado cerebral, pero sí hay una disminución en la cantidad de los péptidos amiloides de hasta el 32% en el córtex tras tratar con XH1.

En el caso del ensayo in vitro, se ha visto, en comparación con DTPA, una disminución de la agregación amiloide inducida por Zn de más del 50%.

4.4. Clioquinol y derivados

El clioquinol, o PBT1 (Fig. 4), es una molécula desarrollada por los laboratorios australianos de Prana Biotechnology. Es de naturaleza lipófila y presenta un pequeño tamaño, con una estructura de 8-hidroxiquinolina (5-cloro-7-yodo-8-hidroxiquinolina). Las dos primeras características le permiten pasar la barrera hematoencefálica y acceder al cerebro, pudiendo ejercer su acción quelante de iones metálicos. Para dicha quelación el oxígeno del fenol y el nitrógeno de la piridina que presentan actúan como donador de electrones.

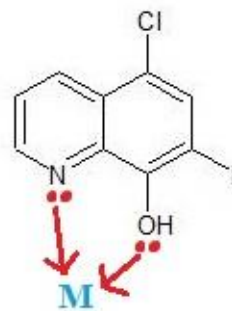


Fig. 4. Clioquinol

Actúa como antiparasitario y antibacteriano, acciones por las que está siendo utilizado hoy en día. La Agencia Española del Medicamento tiene autorizadas para su comercialización tres fármacos de este principio activo: Menaderm® otológico, Cuatrocerm® crema y Menaderm® clio crema. Los tres se usan para el tratamiento de infecciones de tipo bacteriano que estén teniendo lugar en la piel, excepto el primero, que se emplea en el conducto auditivo³³. Además, la Organización Mundial de la Salud lo tiene registrado como antimicrobiano de uso externo, indicando como precaución que la absorción del fármaco puede dar lugar a alteraciones en la función tiroidea³⁴.

Antiguamente, el clioquinol se utilizaba para tratar infecciones intestinales producidas por bacterias y parásitos. Sin embargo, dicha indicación se prohibió tras la aparición de hasta 10,000 personas en Japón, en el año 1970, afectadas por la mielo-óptico-neuropatía subaguda. Esta alteración se caracteriza por una desmielinización que afecta tanto a la médula espinal como al nervio óptico, pudiendo esto último acabar produciendo ceguera³⁵. Se cree que este efecto adverso puede haber sido debido a una disminución de los niveles de cobalamina o vitamina B12 producida por el clioquinol, aunque esto está aún sin confirmar³⁶.

Con respecto al Alzheimer y a su capacidad quelante de metales, se ha comprobado que el clioquinol puede quelar, con una afinidad moderada, los iones Cu^{2+} y Zn^{2+} . Esto se comprobó en la investigación realizada por Budimir, A et al., en la que se analizó la capacidad de unión del principio activo a los dos metales mediante espectrometría de masas, potenciometría y espectrofotometría³⁷.

En el año 1999, en un artículo publicado en el Journal of Biological Chemistry, se observó que el clioquinol disuelve los agregados β -amiloides. El Zn(II) y el Cu(II) forman precipitados insolubles tras unirse a los péptidos β -amiloides, tal como baraja la hipótesis de la homeostasis de los metales. Por ello, este quelante consigue que se deshaga esta estructura y sea solubles gracias a su unión a los dos iones. Esta investigación fue llevada a cabo en tejidos cerebrales post-mortem, a los que se les introdujo agregados β -amiloides sintéticos que previamente se han formado con Zn(II) y Cu(II)³⁸.

El clioquinol consiguió llegar hasta una fase piloto IIa de un ensayo clínico³⁹, en donde se observó una disminución de los niveles plasmáticos de los péptidos β -amiloides de tipo 42, además de atenuar el deterioro cognitivo en los pacientes con Alzheimer. Por otro lado, también podría inhibir los procesos redox a los que da lugar el ión Cu(II) y que acaban generando peróxido de hidrógeno, un compuesto neurotóxico.

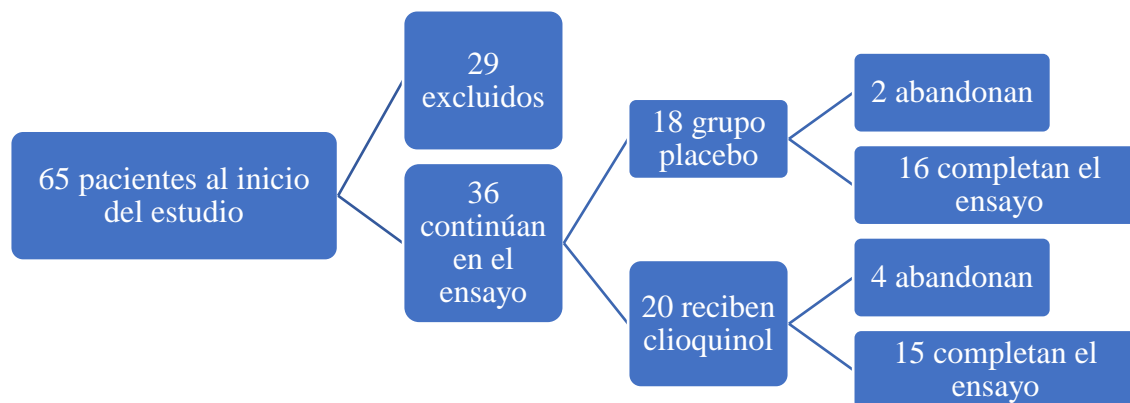
En este ensayo clínico se partió de 65 pacientes, pero solo 36 consiguieron pasar los criterios de inclusión. Estos criterios fueron:

- haber sido diagnosticados con Alzheimer
- que hubiesen obtenido una puntuación entre 10 y 24 en un examen del estado mental (mini-mental state examination, MMSE), o entre 20 y 45 en una subescala cognitiva para evaluar el Alzheimer (Alzheimer's disease assessment scale-cognitive subscale, ADAS-cog)
- que hubiesen sido tratados con donepezilo durante un mínimo de 6 meses a una dosis entre 5 y 10 miligramos.

Este grupo de pacientes fue dividido en dos de manera aleatoria, uno de los cuales fue tratado con el clioquinol y el otro, con un placebo. El estudio duró 36 semanas, y se trató con doble ciego, es decir, ni los pacientes ni los investigadores sabían a qué grupo pertenecía cada persona. Con respecto a la cantidad de clioquinol recibida por vía oral por el grupo tratado, ésta fue variando a lo largo de las semanas:

- Semana 0 a 12: recibieron una dosis de 125mg
- Semana 13 a 24: 250mg de clioquinol
- Semana 25 a 36: 375mg de clioquinol

Todas estas dosis fueron dadas dos veces al día. Al finalizar el estudio, en la semana 36, 15 personas consiguieron completarlo en el grupo tratado y 16, en el placebo. El resto fue abandonando el estudio por diferentes causas.



En el grupo tratado se observó una buena tolerancia al fármaco. Además, para determinar el nivel de desarrollo cognitivo a lo largo del ensayo, se empleó una subescala cognitiva de la Escala de Evaluación de la Enfermedad del Alzheimer, dando en el grupo al que se le administró clioquinol una puntuación ≥ 25 .

Sin embargo, en el proceso de fabricación del PTB1 se forma un compuesto secundario, la di-yodo-8-hidroxiquinolina, de naturaleza cancerígena, y se forman a partir del yodo que tiene la propia estructura en posición 7. Esto dio pie a que la investigación con este fármaco fuese suspendida, ya que los niveles de di-yodo no podían disminuir a niveles aceptables⁴⁰.

A partir del clioquinol se desarrolló otra molécula, el PTB2, que tiene una estructura de 5,7-dicloro-2-[(dimetilamino)metil]-8-hidroxiquinolina. Fue creada por el mismo laboratorio del clioquinol, el Prana Biotechnology, aunque en este caso carece del átomo de yodo en su estructura. Además, tanto el oxígeno como el nitrógeno de la amina y el de la piridina pueden actuar como donadores de electrones para formar la estructura quelante con el ion metálico (Fig. 5).

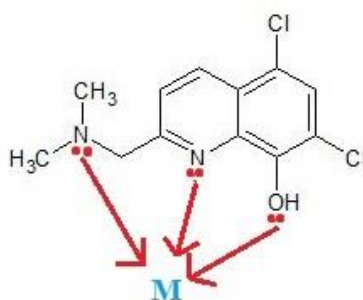


Fig. 5. PTB2

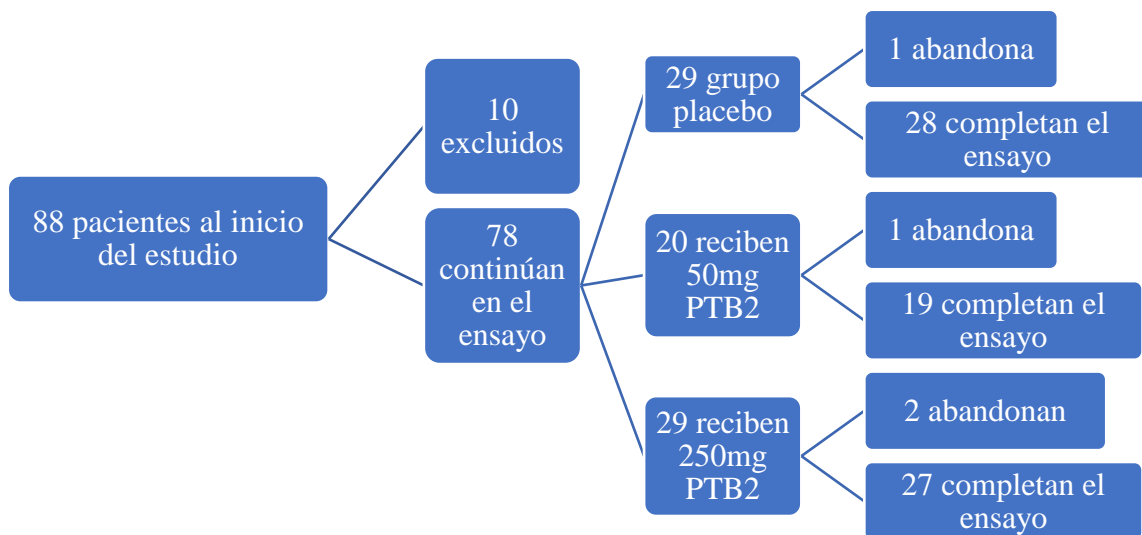
Si se compara este nuevo principio activo con el clioquinol, este presenta una mayor solubilidad, propiedades ionóforas y mayor permeabilidad para pasar la barrera hematoencefálica. Dentro del cerebro, en las zonas afectadas por el Alzheimer, se cree que tiene mayor capacidad para captar, o quelar, el cobre, junto con otros iones metálicos que estén formando parte de los depósitos amiloides extracelulares. Además, podría tener una mayor capacidad de interacción con los péptidos β -amiloides⁴¹.

Con el PBT2 también se llegó hasta la fase IIa de un ensayo clínico⁴², y esta fue llevada a cabo durante 12 semanas, entre el 6 de diciembre del 2006 hasta el 21 de septiembre de 2007. Además, también se buscaba observar la tolerancia y la seguridad al fármaco. Como criterios de inclusión de los pacientes en el estudio, se establecieron:

- que fuesen mayores de 55 años
- con diagnóstico temprano de Alzheimer (diagnóstico justificado con una resonancia magnética)
- que hubiesen obtenido una puntuación entre 20 y 26 en un examen del estado mental (mini-mental state examination, MMSE), o entre 10 y 25 en una subescala cognitiva para evaluar el Alzheimer (Alzheimer's disease assessment scale-cognitive subscale, ADAS-cog)
- y que hayan sido tratados, durante un mínimo de 4 meses, con algún inhibidor de acetilcolinesterasa, como la rivastigmina, el donepezilo o la galantamina.

También se determinaron una serie de criterios de exclusión, que consistían en padecer otras enfermedades que impidiesen la adhesión al estudio. El reclutamiento se realizó entre Suecia y Australia.

Se partió de 88 pacientes, aunque finalmente solo 78 se escogieron para el estudio, debido a que 10 no cumplían los criterios de inclusión. Estos fueron divididos en tres grupos de estudio de manera aleatoria: unos fueron tratados con placebo (29 pacientes), 20 recibieron una dosis de PTB2 de 50mg, y el tercer grupo, formado por 29 personas, recibió una dosis del fármaco de 250mg. A lo largo del estudio se retiraron 4 pacientes por diversos motivos: 1 en el grupo de los que recibían el placebo, 1 de entre los que recibían 50mg de PTB2, y 2 en el grupo que recibía 250mg del fármaco.



A cada grupo se le administraba el placebo o el fármaco una vez al día, durante 12 semanas, por vía oral.

La asignación del tratamiento a los diferentes grupos de pacientes se realizó de manera aleatoria y se estudiaron siguiendo el doble-ciego, es decir, tanto los pacientes, como los investigadores encargados de recoger los datos, los cuidadores, el personal del lugar y el patrocinador desconocían quién recibía cada tipo de tratamiento.

Para analizar si el fármaco era seguro o no, se realizaron numerosas pruebas, como por ejemplo exámenes neurológicos, análisis bioquímicos, análisis hematológicos, pruebas de orina, electrocardiogramas o exámenes físicos. Además, como ya se ha comentado anteriormente, el clioquinol estaba asociado con la mielo-óptico-neuropatía subaguda, por lo que también se procedió a analizar las funciones visuales. Por otro lado, para comprobar si el fármaco estaba teniendo algún efecto sobre el desarrollo del Alzheimer, se analizaron los niveles de péptidos β -amiloides de tipo 40 y 42, el Zn(II) y el Cu(II) a partir de un análisis hematológico y del líquido cefalorraquídeo mediante punción lumbar. Las muestras de sangre se recogían cada semana, pero la punción se realizó sólo al inicio y al final del estudio.

Al finalizar el tratamiento se obtuvieron una serie de resultados. En primer lugar, no se observaron efectos adversos graves tras el tratamiento con PTB2, lo que confirma que es un fármaco seguro y no tóxico. Sí que aparecieron efectos adversos leves en todos los grupos tratados, como una nasofaringitis, fatiga, dolor de cabeza, somnolencia o mareos.

Por otro lado, las concentraciones séricas de los iones metálicos Zn(II) y Cu(II) no se vieron afectadas por el tratamiento, al igual que los biomarcadores plasmáticos del Alzheimer. Sin embargo, sí se observó una reducción significativa entre el grupo placebo y el tratado con la mayor dosis del fármaco, es decir, con 250mg de PTB2, en la forma más tóxica de los péptidos β -amiloides, la forma 42. Además, los niveles de la forma amiloide 40 también disminuyeron si se comparaban ambos grupos, pero dicha diferencia no era significativa. Ambos tipos de péptidos medidos en el LCR. Por el contrario, los niveles de ambos no variaban a nivel plasmático.

Estos resultados hacen creer que el efecto del PTB2 es más de tipo metabólico, afectando a la síntesis de este tipo de péptidos.

Sin embargo, la compañía creadora del fármaco, Prana Biotechnology, anunció en abril del 2014 que no iban a continuar con los ensayos clínicos de fase II debido a una serie de complicaciones en la fabricación a gran escala del fármaco⁴³.

4.5. Otros compuestos

A parte de los principios activos mencionados, se han ido investigando otros grupos estructurales buscando, al igual que los anteriores, quelar los metales para conseguir disminuir la acumulación de péptidos β -amiloides e impedir la producción de peróxido de hidrógeno, que es neurotóxico⁴³.

4.5.1. Derivados de β -aminopiridina

Estos compuestos también presentan una piridina en su estructura, al igual que el clioquinol. Sin embargo, en vez de estar unido el anillo de piridina a un fenol, lo está a una anilina. Por lo tanto, es el nitrógeno el que actúa como donador de electrones para la captación de iones metálicos y formar así los enlaces quelantes. Para la creación de estas estructuras, se tomaron como referencia tres moléculas (Fig. 6):

- clioquinol
- estilbene, debido a que se ha visto que tiene afinidad por los péptidos β -amiloides

- 1,10-fenantrolina, gracias a su capacidad de coordinación con distintos iones metálicos, y porque se ha comprobado que los derivados del mismo pueden inhibir los péptidos β -amiloides

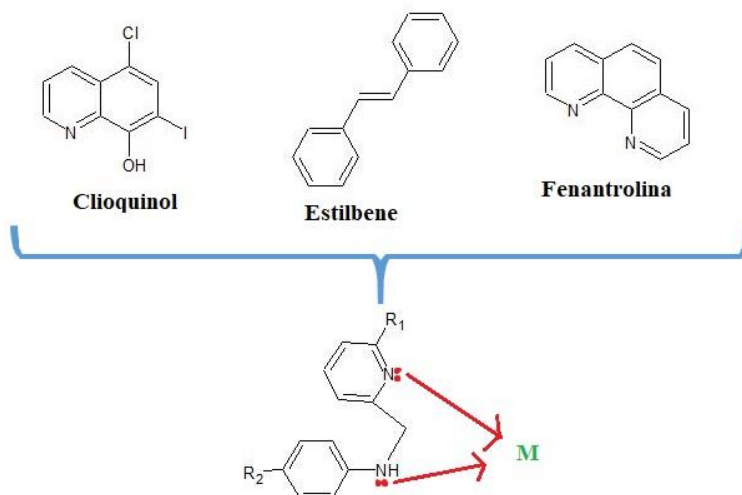


Fig. 6. Formación de aminopiridina

4.5.2. Fenol-amino derivados

En este caso, para formar estas moléculas han empleado el resveratrol y la tioflavina, junto con el clioquinol. La razón por la que se empleó el resveratrol fue que es un antioxidante conocido presente en el vino. En el caso de la tioflavina, su uso es debido a un interés en mejorar las uniones quelantes con los iones metálicos, garantizando una mayor interacción con los péptidos β -amiloides (Fig. 7).

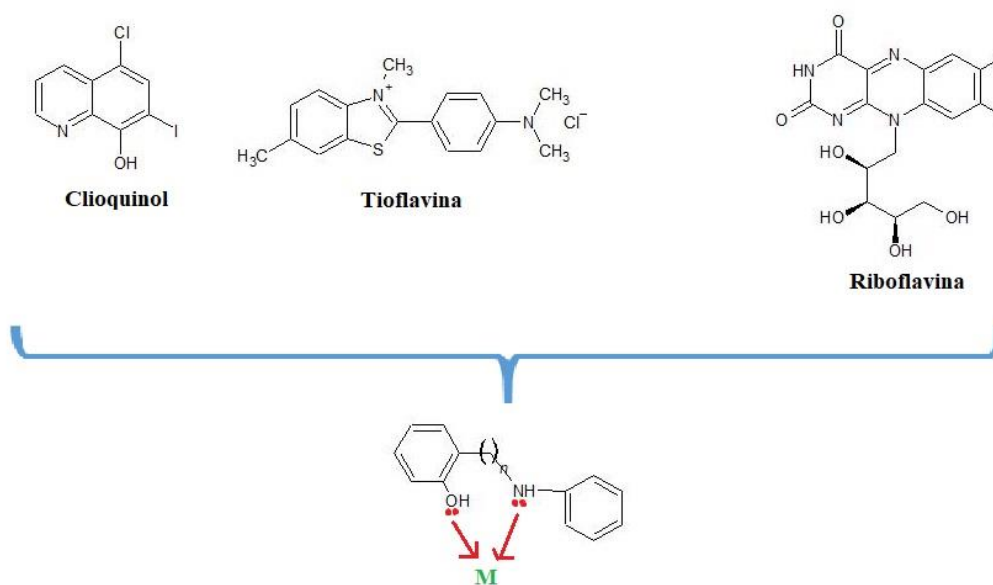


Fig. 7. Formación de fenol-amino derivados

5. CONCLUSIONES

Esta nueva generación de fármacos está abriendo la puerta a nuevas líneas de investigación que permitan descubrir una cura eficaz para el Alzheimer. En este trabajo se ha hablado de distintas estructuras que comparten la presencia de un anillo heterocíclico y/o un heteroátomo, encargados de atrapar metales mediante enlaces quelantes. A pesar de que la teoría ha demostrado ser cierta, ya que en ensayos con ratones se ha observado una disminución de las placas amiloides (como es el caso del DP-109), en la práctica estos fármacos siguen presentando complicaciones debido a su falta de selectividad.

Aun así, esta selectividad se intenta mejorar, como se ha visto con el XH1, que presenta un enfoque interesante a nivel estructural gracias a su zona de unión amiloide. Esto permite un efecto directo a nivel cerebral, afectando solo al tejido dañado por el Alzheimer. Sin embargo, tanto el DP-109 como el XH1 requieren de más investigación en seres humanos, ya que ambos fármacos no han pasado de una observación de su efecto en ratones.

De todas estas estructuras, la que presenta una mayor perspectiva de futuro es el clioquinol y sus derivados, como el PTB2, del que se ha hablado también en este trabajo. Ambas moléculas han conseguido llegar hasta una fase II de un ensayo clínico, lo que hace crecer las esperanzas en este tipo de fármacos. Además, en ambos casos, la no continuación en los ensayos fue debida no a efectos adversos que hayan producido los propios principios activos, sino a problemas en la fabricación de los mismos. Por lo tanto, si eso se consiguiese mejorar, podría ser posible continuar con la investigación o incluso descubrir otras estructuras que no presentasen dichos problemas.

BIBLIOGRAFÍA

¹ Organización Mundial de la Salud (14 de Mayo de 2019). *Demencia. Datos y cifras*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>

² Fundación Pasqual Maragall (2019). *La enfermedad*. Obtenido de El Alzheimer se lo lleva todo: <https://fpmaragall.org/alzheimer-enfermedad/enfermedad-alzheimer/>

³ Association, A. (Abril de 2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 12(4), 459-509. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001>

⁴ Medicine, N. U. (14 de Mayo de 2019). *Genetics Home Reference*. Obtenido de Alzheimer disease: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/alzheimer-disease#definition>

⁵ Créange A., D. L. (2016). *Neurologie*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson SAS

⁶ Alzheimer's Association (2018). *Genetics*. Obtenido de <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers/causes-and-risk-factors/genetics>

⁷ Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current neuropharmacology*, 14(1), 101–115. doi:10.2174/1570159X13666150716165726

⁸ Flores Soto ME, S. T. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci*, 6(4), 315-326.

⁹ Carretero, M. (Julio-Agosto de 2003). Los inhibidores de la acetilcolinesterasa en el tratamiento del Alzheimer. *OFFARM*, 22(7), 114-115.

¹⁰ Ospina-García, N., Pérez-Lohman, C., & Vargas-Jaramillo, J. D. (Noviembre-Diciembre de 2017). Ganglios basales y conducta. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 18(6), 74-86.

¹¹ Liu, A. K., Chang, R. C., Pearce, R. K., & Gentleman, S. M. (2015). Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*, 129(4), 527–540. doi:10.1007/s00401-015-1392-5

¹² Doucette R, F. M. (Noviembre de 1986). Cell loss from the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease. *The Canadian journal of neurological science*, 13(4), 435-440.

¹³ Wilcock, G. K., Esiri, M. M., Bowen, D. M., & Hughes, A. O. (1988). The differential involvement of subcortical nuclei in senile dementia of Alzheimer's type. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 51(6), 842–849. doi:10.1136/jnnp.51.6.842

¹⁴ Rosenberg, P. B., Nowrangi, M. A., & Lyketsos, C. G. (2015). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: What might be associated brain circuits?. *Molecular aspects of medicine*, 43-44, 25–37. doi:10.1016/j.mam.2015.05.005

¹⁵ Budimir, A. (Marzo de 2011). Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharmaceutica*, 61(1), 1-14. doi:10.2478/v10007-011-0006-6

¹⁶ Del Prà, I., Chiarini, A., & Gui, L. (16 de Abril de 2014). Do Astrocytes Collaborate with Neurons in Spreading the “Infectious” A β and Tau Drivers of Alzheimer’s Disease? *The Neuroscientist*. doi:10.1177/1073858414529828

¹⁷ Kumar, A., Singh, A. (Abril de 2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*, 67(2), 195-203. doi:10.1016/j.pharep.2014.09.004

¹⁸ Hardy, J., Selkoe, D. J. (19 de Julio de 2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356. doi:10.1126/science.1072994

¹⁹ Zatta, P., Drago, D., Bolognin, S., & Sensi, S. L. (Julio de 2009). Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacological Science*, 30(7), 346-355. doi:10.1016/j.tips.2009.05.002

²⁰ Lovell, M., Robertson, J., Teesdale, W., Campbell, J., & Markesbery, W. (11 de Junio de 1998). Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the Neurological Science*, 158(1), 47-52. doi:10.1016/S0022-510X(98)00092-6

²¹ Eskici, G., & Axelsen, P. H. (18 de Junio de 2012). Copper and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease. *Biochemistry*, 51(32), 6289-6311. doi:10.1021/bi3006169

²² Rival, T., Page, R. M., Chandraratna, D. S., & Sendal, T. J. (2009). Fenton chemistry and oxidative stress mediate the toxicity of the β -amyloid peptide in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 29(7). doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06701.x

²³ Cristóvão, J. S., Santos, R., Gomes, C. M. (2016). Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 13. doi:10.1155/2016/9812178

²⁴ Maurer, I., Zierz, S., & Möller, H.-J. (Mayo-Junio de 2000). A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiology of Aging*, 21(3), 455-462. doi:10.1016/S0197-4580(00)00112-3

²⁵ Baum, L., Shuen Chan, I. H., Kwok-Kuen Cheung, S., Goggins, W., Mok, V., Lam, L., & Leung, V. (Febrero de 2010). Serum zinc is decreased in Alzheimer's disease and serum arsenic correlates positively with cognitive ability. *BioMetals*, 23(173). doi:10.1007/s10534-009-9277-5

²⁶ Cuanjungco, M., & Fagét, K. (Enero de 2003). Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*, 41(1), 44-56. doi:10.1016/S0165-0173(02)00219-9

²⁷ Sun, X.-Y., Wei, Y.-P., Xiong, Y., Wang, X.-C., Xie, A.-J., Wang, X.-L., Wang, Q. (2012). Synaptic Released Zinc Promotes Tau Hyperphosphorylation by Inhibition of Protein Phosphatase 2A (PP2A). *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11174-11182. doi:10.1074/JBC.M111.309070

²⁸ Mo, Z.-Y., Zhu, Y.-Z., Zhu, H.-L., Fan, J.-B., Chen, J., & Liang, Y. (2009). Low micromolar zinc accelerates the fibrillization of human tau via bridging of Cys-291 and Cys-322. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34648-34657. doi:10.1074/jbc.M109.058883

²⁹ Liu, B., Moloney, A., Meehan, S., Morris, K., Thomas, S., Serpell, L., . . . Crowther, D. (2011). Iron promotes the toxicity of amyloid beta peptide by impeding its ordered aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4248-4256. doi:10.1074/jbc.M110.158980

³⁰ Yamamoto, A., Shin, R.-W., Hasegawa, K., Naiki, H., Sato, H., Yoshimasu, F., & Kitamoto, T. (03 de Febrero de 2004). Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated τ and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 82(5). doi:10.1046/j.1471-4159.2002.t01-1-01061.x

³¹ Flora, S. J., & Pachauri, V. (2010). Chelation in metal intoxication. *International journal of environmental research and public health*, 7(7), 2745-2788. doi:10.3390/ijerph7072745

³² Lee, J.-Y., Friedman, J. E., Angel, I., Kozak, A., & Koh, J.-Y. (Noviembre-Diciembre de 2004). The lipophilic metal chelator DP-109 reduces amyloid pathology in brains of human β -amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 25(10), 1315-1321. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.01.005

³³ Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. CIMA. Obtenido de Clioquinol: <https://cima.aemps.es/cima/publico/lista.html>

³⁴ Organización Mundial de la Salud (1999). *Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades cutáneas*. Obtenido de <https://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2920s/23.3.html#Jh2920s.23.3>

³⁵ Konagaya, M. (Enero de 2015). Toxicity of clioquinol and the status quo. *Brain and nerve*, 67(1), 49-62. doi:10.11477/mf.1416200086

³⁶ Yassin, M., Ekblom, J., Xilinas, M., Gottfries, C., & Oreland, L. (01 de Febrero de 2000). Changes in uptake of vitamin B12 and trace metals in brains of mice treated with clioquinol. *Journal of the Neurological Science*, 173(1), 40-44. doi:10.1016/S0022-510X(99)00297-X

³⁷ Budimir, A., Humbert, N., Elhabiri, M., Osinska, I., & Biruš, M. (Marzo de 2011). Hydroxyquinoline based binders: Promising ligands for chelathotherapy? *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(3), 490-496. doi:10.1016/J.JINORGBIO.2010.08.014

³⁸ Cherny, R. A., Legg, J. T., McLean, C. A., Fairlie, D. P., Huang, X., Atwood, C. S., . . . Bush, A. I. (1999). Aqueous Dissolution of Alzheimer's Disease A β Amyloid Deposits by Biometal Depletion. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 23223-23228. doi:10.1074/JBC.274.33.23223

³⁹ Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, et al. Metal-Protein Attenuation With Iodochlorhydroxyquin (Clioquinol) Targeting A β Amyloid Deposition and Toxicity in Alzheimer Disease: A Pilot Phase 2 Clinical Trial. *Arch Neurol*. 2003;60(12):1685–1691. doi:10.1001/archneur.60.12.1685

⁴⁰ P, A., R, C., D, F., E, G., & E, R. (2008). Rapid Restoration of Cognition in Alzheimer's Transgenic Mice with 8-Hydroxy Quinoline Analogs Is Associated with Decreased Interstitial A β . *Neuron*, 59(1), 43-55. doi:10.1016/J.NEURON.2008.06.018

⁴¹ Bush, A., & Tanzi, R. E. (Julio de 2008). Therapeutics for Alzheimer's Disease Based on the Metal Hypothesis. *Neurotherapeutics*, 5(3), 421-432. doi:10.1016/J.NURT.2008.05.001

⁴² Lannfelt, L., Blennow, K., Zetterberg, H., Batsman, S., & Ames, D. (2008). Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting A β as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, 7(9), 779-786. doi:10.1016/S1474-4422(08)70167-4

⁴³ Santos, M., Chand, K., & Chaves, S. (15 de Noviembre de 2016). Recent progress in multifunctional metal chelators as potential drugs for Alzheimer's disease. *Coordination Chemistry Reviews*, 327-328, 287-303. doi:10.1016/J.CCR.2016.04.013