



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS  
MARINOS COMO POSIBLES  
FÁRMACOS ANTI-ALZHEIMER**

Marta Leirós Villalba

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

FACULTAD DE VETERINARIA

LUGO

2015



DEPARTAMENTO DE FARMACOLÓGIA  
Facultad de Veterinaria  
Campus Universitario  
27002, Lugo (Spain)  
Tel.: + 34 982822233  
Fax: + 34 982822233

D. **Luis Botana López**, como Director de la tesis titulada: Caracterización de compuestos marinos como posibles fármacos anti-Alzheimer.

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis presentada por Dña. **Marta Leirós Villalba** es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctoramiento*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis será presentado por ninguno de ellos en otra tesis de Doctoramiento, lo que firmo bajo mi responsabilidad.

Lugo, a 27 de Enero de 2015.

Fdo. Luis Botana López

Doctor en Farmacia

Codirector de tesis

Fdo. Marta Leirós Villalba

Dña. **Eva Alonso López**, como Directora de la tesis titulada: Caracterización de compuestos marinos como posibles fármacos anti-Alzheimer.

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis presentada por Dña. **Marta Leirós Villalba** es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctoramiento*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis será presentado por ninguno de ellos en otra tesis de Doctoramiento, lo que firmo bajo mi responsabilidad.

Lugo, a 27 de Enero de 2015.

Fdo. Eva Alonso López

Doctora en Veterinaria

Codirectora de tesis

Fdo. Marta Leirós Villalba



*“Caer está permitido. ¡Levantarse es obligatorio!”*

*Proverbio ruso*





# Agradecimientos

Llegué a Lugo casi por azar y tras cuatro años tengo mucho que agradecer y mucha gente a la que dar las gracias, por lo que seguro se me quedará algo en el tintero.

Primero, darte las gracias Luis porque apostaste por mí y me diste la oportunidad de hacer la tesis en tu grupo. Me has demostrado tu apoyo y cariño en los momentos más difíciles.

¡Gracias Eva! Sé que no ha sido fácil ser jefa, compañera y amiga. Gracias por tu paciencia, tus ánimos, tus ganas de hacer cosas, tu apoyo a todos los niveles y por decirme lo que no siempre quería escuchar y hacer que quisiera mejorar. Siempre has estado ahí.

Gracias a los compañeros... Sara, Jon, Silvia, Diego, Víctor, Sheila, Paz, Paula... ¡Gracias a todos! Los que acabáis de llegar, los que siempre habéis estado y los que ya os habéis ido... ¡¡¡Habéis sido muy importantes en este camino!!! Gracias por las risas compartidas, los cafés, los dedos cruzados a la espera de que el experimento salga bien, las comidas en las escaleras de emergencia, las cañas, las cenas, el congreso de Peniche (barco incluido ;) ) y esos días festivos en los que tocaba venir a trabajar y os encontraba por los pasillos. ¡¡¡Gracias a todos chicos!!!

Andrés, Ibán, María y Andrea. Gracias. Sin vosotros no habría llegado hasta aquí. Sois mi pequeña familia de Lugo y habéis sido un gran apoyo estos cuatro años. En los momentos duros estuvisteis a mi lado y en los buenos lo celebramos. Andrea, María... no hay páginas suficientes para agradeceroslo, ni para explicaros lo importantes que habéis sido para mí estos cuatro años. Cuando más os necesité, ahí estabais... sin pedirlo, simplemente estabais.

Gracias padrinos. Realmente habéis sido unos segundos padres, me acogisteis en Madrid y me animasteis siempre a buscar mi propio camino. Para mí siempre habéis sido ejemplo de trabajo, esfuerzo y generosidad, que en estos cuatro años ha sido fundamental.

Gracias José Luis, porque aunque apenas nos vemos sé que estás al otro lado del teléfono, ya sea en San Francisco, Madrid o Copenhague. Un día me dijiste que tenía que aspirar a lo más alto, te pregunté sorprendida que si estabas pensando en el Nobel y me dijiste que si era lo más alto sí. Entre tú y yo, no creo que llegue a ganar el Nobel... pero gracias por creer en mí y en que puedo llegar a hacer grandes cosas.

Gracias Arturo. Has vivido muy de cerca los últimos meses de esta Tesis, los cuales no han sido fáciles con muchos nervios y mucho trabajo. Aun así, has conseguido que sonriera en los días más duros, me has animado cuando quería tirar la toalla, me has ayudado a ver las cosas con perspectiva y a disfrutar del momento.

Gracias papá y mamá. Siempre habéis estado a mi lado apoyándome, enseñándome y aconsejándome con cariño y siempre animándome a seguir adelante y no rendirme. Soy la persona que soy y he llegado hasta aquí gracias a vosotros. Esta Tesis y todo el trabajo que hay detrás, os lo dedico a vosotros.



# Abreviaturas y acrónimos

ANT: translocador de nucleótidos de adenina

*(del inglés Adenine nucleotide translocator)*

Apaf1: factor de activación de la apoptosis 1

*(del inglés Apoptotic protease activating factor 1)*

APP: proteína precursora de amiloide

*(del inglés Amyloid precursor protein)*

ARE: elemento de respuesta antioxidante

*(del inglés Antioxidant response element)*

$\beta$ A: beta-amiloide

BACE:  $\beta$ -secretasa

CaMKII: cinasa calmodulina II dependiente de calcio

*(del inglés Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 2)*

CAT: catalasa

CD: ciclofilina D

CDK: cinasa dependiente de ciclina

*(del inglés Cyclin-dependent kinase)*

CoQ10: coenzima Q10

Cyt c: citocromo c

*(del inglés Cytochrome c)*

EA: enfermedad de Alzheimer

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

*(del inglés Epidermal growth factor receptor)*

EO: estrés oxidativo

ERK1/2: cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2

*(del inglés Extracellular-signal-regulated kinase 1/2)*

FDA: Food and Drugs Administration

GPx: glutatión peroxidasa

GSH: glutatión

GSK3b: glucógeno sintasa cinasa-3beta

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

HO<sup>•</sup>: anión hidroxilo

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

IL: interleucina

JNK: cinasa c-Jun N-terminal

Keap1: proteína 1 asociada con la proteína reguladora Kelch

*(del inglés Kelch-like ECH-associated protein 1)*

MAO-B: monoamina oxidasa B

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos

*(del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases)*

MDA: malondialdehído

MWM: laberinto acuático de Morris

*(del inglés Morris Water Maze)*

NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

*(del inglés Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)*

NO<sup>•</sup>: óxido nítrico

NO<sup>•</sup><sub>2</sub>: dióxido de nitrógeno

Nrf2: factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2

*(del inglés Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)*

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: anión superóxido

ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito

PKDP: proteínas cinasas dirigidas a la prolina

PPTM: poro de permeabilidad transitoria mitocondrial

PSEN: presenilina

Px: peroxidasas

RNS: especies reactivas de nitrógeno

*(del inglés Reactive Nitrogen Species)*

ROS: especies reactivas de oxígeno

*(del inglés Reactive Oxygen Species)*

SNC: sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

TNF-α: factores de necrosis tumoral-alfa

*(del inglés Tumor necrosis factor alpha)*

TPK: proteínas cinasas de tirosina

*(del inglés Tyrosine Protein Kinase)*

VDAC: canal de aniones dependiente de voltaje

*(del inglés Voltage-dependent anion channel)*

**NOTA: Se decidió mantener algunas de las abreviaturas desde el inglés para dar continuidad al texto con algunas de las imágenes y con los artículos.**



# Índice

Introducción	1
1. Los compuestos marinos	3
1.1. <i>Streptomyces</i>	5
1.2. <i>Porifera</i>	8
2. El estrés oxidativo	13
2.1. <i>Especies reactivas de oxígeno</i>	13
2.2. <i>Defensas antioxidantes</i>	15
2.3. <i>La ruta Nrf2-ARE: activación de las defensas antioxidantes</i>	18
2.4. <i>La mitocondria y el estrés oxidativo</i>	20
2.5. <i>Envejecimiento, oxidación y patologías asociadas</i>	22
3. Enfermedades neurodegenerativas	25
3.1. <i>La enfermedad de Alzheimer</i>	27
3.2. <i>Patología de la EA</i>	29
3.3. <i>Estrategias terapéuticas</i>	37
Objetivo	45
Publicaciones	49
1. Mitigation of ROS insults by <i>Streptomyces</i> secondary metabolites in primary cortical neurons	53
2. <i>Spongionella</i> secondary metabolites protect mitochondrial function in cortical neurons against oxidative stress	65
3. Bromoalkaloids protect primary cortical neurons from induced oxidative stress	87
4. The <i>Streptomyces</i> metabolite anhydroexfoliamycin ameliorates hallmarks of Alzheimer's disease <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	97
5. Gracilins: <i>Spongionella</i> -derived promising compounds for Alzheimer disease	122
Discusión	145
Conclusiones	161
Bibliografía	165





# Introducción

## 1. Los compuestos marinos

El océano cubre las tres cuartas partes de la superficie de la Tierra y, a pesar de que esta extensión es mucho mayor que la terrestre, sigue siendo un gran desconocido y una gran fuente de recursos por explorar (Duarte 2010). Los ecosistemas marinos varían mucho, presentando distintas condiciones de temperatura, salinidad y luz que proporcionan una extraordinaria diversidad de organismos marinos. Estos recursos son utilizados por el hombre como fuente de alimentos, energía, nuevos materiales para la industria y como fuente de nuevos compuestos bioactivos con diferentes aplicaciones (Rocha-Santos and Duarte 2014). El interés de los científicos por estos productos marinos se ha ido incrementando en las últimas décadas y como resultado de ello el número de compuestos aislados a partir de organismos marinos ha aumentado de forma exponencial (Fig. 1) en los últimos años.

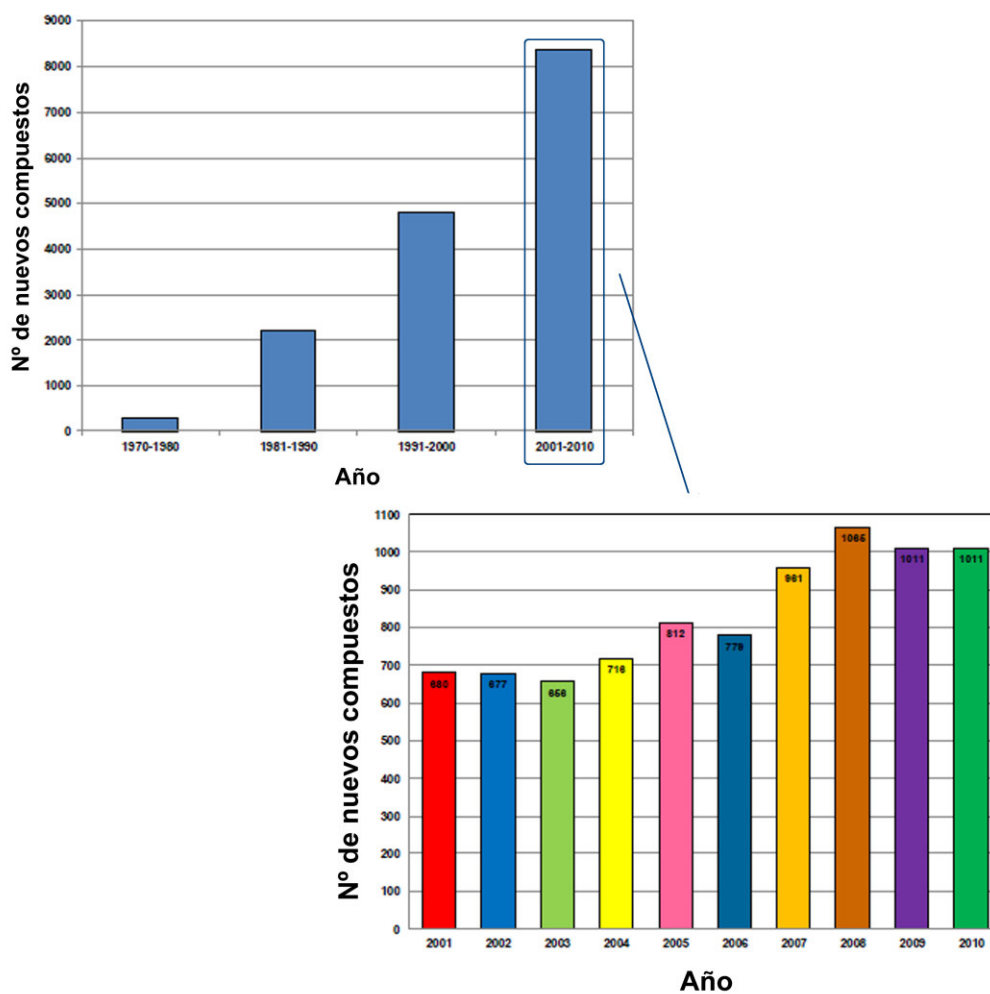


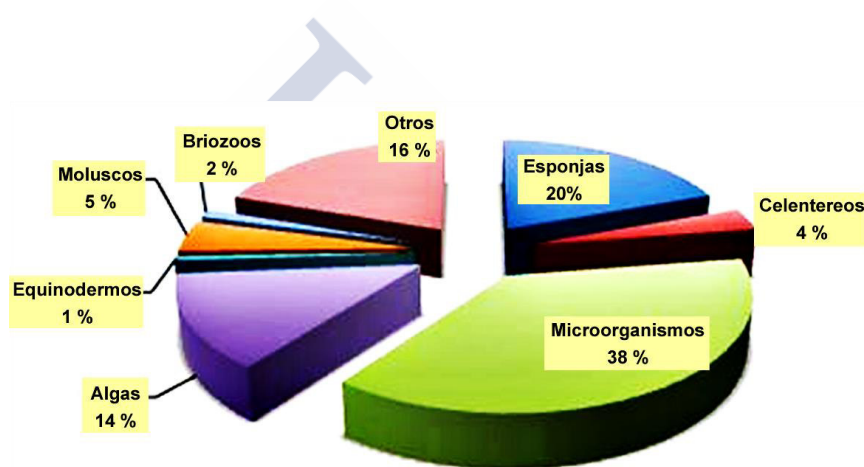
Figura 1. Compuestos marinos aislados entre 1970 y 2010 (Mehub, Lei et al. 2014)

Hasta 2010 se habían descubierto 15000 compuestos de origen marino, de los cuales 8368 se descubrieron entre 2001 y 2010 (Mehbub, Lei et al. 2014) y esta tendencia sigue en aumento con el registro de 1152 compuestos en 2011 (Blunt, Copp et al. 2013) y 1241 en 2012 (Blunt, Copp et al. 2014).

Este interés científico se ha traducido en la publicación de resúmenes anuales con la recopilación de los nuevos compuestos aislados (Blunt, Copp et al. 2003; Blunt, Copp et al. 2004; Blunt, Copp et al. 2005; Blunt, Copp et al. 2006; Blunt, Copp et al. 2007; Blunt, Copp et al. 2008; Blunt, Copp et al. 2009; Blunt, Copp et al. 2010; Blunt, Copp et al. 2011; Blunt, Copp et al. 2012; Blunt, Copp et al. 2013; Blunt, Copp et al. 2014), y aunque la aplicación de los compuestos marinos no es exclusivamente farmacéutica, este área de estudio se ha desarrollado enormemente. Estos compuestos se han descrito como anticancerígenos, antivirales, antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, inmunosupresores y neuroprotectores, entre otras aplicaciones terapéuticas. Y nuevamente todo ello ha sido reflejado en resúmenes bianuales dado el interés suscitado (Mayer and Lehmann 2001; Mayer and Hamann 2002; Mayer and Gustafson 2003; Mayer and Gustafson 2004; Mayer and Hamann 2004; Mayer and Hamann 2005; Mayer and Gustafson 2006; Mayer, Rodriguez et al. 2007; Mayer and Gustafson 2008; Mayer, Rodriguez et al. 2009; Mayer, Rodriguez et al. 2011; Mayer, Rodriguez et al. 2013). Este tipo de moléculas suponen un interesante punto de partida para el desarrollo de fármacos debido a la amplia variedad de estructuras que ofrecen los organismos marinos, cuyos mecanismos de acción pueden dar lugar a nuevos acercamientos terapéuticos. Además de la diversidad de estructuras, los organismos marinos nos ofrecen compuestos muy potentes, puesto que algunos de ellos son liberados en el agua y tienen que ser efectivos diluidos en el medio a muy bajas concentraciones (Rane, Sahu et al. 2014). Sin embargo, actualmente existen muy pocos fármacos de origen marino aprobados por la Food and Drugs Administration (FDA), apenas cuatro anticancerígenos, un antiviral, un fármaco para el control del dolor y otro para el tratamiento de la hipertrigliceridemia. Esta escasez de fármacos desarrollados a partir de compuestos de origen marino es debida a la dificultad para: (1) aislar y determinar la estructura de estos nuevos compuestos, (2) estudiar su mecanismo de acción concreto, (3) obtener cantidades suficientes para realizar las fases clínicas de los

estudios, (4) así como mejorar y estandarizar todo el proceso para su aplicación en la industria farmacéutica (Alonso and Rubiolo 2015).

No todos los organismos marinos aportan lo mismo en esta carrera por descubrir nuevos compuestos bioactivos. De 2001 a 2010, los filos Porifera y Cnidaria fueron los principales proveedores de compuestos de origen marino (Mehbub, Lei et al. 2014). Sin embargo, a partir de 2010 los cnidarios han sido desbancados por los microorganismos marinos que, como puede observarse en la figura 2, se han puesto a la cabeza aportando un 38% de los compuestos aislados y las esponjas se mantienen en segundo lugar contribuyendo con un 20% (Rocha-Santos and Duarte 2014).



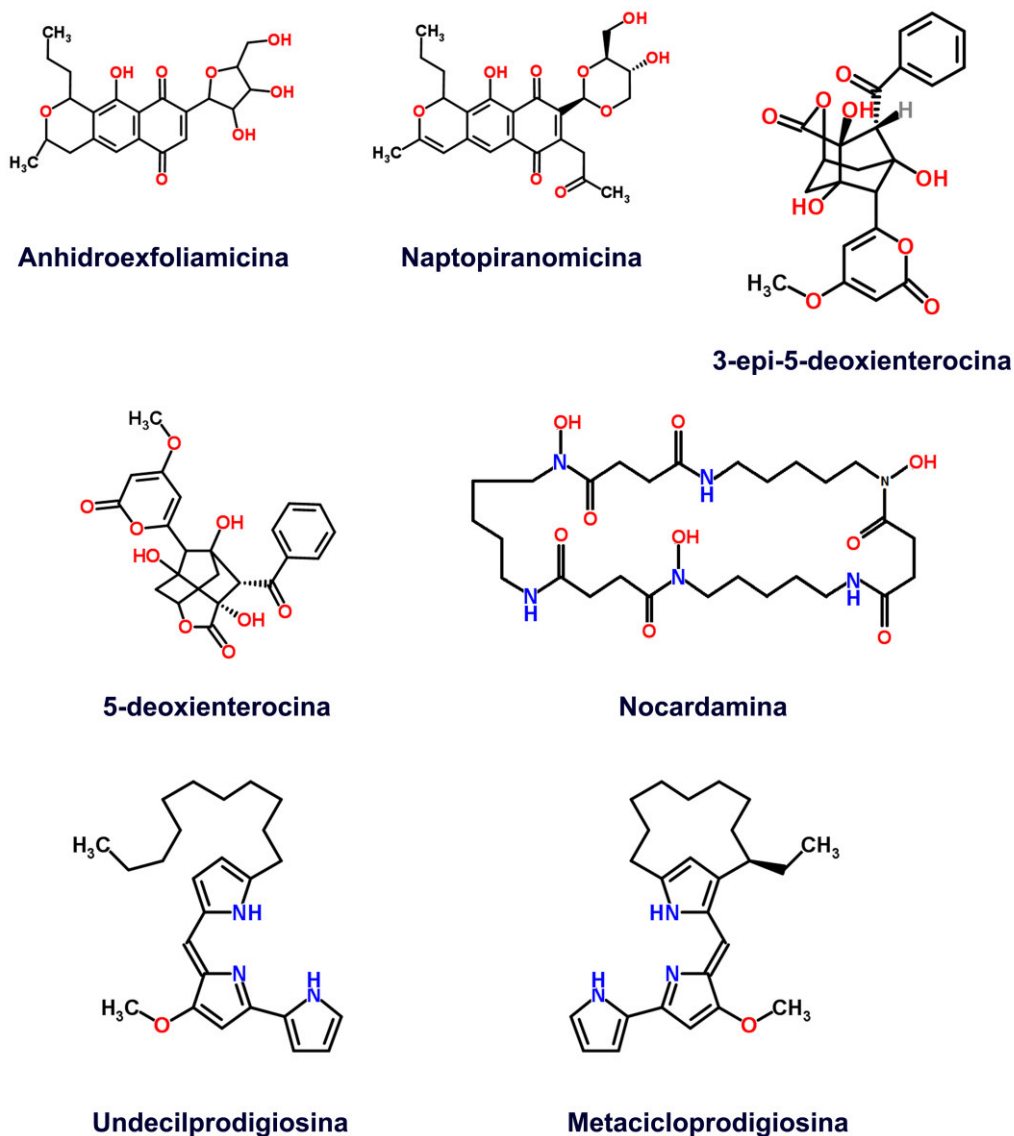
**Figura 2.** Porcentaje de organismos marinos utilizados en la investigación y aislamiento de nuevos compuestos bioactivos entre 2010 y 2013 (Rocha-Santos and Duarte 2014) .

En la presente Tesis Doctoral se estudian compuestos marinos derivados de microorganismos del género *Streptomyces* y de varios géneros de Porifera, por lo que a continuación nos centraremos en estos grupos.

### **1.1. *Streptomyces***

Este grupo de microorganismos, con más de 500 especies, conforman el género más grande de *Actinobacteria* y se caracterizan por ser bacterias filamentosas gram positivas. Las actinobacterias aportan el 45% de los metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de microorganismos y dentro de éstos el género *Streptomyces* contribuye con el 80% de los compuestos activos aislados. Esta capacidad para producir una amplia

variedad de metabolitos secundarios ha resultado ser una fuente de compuestos con gran potencial terapéutico dando lugar a antimicrobianos, anticancerígenos, antitumorales, anti-inflamatorios, anti-maláricos, antivirales y compuestos anti-angiogénesis entre otros (Goodfellow and Fiedler 2010).



**Figura 3.** Compuestos derivados de *Streptomyces* utilizados en la presente Tesis Doctoral.

A continuación se describen los 7 metabolitos secundarios derivados de *Streptomyces* (Fig. 3) que se han estudiado en la presente Tesis Doctoral: la anhidroexfoliamicina, la naptopiranomicina, la 3-epi-5-deoxinterocina, la 5-deoxinterocina, la nocardamina, la undecilprodigiosina y la metacicloprodigiosina.

- *Anhidroexfoliamicina y naptopiranicina*

Estos dos metabolitos secundarios son naftoquinonas, un grupo químico de compuestos que agrupa a pigmentos en el rango de colores entre el rojo y el amarillo. Se caracterizan por una estructura cíclica derivada del naftaleno que presenta dos anillos aromáticos, de los cuales uno de ellos presenta dos grupos funcionales carbonilo en posición 1,4. Este tipo de compuestos han demostrado ser biológicamente activos y se han descrito como agentes antibacterianos, anticancerígenos, antipalúdicos y antifúngicos (Cantú González, Palomo Ligas et al. 2013). Concretamente, algunos derivados de la exfoliamicina son inhibidores de la unión de la proteína activadora 1 (AP-1) y por tanto poseen propiedades anti-inflamatorias (Goto, Masegi et al. 1998; Naruse, Goto et al. 1998). Por último, los compuestos anhidroexfoliamicina y naptopiranicina también han sido descritos como antibióticos (Potterat, Zahner et al. 1993).

- *3-epi-5-deoxienterocina, 5-deoxienterocina, nocardamina, undecilprodigiosina y metacicloprodigiosina*

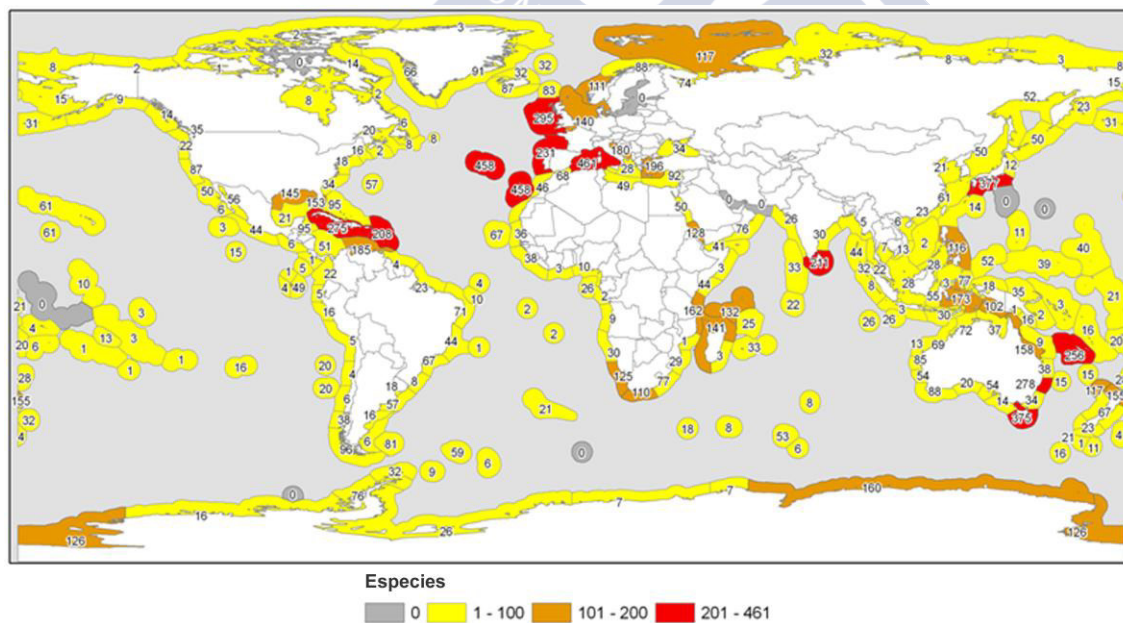
Estos cinco compuestos provienen del desierto de Atacama. Este desierto tiene 150 millones de años de historia y presenta muestras de yeso en sus alrededores, lo que indica que antiguamente estuvo cubierto por el océano puesto que este mineral calizo no se forma en los desiertos sino en el agua (Olivares 2011). El desierto de Atacama se caracteriza por unas condiciones extremas de aridez y salinidad, altos niveles de radiación ultravioleta, presencia de oxidantes y muy bajas concentraciones de carbono. En tan adversas condiciones, los únicos seres vivos capaces de sobrevivir son los microorganismos, proporcionando metabolitos únicos muy interesantes (Rateb, Housen et al. 2011). Los compuestos 3-epi-5-deoxienterocina y 5-deoxienterocina (Fig. 3) son policétidos de los que apenas hay información publicada hasta el momento, mientras que la nocardamina (Fig.3), también llamada deferroxamina E, ha sido previamente estudiada y se ha descrito como antibiótico, antimicrobiano, antitumoral y agente quelante de hierro y aluminio (Kalinovskaya, Romanenko et al. 2011).

Por otro lado, la undecilprodigiosina y la metacicloprodigiosina (Fig. 3) pertenecen a la familia de compuestos nombrados como “prodigiosinas”, caracterizadas por ser

pigmentos rojos con una estructura singular formada por tres anillos pirrólicos, de los cuales dos están unidos directamente y un tercero se une mediante un puente de meteno y se diferencian entre ellos fundamentalmente en la cadena lateral de alquilo. Esta familia de compuestos se han descrito como antibacterianos, antipalúdicos, antitumorales e inmunosupresores (Pandey, Chander et al. 2007). Además actúan a nivel de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) inhibiéndolas y siendo capaces de activar el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) en macrófagos (Huh, Yim et al. 2007), por lo que podrían ser compuestos interesantes para el tratamiento de la inflamación en enfermedades neurodegenerativas (Munoz and Ammit 2010).

## 1.2. Porifera

Las esponjas son organismos multicelulares invertebrados pertenecientes al phylum Porifera. Estos animales sésiles son exclusivamente acuáticos y poseen una estructura simple formada por una red de canales a través de los cuales filtran agua para alimentarse de partículas y microorganismos (Thomas, Kavlekar et al. 2010).



**Figura 4.** Distribución global de esponjas (Van Soest, Boury-Esnault et al. 2012).

La amplia distribución global de estos organismos sésiles (Fig. 4) implica una gran capacidad de adaptación a las distintas condiciones de luz, salinidad, presión y



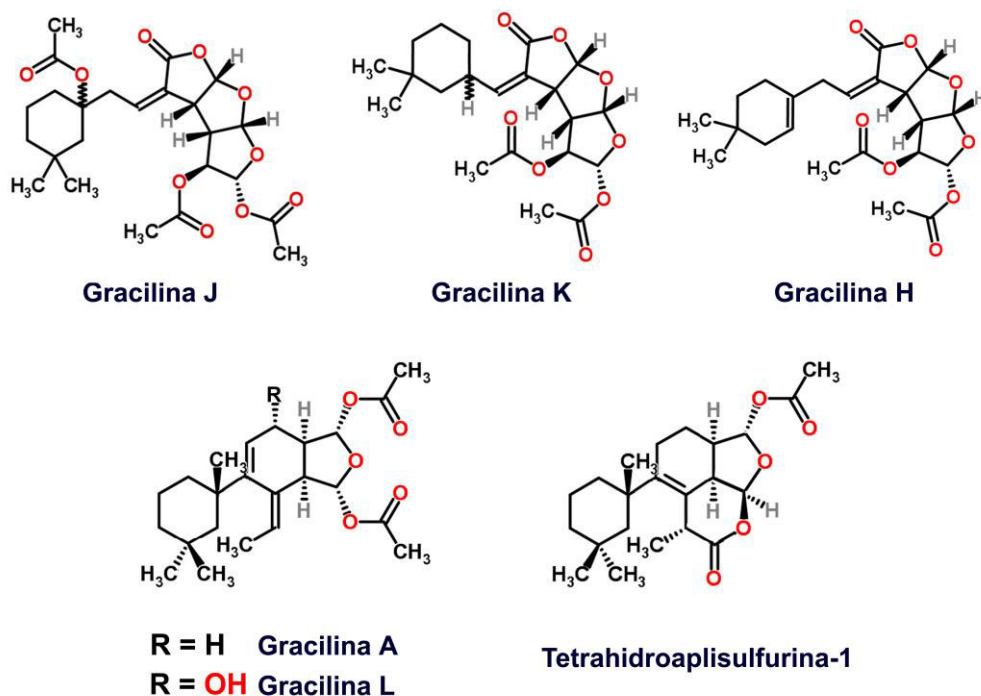
temperatura, generando una enorme diversidad de especies. Existe una base de datos online, “The World Porifera Database”, que trata de recopilar todas las especies de esponjas registradas de forma actualizada (Van Soest, Boury-Esnault et al. 2012) y que forma parte de “World Register of Marine Species”, un proyecto global de registro de todos los organismos marinos. Actualmente esta base de datos de Porifera contiene 9653 especies aceptadas de esponjas marinas (Van Soest, Boury-Esnault et al. 2014). Debido a su condición de animales sésiles, estos organismos producen numerosos metabolitos secundarios para sobrevivir, algunos de los cuales tienen propósito defensivo para protegerse de los ataques de los predadores, las infecciones microbianas, la contaminación biológica o la invasión por el crecimiento masivo de otros organismos sésiles. Por ello, muchos de los compuestos aislados a partir de esponjas han demostrado ser bioactivos en un amplio rango de áreas terapéuticas que van desde efectos beneficiosos en enfermedades neurodegenerativas a su actuación como antivirales, anti-inflamatorios, antibacterianos, antifúngicos, antipalúdicos, anticancerígenos o antituberculosos (Mehbub, Lei et al. 2014). En esta Tesis Doctoral se han analizado los efectos de 8 estructuras derivadas de esponjas que presentamos en dos familias de compuestos: la familia de las gracilinas y la familia de himenialdisina.

- *Gracilinas*

De todos los compuestos de la familia de las gracilinas nos centraremos en las gracilinas J, K, H, A y L y la tetrahidroaplisulfurina-1, los cuales son norditerpenos aislados a partir de esponjas del género *Spongionella* (Fig. 5). El primer compuesto registrado con esta estructura fue la gracilina A obtenido a partir de muestras de la *Spongionella gracilis* del mar Mediterráneo en el año 1985 por L. Mayol et al., sin embargo la gracilina B, aislada por el mismo grupo, fue la primera en aparecer en la literatura (Keyzers, Northcote et al. 2006). Estos compuestos se conocen desde hace 30 años y por tanto se ha investigado algunas de sus posibles aplicaciones y su mecanismo de acción, por lo que sabemos que son moléculas con un gran potencial para la investigación farmacológica. La gracilina A y la apsisulfurina 1 se han descrito como inhibidores de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), enzima que actúa en los procesos de inflamación e intoxicación por algunos venenos de insectos y serpientes. Su mecanismo de acción es a través de la interacción directa con los



aminoácidos del centro activo de esta fosfolipasa y con los iones de calcio necesarios para su funcionamiento, lo que marca a estos compuestos como posibles agentes anti-inflamatorios y potenciales antídotos (Nirmal, Praba et al. 2008).



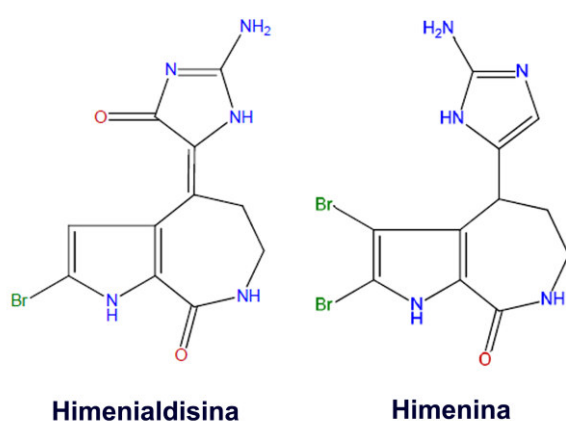
**Figura 5.** Estructura de los compuestos derivados de *Spongionella*.

Por su parte, la poca información existente sobre las gracilinas J, K, H y L las describe como citotóxicas en dos líneas tumorales, las K562 de leucemia mieloide crónica humana y las PBMC de células mononucleares de sangre periférica humana. Además inhiben el receptor tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), siendo la más potente la gracilina L y la menos activa la gracilina K, lo que apunta a una posible aplicación terapéutica como anticancerígenos (Rateb, Housen et al. 2009).

- *Himentialdisina e himenina*

La himentialdisina y la himenina poseen una estructura muy singular (Fig. 6). Ambos compuestos poseen una fórmula química caracterizada por presentar once carbonos y cinco nitrógenos, contener una guanidina y un pirrol bicíclico condensado y bromado (Xu Yz, Yakushijin et al. 1997). Pertenecen a una clase de metabolitos secundarios de esponjas conocidos como alcaloides bromopirrólicos que han resultado tener un amplio

espectro de propiedades terapéuticas como antibacterianos, antifúngicos, antipalúdicos, antivirales, antiinflamatorios y anticancerígenos entre otras aplicaciones (Rane, Sahu et al. 2014). La diferencia principal entre estas dos moléculas reside en que la himenialdisina posee un solo bromo y la himenina dos, siendo este elemento una incorporación de los metabolitos secundarios de origen marino que aporta una mayor singularidad a estas estructuras, frente a los compuestos derivados de organismos terrestres en los que raramente encontramos bromo (Glaser and Mayer 2009).



**Figura 6.** Estructuras de los compuestos himenialdisina e himenina.

La himenialdisina se ha descrito como inhibidor del factor de transcripción NF- $\kappa$ B lo que produce una disminución de varias citoquinas relacionadas con los procesos inflamatorios como los factores de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 2 (IL-2) y la IL-8, y por lo tanto se considera un potencial agente antiinflamatorio (D'Orazio, Gammone et al. 2012). También inhibe las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), la glucógeno sintasa cinasa-3beta (GSK3b) y la caseína cinasa 1. La CDK5 y la GSK3b participan en la hiperfosforilación de tau que tiene lugar en la patología de Alzheimer, por lo que la inhibición de estas cinasas reduce los niveles de tau fosforilada *in vitro*. Todo ello, da a la himenialdisina un gran potencial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Meijer, Thunnissen et al. 2000). Sin embargo, la himenina tiene actividad antibacteriana contra *E. coli* y *B. subtilis*, además de ser un bloqueante de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Rane, Sahu et al. 2014), los cuales son utilizados para regular la presión sanguínea y se administran conjuntamente con diuréticos,  $\beta$ -bloqueantes, calcioantagonistas o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina para el

tratamiento de la hipertensión o de la hipertrofia benigna de próstata (Wilt and N'Dow 2008; Grimm and Flack 2011; Ureña, Dalfó et al. 2011).

Teniendo en cuenta el gran potencial de los compuestos de origen marino y concretamente los presentados hasta el momento en esta Tesis Doctoral, se decidió llevar a cabo un estudio de su posible aplicación terapéutica en el área de las enfermedades neurodegenerativas. Se inició dicho estudio analizando las capacidades neuroprotectoras y antioxidantes de estos compuestos en un modelo celular de estrés oxidativo, dada la estrecha relación que existe entre el estrés oxidativo y este tipo de enfermedades que será descrita exhaustivamente en los apartados siguientes de esta introducción.



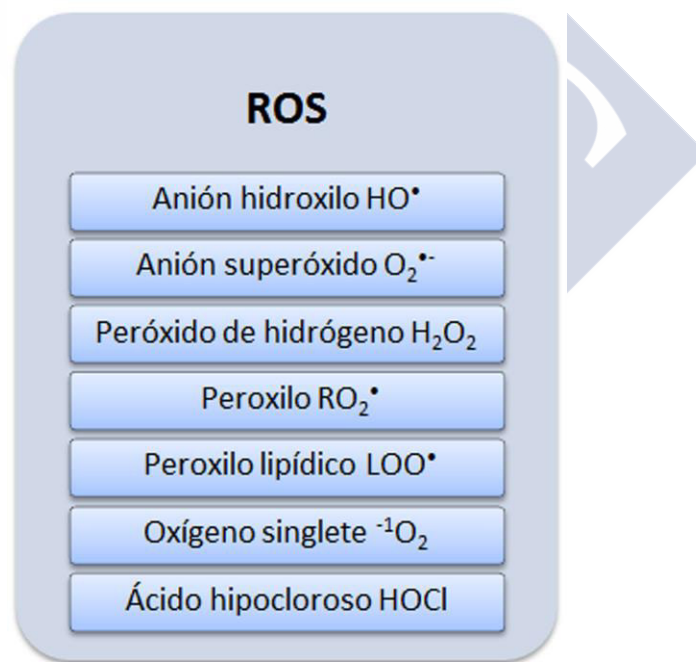
## 2. El estrés oxidativo

El oxígeno es una molécula fundamental para la vida que, a excepción de un pequeño número de bacterias anaerobias, todos los organismos vivos utilizan para producir energía para su funcionamiento normal. Dicha producción de energía requiere procesos de oxidación por parte de los organismos, lo que significa que se produce una pérdida de electrones. En los organismos anaeróbicos, los electrones son absorbidos por hidrógeno, pero en los organismos aerobios, la pérdida de electrones es mucho más eficiente gracias a la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Sin embargo, como veremos a continuación, la molécula del oxígeno es un arma de doble filo puesto que el potencial de la misma para oxidar otras moléculas hace que también sea tóxico (Magder 2006). El metabolismo del oxígeno está basado en reacciones de oxidación que consisten en la pérdida de electrones, la captación de oxígeno o cesión de hidrógeno y que conllevan la reducción de otra molécula. En condiciones fisiológicas, estos procesos están controlados, sin embargo se pueden desencadenar procesos patológicos al producirse desequilibrios entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes de la célula, lo que se conoce como estrés oxidativo (EO) (Elejalde Guerra 2001). Como consecuencia del desequilibrio de esta balanza oxidativa se produce un aumento de las ROS que reaccionarán con proteínas, lípidos, ADN y ARN ocasionando daño celular (Elejalde Guerra 2001; Gandhi and Abramov 2012). La elevación de las ROS puede ser debida a causas endógenas como los procesos inflamatorios, la elevación de la concentración de  $O_2$  o la disfunción mitocondrial, pero también por daños exógenos originados por la contaminación ambiental, el ejercicio extremo, la mala nutrición, el tabaquismo, etc. Por otro lado, la disminución de las defensas antioxidantes en las células se produce como consecuencia de la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas o por la merma de antioxidantes exógenos, ya sea por la disminución en la ingesta o por problemas en su absorción (Poljsak, Suput et al. 2013).

### **2.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Las ROS, también llamadas radicales libres, son moléculas o fragmentos de moléculas derivadas del oxígeno molecular ( $O_2$ ) (Fig. 7) que presentan uno o más electrones

desapareados por lo que son altamente reactivas (Jomova, Vondrakova et al. 2010). Las principales ROS relacionadas con los procesos neurodegenerativos son el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el anión hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ). La reducción del  $O_2$  perdiendo un electrón da lugar a  $O_2^{\bullet-}$  que además de ser una ROS es un precursor de la formación de muchas de las otras ROS y mediador en reacciones de EO, puesto que se convierte en  $H_2O_2$  de forma espontánea o catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Turrens 2003). A su vez, el  $H_2O_2$  es una molécula de vida media corta, muy soluble y que en fase acuosa se disocia dando lugar a  $HO^{\bullet}$  y  $O_2^{\bullet-}$ . Estos radicales son notablemente energéticos y poseen la capacidad de producir daños celulares (Triana-Vidal and Carvajal-Varona 2013). A pesar de esto, las ROS aparecen vinculadas también a reacciones metabólicas normales de las células, intervienen en la señalización celular y por tanto son necesarias para su funcionamiento normal. Los daños producidos por las mismas solamente aparecen al romperse el equilibrio redox y aumentar sus niveles de forma incontrolada (Finkel 2003).



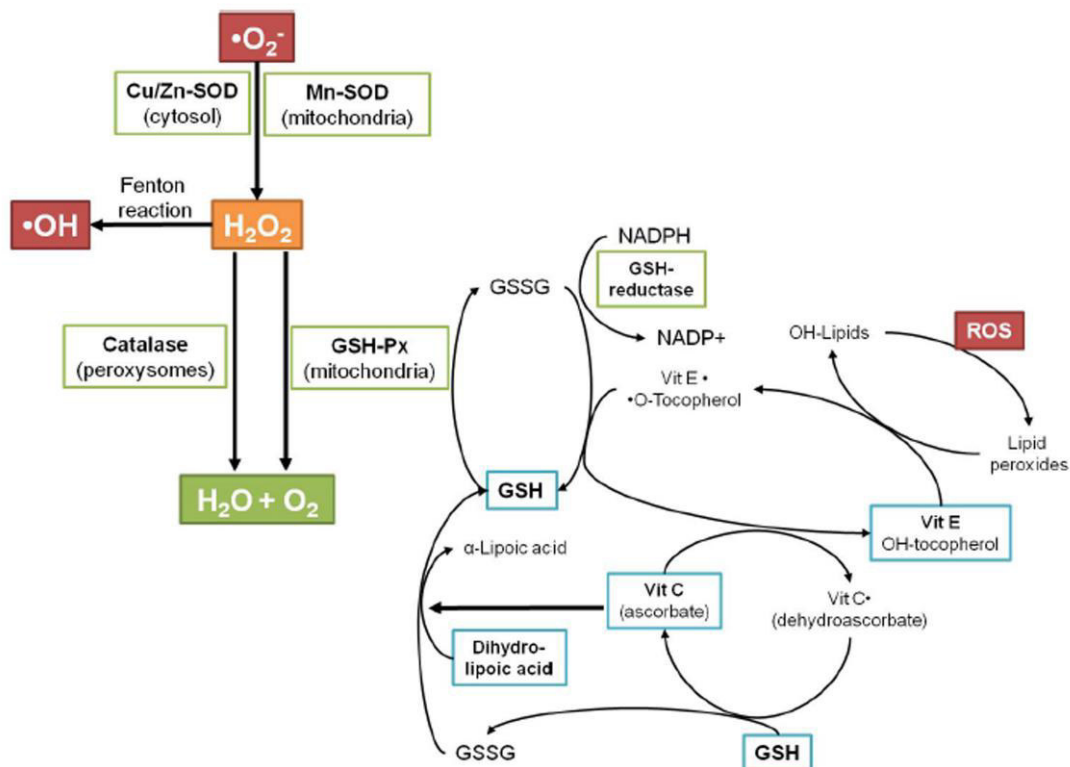
**Figura 7.** ROS encontradas en tejidos normales y patológicos (Mugoni and Santoro 2013).

Aunque no son objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, también existen especies reactivas de nitrógeno (RNS), las cuales tienen un gran potencial oxidante y están igualmente involucradas en los procesos de estrés oxidativo. No obstante, como

su nombre indica, las RNS se diferencian de las ROS por contener nitrógeno en su formulación. Las principales RNS son el óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). El  $\text{NO}^\bullet$  juega un papel crucial en varios procesos fisiológicos pero, al igual que las ROS, reacciona con otras moléculas y radicales en procesos oxidativos e inflamatorios. De hecho, el  $\text{NO}^\bullet$  reacciona con el anión  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para dar lugar a  $\text{ONOO}^-$  y aunque es una reacción necesaria para el mantenimiento del equilibrio redox que da lugar a la eliminación del  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , el  $\text{ONOO}^-$  es un agente oxidante muy potente capaz de dañar el ADN y peroxidar lípidos y proteínas (Bansal and Kaushal 2014).

## 2.2. Defensas antioxidantes

Las células para evitar sufrir EO cuentan con sistemas de protección que comprenden moléculas antioxidantes endógenas o adquiridas en la dieta y enzimas antioxidantes (Fig. 8).



**Figura 8.** Defensas frente al estrés oxidativo (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía 2013).

**2.2.1.** Las **defensas antioxidantes no enzimáticas** reaccionan directamente con los agentes oxidantes y los inactivan (Davies 2000). Algunos de estos compuestos, de bajo peso molecular, son las vitaminas C y E, los  $\beta$ -carotenos, el ácido úrico y el glutatión (GSH).

- La vitamina C o ácido ascórbico actúa extracelular e intracelularmente eliminando directamente las ROS en las fases acuosas y transforma nuevamente en vitamina E los radicales libres derivados de la misma. Se ha observado que sus niveles en plasma disminuyen con la edad.
- La vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol es soluble en lípidos y se encuentra principalmente en el interior de la membrana celular proporcionándole protección frente a la peroxidación lipídica. El  $\alpha$ -tocoferol, usado como sinónimo de la vitamina E, en realidad es su forma más activa y el principal antioxidante unido a la membrana celular.
- El tripéptido GSH destaca dentro de las moléculas antioxidantes. Este tiol es capaz de reducir el  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$ , pero además actúa como cofactor de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión transferasa (Birben, Sahiner et al. 2012). En condiciones normales los niveles de GSH son entre 10 y 100 veces superiores a los niveles de sus formas oxidadas (GSSG y GSSR). Por el contrario, en condiciones de EO los niveles de GSH disminuyen al reaccionar con las ROS, lo que da lugar a la eliminación de las ROS y la formación glutatión oxidado. Estas formas oxidadas resultantes, que se caracterizan por tener un enlace disulfuro entre dos moléculas de GSH, son de nuevo reducidas a GSH por la glutatión reductasa dependiente de NADPH y el sistema tiorredoxina/glutarredoxina de manera eficiente, devolviendo a las células a niveles normales de glutatión. Por ello, el tripéptido GSH y los sistemas enzimáticos relacionados con esta molécula antioxidante son herramientas eficaces en la desintoxicación de las células frente a daños oxidativos y la disminución de los niveles de GSH se considera un indicador de EO (Aquilano, Baldelli et al. 2014).

**2.2.2.** Las principales **defensas antioxidantes enzimáticas** son la SOD, la catalasa (CAT) y las peroxidasa (Px). La SOD cataliza la reacción de  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  que posteriormente es transformado por la CAT y la glutatión peroxidasa (GPx).

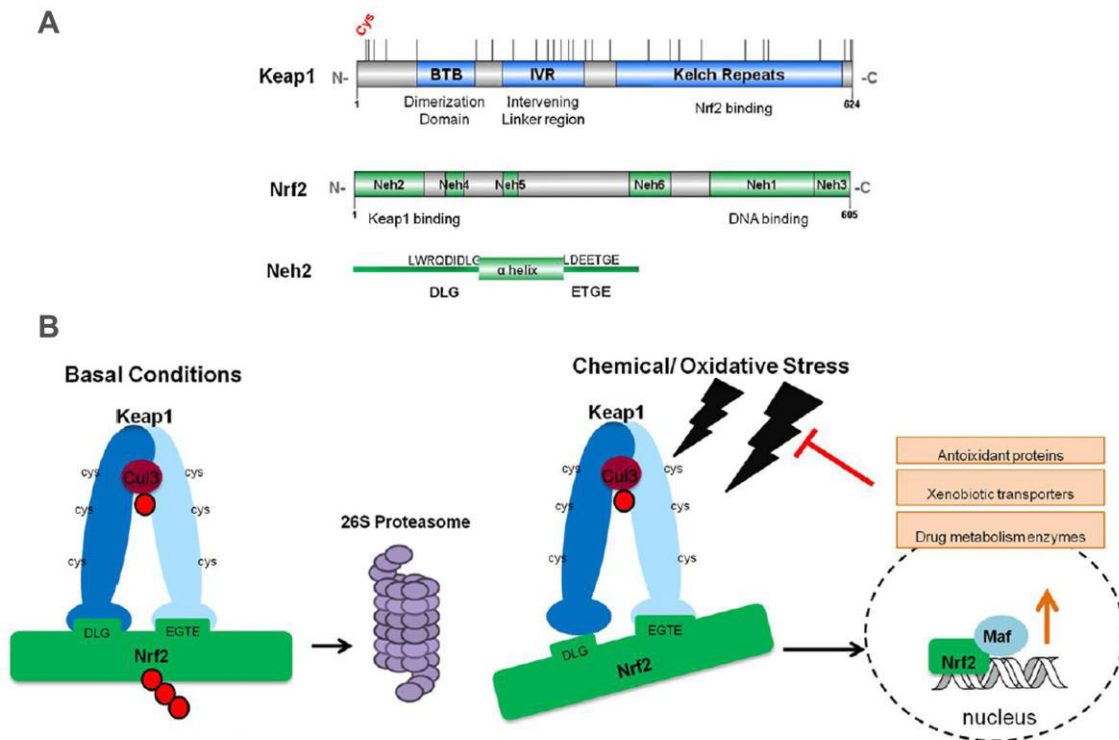
- Superóxido dismutasa (SOD): Existen cuatro tipos de SOD según los cofactores que tengan (cobre y zinc, manganeso, hierro y níquel) y su distinta localización. Así, las Cu/ZnSODs se localizan en el citosol de eucariotas, en los cloroplastos y en algunos procariontes, las MnSODs son típicas de los procariontes y las mitocondrias, las FeSODs se encuentran en las algas, en los cloroplastos de algunas plantas superiores y en los procariontes, y por último las NiSODs que están presentes en los *Streptomyces*. El  $H_2O_2$  que resulta de la actividad de la SOD es metabolizado por la CAT, cuando éste se encuentra a elevadas concentraciones, o por la Px, si sus niveles son bajos.
- Catalasa (CAT): La catalasa es un tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas de 60 kDa de masa molecular. Cada subunidad contiene un grupo hemo llamado ferriprotoporfirina IX que se encuentra en el sitio activo. Este centro catalítico está situado en el interior de la molécula y solamente es accesible por un pasillo que se estrecha, lo que explica por qué esta enzima sólo es capaz de usar sustratos de pequeño tamaño (Kirkman and Gaetani 2007). La CAT trabaja de forma coordinada con la SOD y es capaz de descomponer el  $H_2O_2$  rápidamente. Sin embargo, la CAT presenta baja afinidad por esta molécula por lo que es más útil durante los picos de la producción o acumulación de  $H_2O_2$  (Scandalios 2005).
- Glutatión peroxidasa (GPx): La GPx presenta formas dependientes y no dependientes de selenio. Es una enzima que actúa de forma complementaria a la catalasa, descomponiendo el  $H_2O_2$  lentamente, pero la GPx tiene mayor afinidad por  $H_2O_2$ . Así, esta enzima se encarga de descomponer las pequeñas cantidades de peróxido que se producen de forma continua en las células. Como se mencionaba anteriormente, estas enzimas utilizan la forma reducida de GSH y de otros tioles como la tioredoxina para descomponer el peróxido (Pamplona and Costantini 2011).



### **2.3. La ruta Nrf2-ARE: activación de las defensas antioxidantes**

La principal vía de activación de las defensas antioxidantes es la ruta del factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) y el elemento de respuesta antioxidante (ARE). El Nrf2 es un factor de transcripción responsable de la activación de genes para la protección celular en respuesta al EO y ARE corresponde a la región de ADN que facilita la expresión de estos genes de protección y detoxificación de la fase II como son las enzimas SOD, la CAT, la sulfiredoxina, la tiorredoxina o las proteínas relacionadas con el metabolismo del GSH (Gan and Johnson 2014). Para que esta ruta se active es necesario que el Nrf2 se libere de la proteína 1 asociada con la proteína reguladora Kelch (Keap1). A continuación describiremos brevemente la estructura de estos tres elementos: Nrf2, Keap1 y ARE.

- **Nrf2**: El factor de transcripción Nrf2 contiene seis dominios proteicos llamados Neh (Fig. 9A – Nrf2). Cuando el Nrf2 se encuentra en el núcleo, el dominio Neh1 se une al ADN en la región ARE y los dominios Neh4/5 producen un aumento de la expresión génica en dicha región. Por otro lado, el dominio Neh2 es el responsable de la unión a Keap1.
- **Keap1**: La proteína Keap1 presenta varios dominios funcionales, como son el tramtrack y el bric-a-brac (BTB), el dominio enlazador de intervención (IVR) y la repetición de doble glicina/Kelch y la región C-terminal (Fig. 9A – Keap). El BTB es la responsable de la dimerización de dos moléculas Keap1 mientras que las repeticiones Kelch contienen la región responsable de la unión a Nrf2 a través de residuos de arginina y residuos reactivos de cisteína (Bryan, Olayanju et al. 2013).
- **ARE**: La región ARE es una secuencia cis, es decir, no codifica ningún gen pero se encuentra flanqueando a otros genes a los que regula, en este caso se trata de genes que codifican enzimas de la fase II de detoxificación. La secuencia central de la ARE ha sido identificada como TGACnnnGC y se sabe que varios factores de transcripción, como el Nrf2, heterodimerizan con pequeñas proteínas de la familia Maf para unirse a ella y activar la expresión proteica de los genes responsables de la defensa antioxidante (Kwak, Itoh et al. 2002).



**Figura 9.** Ruta antioxidante Nrf2-ARE. (A) Esquema de los dominios estructurales de las proteínas Nrf2 y Keap1. (B) En condiciones basales Nrf2 es degradado, pero en situaciones de estrés oxidativo activa la transcripción de genes para la defensa antioxidante celular codificados en ARE (Bryan, Olayanju et al. 2013).

En condiciones basales, el Nrf2 aparece en el citosol unido a Keap1 formando el complejo Nrf2-Keap1 que, como mencionábamos, facilita la ubiquitinación de Nrf2 y su posterior degradación en el proteosoma. Sin embargo, en situaciones de EO esta unión se desestabiliza por la acción de las ROS y el Nrf2 se transloca al núcleo (Fig. 9B). Este factor de transcripción posee una región C-terminal en cierre de leucinas o “basic-leucine zipper” (bZip) responsable de su unión al ADN, una región “cap’n’collar” altamente conservada pero de función desconocida y una región amino-terminal que se encarga de la activación transcripcional. Cuando el Nrf2 se encuentra en el núcleo, éste se une a las proteínas Maf que facilitan su unión al ADN a través de la región bZip, activando así la transcripción de los genes de la región ARE (Mitsuishi, Motohashi et al. 2012).

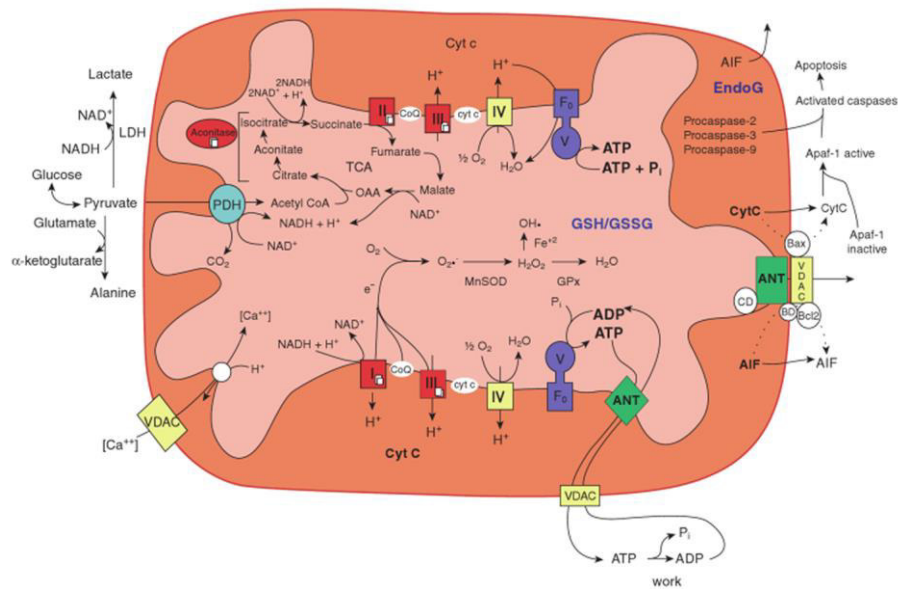
Dado que la activación de la vía Nrf2-ARE supone un aumento de las defensas antioxidantes celulares, esta ruta ha sido propuesta como diana terapéutica en el tratamiento de varias enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, en especial las

enfermedades neurodegenerativas. En esta área varios compuestos aislados a partir de productos naturales se han descrito como inductores del Nrf2 y han demostrado tener eficacia en modelos de trastornos neurológicos tanto *in vivo* como *in vitro*. En el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA), los pacientes muestran una reducción dramática en los niveles nucleares de Nrf2 en las neuronas del hipocampo y, asimismo, el empleo de adenovirus para la sobreexpresión de Nrf2 o el aumento de los niveles de Nrf2 mediante inductores han demostrado tener efectos neuroprotectores en modelos experimentales de Alzheimer (Kumar, Kim et al. 2014).

#### **2.4. La mitocondria y el estrés oxidativo**

La mitocondria es el principal productor de energía de la célula gracias a la fosforilación oxidativa. Las mitocondrias constan de dos membranas, una interna y otra externa. En la membrana interna se incluyen los complejos de la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa encargados de la fosforilación oxidativa y por tanto fuente principal de las ROS (Fig.10) (Chen 2013). La cadena de transporte de electrones está compuesta por cuatro complejos de proteínas grandes llamados NADH-deshidrogenasa (complejo I), succinato-deshidrogenasa (complejo II), citocromo c reductasa (complejo III) y citocromo c oxidasa (complejo IV). Además, existen dos componentes independientes de menor tamaño, la ubiquinona y el citocromo c (Cyt c), que conectan el paso de los electrones entre los complejos. En esta cadena, los electrones son transportados de un complejo a otro y con la energía liberada en este proceso se bombean protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana que serán usados por la ATP sintasa para producir energía en forma de ATP. El oxígeno es el aceptor final de los electrones que pasan por los distintos complejos de la cadena de transporte de electrones que en el complejo IV se reduce a dos moléculas de agua gracias a cuatro electrones. La generación de  $O_2^{\bullet-}$  en las células se debe fundamentalmente a la fuga de electrones de la cadena de transporte que en condiciones fisiológicas normales van a ser eliminadas por la MnSOD y el resto de defensas antioxidantes explicadas anteriormente. Sin embargo, en condiciones patológicas estos procesos aumentan dando lugar a una disfunción mitocondrial que como consecuencia produce la paralización de la

producción de energía y la elevación de los niveles de las ROS desencadenando todos los procesos del EO (Chen 2013).



**Figura 10.** La mitocondria: relación de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa con el estrés oxidativo y la apoptosis (Chen 2013).

En la membrana mitocondrial nos encontramos el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) que de forma clásica se presenta como un complejo formado por la ciclofilina D (CD), el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), aunque su estructura exacta todavía no se conoce y se sospecha que puede haber otros elementos involucrados tanto en su formación como en su regulación. En condiciones normales la inducción del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial permite el tráfico no selectivo de pequeñas partículas cargadas, agua y moléculas menores de 1.5 kDa entre la matriz mitocondrial y el citosol (Zorov, Juhaszova et al. 2009). Sin embargo el flujo de iones a través de este poro se ve afectado por el estrés oxidativo puesto que el aumento del calcio citosólico causado por las ROS va a producir una apertura prolongada del PPTM, dando lugar a una bajada del potencial de membrana mitocondrial. Como consecuencia de esta disminución de potencial se liberan al citoplasma factores inductores de la apoptosis, tales como Bax, Bad y Cyt c, lo que a su vez genera un aumento en la producción de ROS (Circu and Aw 2010). Concretamente, el Cyt c se une al factor de activación de la apoptosis 1 (Apaf1)

formando el apoptosoma responsable de la activación de la caspasa-9 que lleva a la activación de la cascada de caspasas, dando lugar a la apoptosis (Ola, Nawaz et al. 2011).

### 2.5. Envejecimiento, oxidación y patologías asociadas

El envejecimiento es un proceso de deterioro progresivo e intrínseco que afecta a todos los organismos vivos y se caracteriza por la disminución de: la síntesis de proteínas, la capacidad para reparar el ADN, la función inmune y de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Además, en organismos superiores se observa, entre otros fenómenos, la reducción de la densidad ósea y la pérdida de la masa muscular y la fuerza. En esencia, el envejecimiento es la acumulación progresiva de fallos moleculares dentro de las células y tejidos, dando lugar al desarrollo de patologías y finalmente la muerte (Poljsak and Milisav 2013).



**Figura 11.** Relacionando el EO con el envejecimiento (Cencioni, Spallotta et al. 2013).

El EO juega un papel crucial en el envejecimiento (Fig. 11) y se ha descrito como inductor de un considerable número de enfermedades relacionadas con la edad y enfermedades crónicas. Además los procesos de oxidación aumentan con el paso de los años lo que apoya su relación con el envejecimiento y en humanos se ha observado un aumento de

macromoléculas dañadas a consecuencia del EO relacionado con la vejez, mientras que variaciones en el genoma encargado de la modulación del EO tienen efectos sobre la longevidad (Wu, Hsiung et al. 2014).

Existen muchas hipótesis intentando explicar las causas y el desarrollo del envejecimiento. A menudo encontramos que estas teorías están relacionadas entre ellas, pues es un proceso multifactorial muy complejo y ninguna de ellas ha logrado explicarlo por completo. Algunas de estas teorías apuntan como posibles causantes del envejecimiento al acortamiento de los telómeros, la desregulación hormonal, la acumulación de daños a lo largo de la vida, la exposición a agentes estresantes o mutaciones pleiotrópicas que desencadenan daño celular. También existe una teoría basada en los radicales libres que posteriormente fue aumentada y complementada por las implicaciones de la mitocondria en la producción de los mismos. Este acercamiento, aparte de proponer el EO como inductor, habla del papel fundamental de la mitocondria en el envejecimiento ya que este orgánulo está continuamente expuesto a las ROS debido a que es el principal productor de las mismas. Esta exposición a oxidantes da lugar a daños en el ADN mitocondrial y un deterioro en los mecanismos moleculares que lleva a cabo la mitocondria y por tanto una disminución de energía que repercute en todo el organismo (Poljsak and Milisav 2013).



**Figura 12.** El estrés oxidativo está implicado en numerosas enfermedades humanas (Imagen obtenida de <http://www.neurogenol.co.uk/images/header.jpg>).

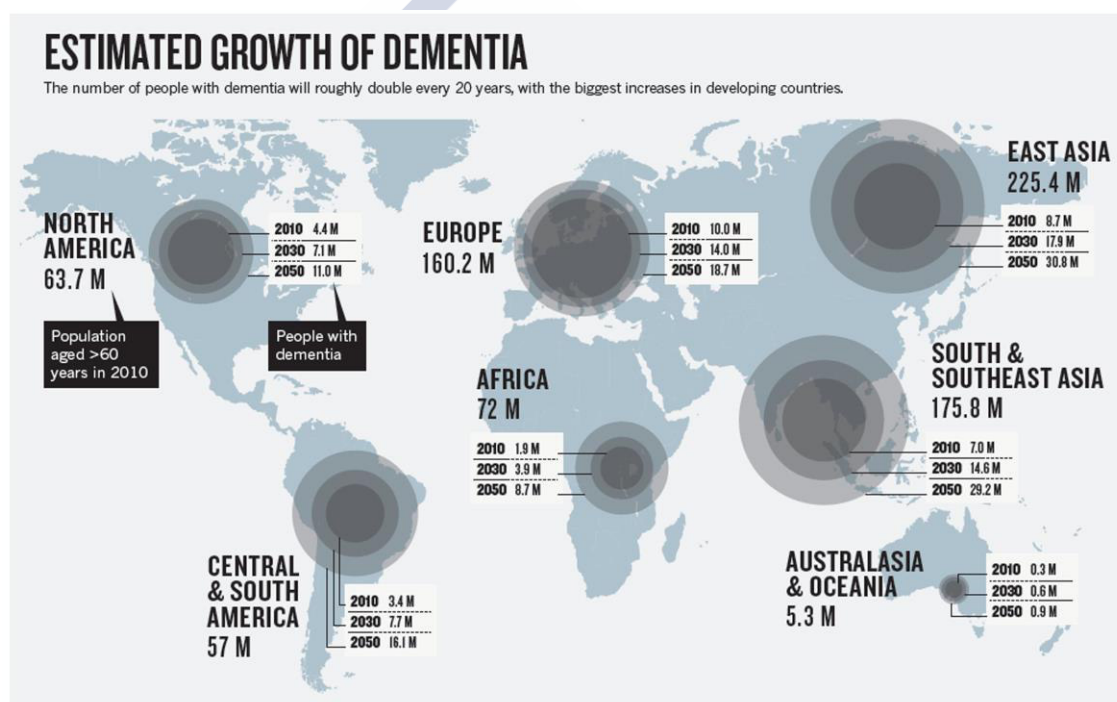


Al menos 200 patologías humanas tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, la diabetes y las enfermedades neurológicas entre otras se han relacionado con un aumento de los niveles del estrés oxidativo (Fig. 12) (Valko, Leibfritz et al. 2007(Valko, Leibfritz et al. 2007) y este proceso está vinculado con la aparición de fallos en la oxidación mitocondrial y la generación de la energía tan necesarias para el mantenimiento de la vida. Dado que las ROS son capaces de alterar casi cualquier vía metabólica a través del ataque a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, es razonable decir que la exposición a las ROS en sí misma podría causar una gran diversidad de enfermedades y que una terapia antioxidante sería un enfoque apropiado frente a ellas (Hybertson, Gao et al. 2011).

La relación entre las enfermedades neurodegenerativas y el estrés oxidativo es muy estrecha, en gran parte debido a la especial sensibilidad que presentan las células neuronales a la acción del estrés oxidativo por su elevado metabolismo energético, el alto contenido en lípidos y las escasas defensas antioxidantes (Wang and Michaelis 2010). Por ello, a continuación nos centraremos en dichas enfermedades, concretamente en la demencia tipo Alzheimer y las diferentes estrategias terapéuticas conocidas, haciendo especial hincapié en la terapia antioxidante.

### 3. Enfermedades Neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son uno de los mayores problemas de salud pública en la sociedad occidental actual. Los procesos de neurodegeneración están asociados con la edad y con una población cada vez más envejecida, suponen una enorme carga social y económica para las personas afectadas y sus familias, así como también un gran reto científico. La patología neurodegenerativa más frecuente es la enfermedad de Alzheimer (EA) que actualmente sufren entre 25 y 35 millones de personas en todo el mundo, siendo la principal causa de demencia en personas de edad media y avanzada. Se prevé que estos números se tripliquen en el año 2050 si no encontramos ningún tratamiento para prevenir o curar la EA (Iqbal, Kazim et al. 2014).



*Figura 13. Mapa de la previsión global de la incidencia del Alzheimer (Abbott 2011).*

Las patologías neurodegenerativas abarcan un gran número de enfermedades que se caracterizan por la pérdida de poblaciones específicas de neuronas que en función del sistema afectado darán lugar a diferentes presentaciones clínicas. Las bases moleculares de esta vulnerabilidad neuronal selectiva continúan siendo desconocidas, lo que dificulta el desarrollo de tratamientos específicos y eficaces y supone un desafío pendiente para los investigadores.



Algunas de las enfermedades neurodegenerativas más comunes son la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. Aun habiendo una gran diversidad clínica, este grupo de enfermedades tienen en común determinadas alteraciones del funcionamiento normal de las células, esenciales en el desarrollo de las patologías, como son el estrés oxidativo, la muerte celular programada y la modificación de los procesos de agregación y degradación de proteínas (Dickson and Weller 2012).

Cabe destacar que las enfermedades neurodegenerativas, el envejecimiento y el EO están íntimamente ligados, puesto que en los tres casos aparecen de forma progresiva fallos en el funcionamiento mitocondrial y un aumento de los niveles de las ROS, pero tanto en las enfermedades neurodegenerativas como en el EO estos procesos se acentúan considerablemente (Poljsak and Milisav 2013). De hecho, la atrofia cerebral que se produce en el envejecimiento saludable se extiende lentamente, sufriendo pérdidas del 0.2% del volumen cerebral anualmente, mientras que en patologías neurodegenerativas como el Alzheimer esta tasa llega al 0.41%, pudiendo alcanzar el 10% anual en regiones especialmente vulnerables como el hipocampo (Jahn 2013).

Como mencionamos anteriormente, las células del sistema nervioso central (SNC) son más susceptibles a los procesos de EO debido a que necesitan mucha energía para su funcionamiento normal. El cerebro consume entre el 20 y el 25% del oxígeno que utiliza el cuerpo humano, mientras que este órgano tan solo supone el 2% del peso total. Así pues, el elevado metabolismo de  $O_2$  mantenido por estas células aumenta la probabilidad de que se eleven los niveles de las ROS. Además, el alto contenido en fosfolípidos de estas células las hace más vulnerables a la peroxidación y los elevados niveles de hierro capaces de reaccionar con el oxígeno van a incrementar la producción de las ROS. Finalmente, aunque son células que sufren gran exposición al EO, tienen un sistema de defensa antioxidante relativamente pobre, incrementando así su susceptibilidad a estos procesos (Wang and Michaelis 2010; Li, O et al. 2013).

Existen muchas evidencias de la relación entre el EO y las patologías neurodegenerativas, sin embargo no está claro si podría ser la causa o es una consecuencia de las mismas. Las evidencias apuntan a que al menos el EO está

involucrado en la propagación de la enfermedad, pues se ha observado que las ROS están implicadas en la formación de proteínas aberrantes, como el beta-amiloide en Alzheimer o la alfa-sinucleína en el Parkinson, la activación de los procesos inflamatorios, la muerte celular programada y por supuesto la disfunción mitocondrial. Por ello, muchos científicos han centrado sus esfuerzos en el descubrimiento y desarrollo de compuestos capaces de frenar el EO a través de la inducción de las defensas antioxidantes endógenas o la emulación de las mismas para así intentar detener el avance de estas patologías degenerativas (Andersen 2004).

Actualmente, la enfermedad de Alzheimer es la patología neurodegenerativa más frecuente y de mayor relevancia socio-económica por lo que a continuación nos centraremos en ella describiendo sus fases clínicas, la patología y sus principales marcadores y finalmente las distintas estrategias terapéuticas que se están estudiando para el tratamiento de esta enfermedad.

### **3.1. La enfermedad de Alzheimer**

Esta demencia tiene como síntomas principales la pérdida de memoria y funciones corticales que conlleva un deterioro de las capacidades para llevar a cabo tareas cotidianas. Inicialmente las personas que la padecen suelen negar sus síntomas o minimizarlos y los familiares y médicos tienen dificultades para identificarla pues los primeros síntomas que aparecen suelen achacarse al envejecimiento normal. Este proceso de deterioro progresivo se ha dividido en varias fases clínicas según los síntomas y la evolución de los distintos indicadores de la enfermedad:

- Existe una **fase presintomática** en la que, como su propio nombre indica, no hay síntomas, pero sí riesgo de desarrollar la patología. Los individuos estudiados en esta fase presentan antecedentes familiares y por tanto mutaciones autosómicas dominantes para la enfermedad de Alzheimer y se ha detectado un menor nivel cognitivo en estas personas pero no lo suficientemente diferenciado como para ser utilizado en un diagnóstico.
- En la **fase de deterioro cognitivo leve** existen pruebas evidentes de la disminución en los niveles de cognición, pero la autonomía de los pacientes y su

capacidad para realizar las tareas diarias apenas se ve reducida (Dickson and Weller 2012). Se ha observado que los niveles de EO están aumentados, sin embargo ningún otro marcador típico de Alzheimer lo hace (Wang, Wang et al. 2014). Hay que destacar que sólo un 15% de los pacientes que sufren deterioro cognitivo leve acaban desarrollando la enfermedad de Alzheimer.

- Una vez diagnosticada clínicamente la **enfermedad de Alzheimer**, ésta se puede dividir en tres estadios según el avance de los síntomas. En la fase leve de la enfermedad el paciente presenta pérdida de la memoria reciente pero la memoria de acontecimientos pasados está mínimamente afectada. Además sufren deterioro cognitivo, cambios en la personalidad y dificultades en las actividades cotidianas. A medida que la enfermedad avanza sus efectos van en aumento y en la fase moderada los enfermos dependen de otras personas para realizar tareas cotidianas como bañarse o vestirse y padecen habitualmente alucinaciones, paranoia e irritabilidad. Finalmente en la fase grave los pacientes necesitan atención las 24 horas del día, tienen pérdida completa de la memoria y no reconocen incluso a familiares y amigos (Dickson and Weller 2012). En cualquiera de estas tres fases los pacientes pueden sufrir depresión, ansiedad y miedo, llegando a presentar agresividad por cuadros confusionales (Apostolova and Cummings 2008).

Esta enfermedad se puede clasificar en función de la edad de inicio en: EA de inicio precoz y EA de inicio tardío. Aproximadamente entre el 1% y el 6% de todos los casos de EA son de inicio temprano, es decir la aparición de los primeros síntomas sucede entre los 30 años y los 60 o 65 años, mientras que la EA de inicio tardío aparece como pronto a los 60 o 65 años y es la forma más común de la EA. Ambas pueden ocurrir en personas cuyas familias presenten casos de Alzheimer. A pesar de que los familiares de primer grado de pacientes con enfermedad de aparición tardía tienen aproximadamente el doble de riesgo de padecer la enfermedad, el patrón de transmisión rara vez concuerda con la herencia mendeliana. En contraste, aproximadamente el 60% de los casos de la EA de inicio precoz tiene múltiples casos de EA en sus familias, y de estos casos familiares el 13% se heredan de forma autosómica dominante, con al menos 3

generaciones afectadas (Bekris, Yu et al. 2010). En estos casos de EA familiar se han identificado tres genes mutados gracias al estudio de su genoma (Fig. 14): el gen que codifica para la proteína precursora de amiloide (APP), el gen de la presenilina 1 (PSEN1) y el gen de la presenilina 2 (PSEN2) (Seto-Salvia and Clarimon 2010). Como veremos luego estos genes codifican proteínas clave en el desarrollo de esta patología y han sido utilizados para el desarrollo de modelos animales que permitan estudiar la patología del Alzheimer. La mayoría de estos modelos animales se han realizado en ratones puesto que su genoma y el humano son homólogos en un 99%. Y aunque no se ha desarrollado un modelo que reproduzca completamente la enfermedad existen varios modelos basados en la APP, en las presenilinas, en tau y en la apolipoproteína E (APOE) (Manzano, González et al. 2009).

Locus	Gen (símbolo)	Cromosoma	Proporción	Edad de inicio (media ± DE)
AD3	<i>PSEN1</i>	14q24.3	20-70%	44 ± 8 años
AD1	<i>APP</i>	21q21	10-15%	49 ± 7 años
AD4	<i>PSEN2</i>	1q31-q42	< 1%	59 ± 7 años

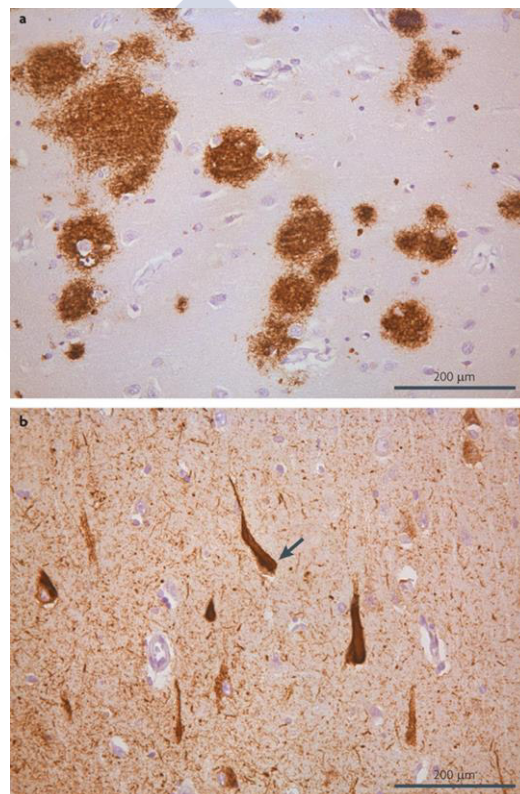
DE: desviación estándar.

**Figura 14.** Genes con segregación autosómica dominante en las formas familiares de la EA (Seto-Salvia and Clarimon 2010).

### 3.2. Patología de la EA

Como hemos mencionado anteriormente, la EA es una neuropatología caracterizada por un proceso de degeneración lento y progresivo debido a la pérdida de sinapsis y la muerte neuronal. Estos daños están localizados en regiones específicas del cerebro encargadas de los procesos de aprendizaje y memoria (Mattson 2004). Los signos neuropatológicos característicos en los procesos de atrofia cerebral de la EA son la presencia de placas seniles y los ovillos neurofibrilares (Fig.15), los cuales aparecen inicialmente en la corteza entorrinal y el hipocampo. El avance de la enfermedad conduce a la difusión de estos signos en la corteza temporal, parietal y finalmente los

lóbulos frontales. Los primeros daños celulares se producen en las neuronas límbicas que están poco mielinizadas y se sitúan en regiones relacionadas con la memoria y el aprendizaje como el hipocampo y la corteza de asociación. Las neuronas altamente mielinizadas sólo se ven afectados en las fases finales de la enfermedad, puesto que la baja mielinización aumenta el gasto energético total de las neuronas y conlleva a una mayor exposición a daños producidos por el EO. También tiene lugar la pérdida de neuronas subcorticales en el núcleo basal de Meynert y el locus coeruleus, perjudicando los sistemas de transmisión colinérgicas y noradrenérgicas en el neocórtex. Muchas de las neuronas del lóbulo parietal y ciertas áreas del lóbulo prefrontal están poco mielinizadas, lo que puede explicar su vulnerabilidad (Jahn 2013).

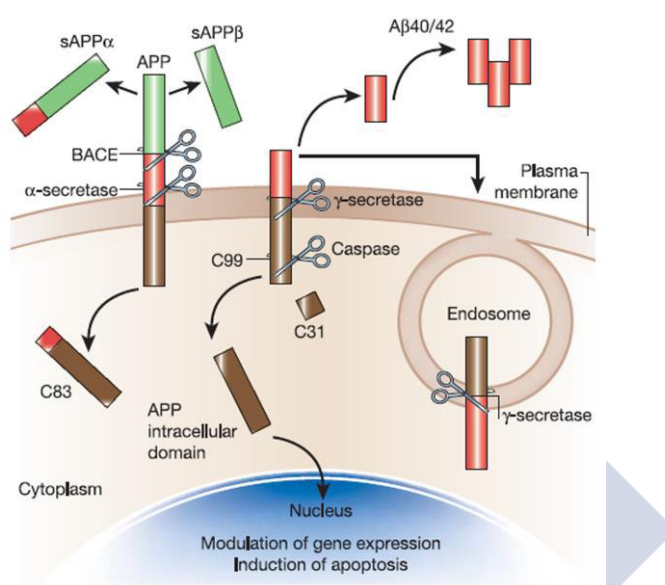


**Figura 15.** Secciones corticales del cerebro de un paciente afectado por la EA. (a) Las placas seniles están marcadas con un anticuerpo específico para  $\beta$ A y (b) los ovillos neurofibrilares se tiñeron con un anticuerpo específico para tau fosforilada (Aguzzi and O'Connor 2010).

### **3.2.1. Placas seniles: formación y enzimas implicadas**

Las placas seniles, también llamadas placas amiloideas, son agregados extracelulares del péptido beta-amiloide ( $\beta$ A). Estas se forman a partir de la proteína precursora de amiloide (APP) que tras un mal procesamiento de la misma da lugar a fragmentos

insolubles y tóxicos del péptido  $\beta$ A. La APP es una proteína integral de membrana que puede ser procesada por dos vías metabólicas, la no-amiloidogénica y la amiloidogénica. La ruta metabólica no-amiloidogénica produce el péptido sAPP $\alpha$ , una forma soluble y no tóxica, en la que la APP es cortada por la enzima  $\alpha$ -secretasa. Sin embargo, cuando la proteína APP se rompe por acción de la  $\beta$ -secretasa se forma el péptido sAPP $\beta$  que seguidamente es metabolizado por la  $\gamma$ -secretasa dando lugar a un péptido insoluble  $\beta$ A40/42 que se agrega formando las placas amiloidas, las cuales son tóxicas para el organismo y juegan un papel crucial en la patología del Alzheimer (Mattson 2004).



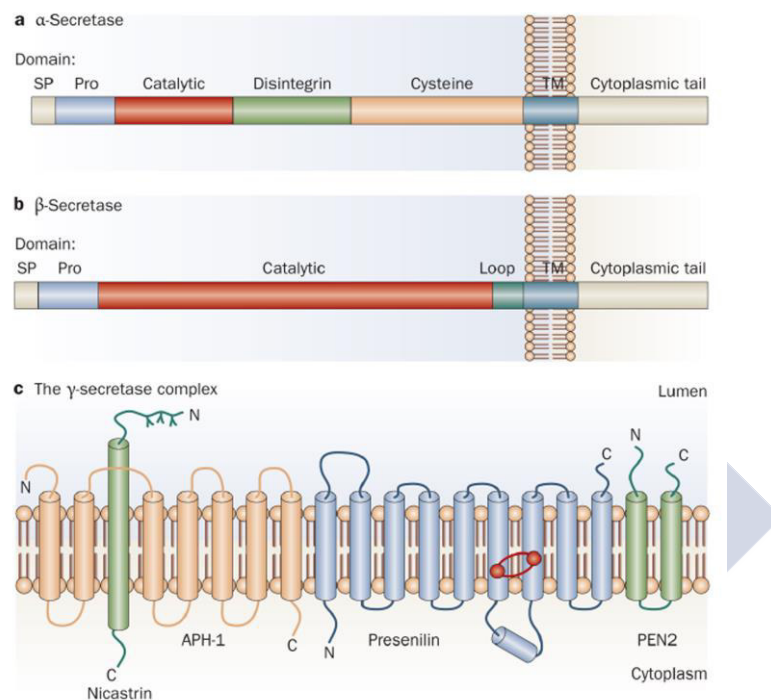
**Figura 16.** Procesamiento de APP normal y patológica por las secretasas (Mattson 2004).

Así pues, las enzimas que controlan la formación de  $\beta$ A son tres: la  $\alpha$ -secretasa, la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa.

- **$\alpha$ -secretasa:** La APP se escinde preferentemente por la  $\alpha$ -secretasa (Fig. 17A). La actividad de esta enzima está mediada por una serie de proteasas unidas a la membrana, miembros de la familia ADAM. Las  $\alpha$ -secretasas rompen la APP entre los aminoácidos 16 y 17, generando el péptido soluble sAPP $\alpha$  y un fragmento carboxi-terminal unido a la membrana. Este último fragmento se degrada en los lisosomas o es procesado por la  $\gamma$ -secretasa, produciendo una serie de péptidos hidrófobos cortos incluyendo  $\beta$ A17-40 y  $\beta$ A17-42, que colectivamente se llaman fragmentos p3. Se ha descrito que el aumento del fragmento sAPP $\alpha$  conlleva



efectos neuroprotectores y promotores del crecimiento, pero se desconocen las consecuencias de aumentar crónicamente la actividad de la  $\alpha$ -secretasa. Varios estudios apuntan a que el aumento de la actividad de la  $\alpha$ -secretasa reduce el procesamiento de APP por la  $\beta$ -secretasa y por tanto la producción de  $\beta$ A, pero estos experimentos no han podido ser replicados universalmente. Esto sumado a que los fragmentos p3 son muy hidrófobos y se ha detectado su presencia en placas amiloides, supone un freno al uso de esta diana terapéutica (De Strooper, Vassar et al. 2010).



**Figura 17.** Estructura de las secretasas alfa (a), beta (b) y gamma (c) (De Strooper, Vassar et al. 2010).

- **$\beta$ -secretasa:** en la EA, la APP se rompe primero por acción de la  $\beta$ -secretasa para producir un fragmento carboxilo terminal unido a la membrana, llamado C99, que posteriormente será cortado por la  $\gamma$ -secretasa liberando así el péptido tóxico  $\beta$ A. La  $\beta$ -secretasa (Fig. 17B), también llamada BACE1, es la enzima que inicia la producción de  $\beta$ A escindiendo el dominio extracelular de APP. Se trata de una proteasa transmembrana aspártica de 501 aminoácidos, cuyo centro catalítico presenta dos motivos de unión orientados hacia el lumen de los compartimentos intracelulares ácidos. En vista del papel crucial que juega en la

EA, los inhibidores de la BACE1 se consideran en la actualidad potenciales tratamientos en la reducción de las concentraciones del péptido  $\beta$ A en el cerebro y por tanto son compuestos interesantes en el desarrollo de fármacos para tratar y prevenir la EA. A día de hoy, hay varios inhibidores prometedores de la BACE1 que se están estudiando en ensayos clínicos en humanos, pero aún quedan muchas preguntas acerca de la seguridad de estos fármacos, el nivel óptimo de inhibición de la BACE1 para lograr eficacia sin efectos secundarios inaceptables y la etapa de la enfermedad en la que este tipo de tratamiento sería más beneficioso (Yan and Vassar 2014).

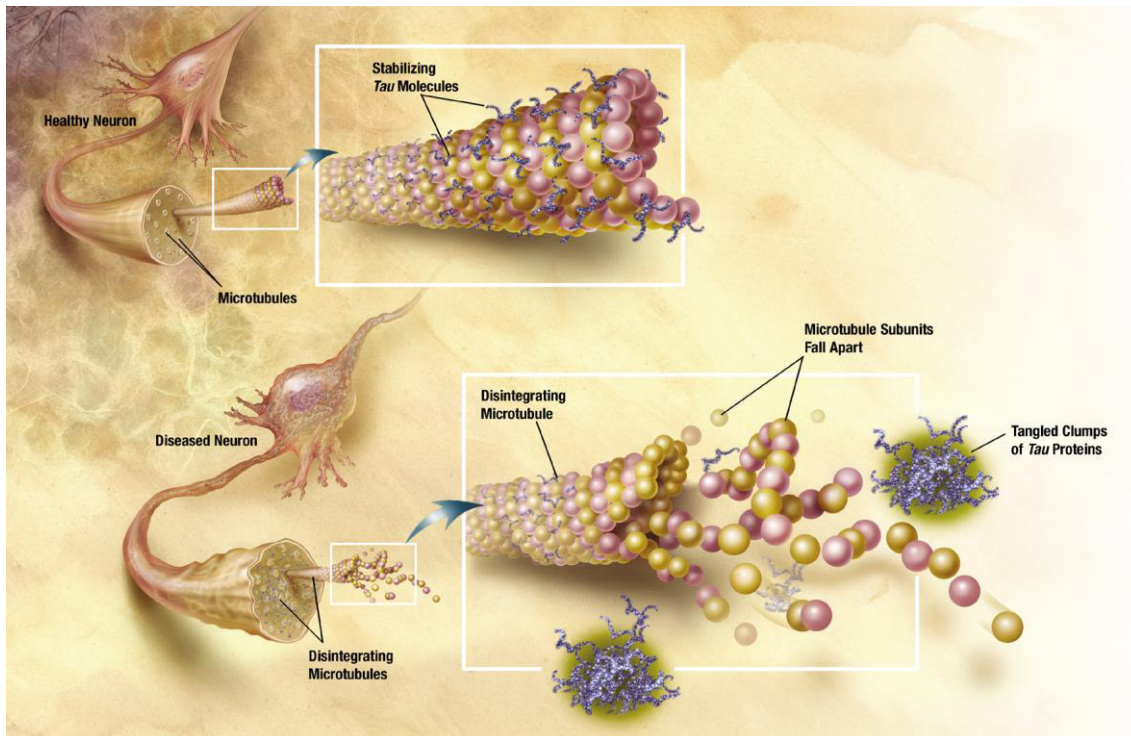
- $\gamma$ -secretasa: La  $\gamma$ -secretasa es también una proteasa aspártica que se encuentra embebida en la bicapa lipídica. Está formada por al menos cuatro subunidades: la presenilina, la nicastrina, la APH-1 y la Pen-2 (Fig. 17C); de las cuales el componente catalítico del complejo es la presenilina que presenta dos residuos de aspartato conformando el sitio activo. Las presenilinas son de gran importancia fisiopatológica debido a que las mutaciones puntuales dominantes autosómicas en estas proteínas dan lugar a la forma más agresiva de la EA de comienzo temprano. La inhibición de esta unidad catalítica se ha propuesto como estrategia terapéutica, al igual que la inhibición de BACE1, para contrarrestar la acumulación del  $\beta$ A (Panza, Frisardi et al. 2010).

### **3.2.2. Ovillos neurofibrilares**

Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares formados por residuos de la proteína tau hiperfosforilada. Tau es una proteína citosólica que se encuentra formando parte de la estructura de los microtúbulos, siendo clave en su dinámica, para así mantener la integridad y la morfología neuronal. La hiperfosforilación de esta proteína y las modificaciones oxidativas sufridas por los microtúbulos dan lugar a la desestabilización de los mismos y la formación de los ovillos neurofibrilares que producen la interrupción del transporte axonal, produciéndose neurotoxicidad y finalmente al deterioro cognitivo típico de esta patología (Fig. 18).



En la EA, la hiperfosforilación de esta proteína es llevada a cabo por diferentes enzimas como son la cinasa glicógeno sintasa 3 (GSK3), la cinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5), las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la familia SRC de tirosina cinasas. (Cardenas, Ardiles et al. 2012).

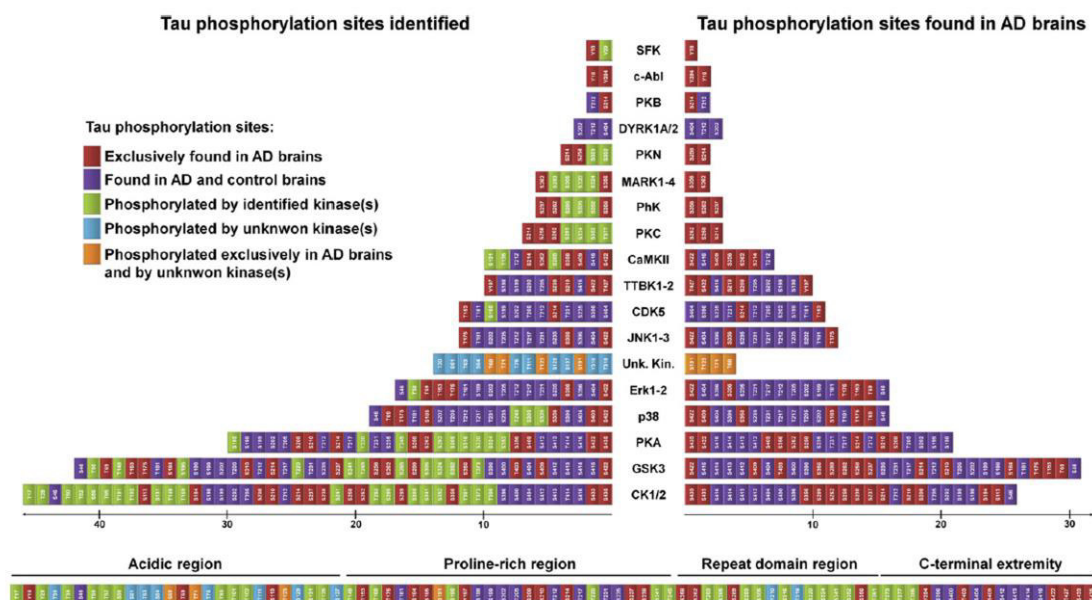


**Figura 18.** Desestabilización de los microtúbulos y formación de los ovillos neurofibrilares (Imagen obtenida de la web: Alzheimer's Disease Education and Referral Center, a service of the National Institute on Aging, [http://www.nia.nih.gov/NR/rdonlyres/A01D12CE-17E3-4D3D-BCEF-9ABC4FF91900/0/TANGLES\\_HIGH.JPG](http://www.nia.nih.gov/NR/rdonlyres/A01D12CE-17E3-4D3D-BCEF-9ABC4FF91900/0/TANGLES_HIGH.JPG))

Y aunque se han propuesto varias modificaciones post-traduccionales de tau como desencadenante de la agregación en ovillos neurofibrilares en la EA, la fosforilación es la principal modificación. Este proceso está regulado por un equilibrio entre las fosfatasas y las cinasas y la alteración de este equilibrio es un posible origen de la fosforilación anormal de tau y la consiguiente aparición de los ovillos o marañas neurofibrilares.

Las cinasas son enzimas del grupo de las transferasas que donan grupos fosfato a partir de moléculas de alta energía, como el ATP o el GTP, a sustratos específicos. El centro catalítico de estas enzimas está muy conservado y funciona mediante un sitio de unión al GTP o el ATP y un sitio de fijación al sustrato que va a ser fosforilado. La regulación de estas cinasas puede ser a través de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, la interacción de la subunidad catalítica con otras moléculas u otras

subunidades que modifican la especificidad de la cinasa o por la distribución intracelular de las cinasas, puesto que en función de su localización en la célula una cinasa puede ejercer efectos diferentes. Las cinasas que fosforilan la proteína tau (Fig. 19) se pueden agrupar en tres clases: (1) las proteínas cinasas dirigidas a la prolina (PKDP) que agrupan a la GSK3, la CDK5 y las MAPK tales como la p38, la cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) y la cinasa c-Jun N-terminal (JNK); (2) las cinasas no PKDP como la cinasa calmodulina II dependiente de calcio (CaMKII); y por último (3) las proteínas cinasas de tirosina (TPK), a este último grupo pertenecen las cinasas de la familia de las Src (Martin, Latypova et al. 2013). De todas ellas nos centraremos en las PKDP y concretamente en la GSK3 y las MAPK, puesto que son las cinasas estudiadas en la presente Tesis Doctoral.



**Figura 19.** Resumen de cinasas que fosforilan tau en EA y sus sitios de fosforilación. A la izquierda se presentan los posibles sitios de fosforilación de tau y a la derecha los sitios de fosforilación de tau que se han encontrado en cerebros con EA (Martin, Latypova et al. 2013).

- **GSK3:** la enzima GSK3 juega un papel crucial en esta enfermedad y se ha propuesto como diana terapéutica en muchos estudios. Esta cinasa se ha descrito como posible vínculo de unión entre la proteína tau y el péptido  $\beta$ A, puesto que, aparte de estar involucrada en la fosforilación de tau, se ha observado que aumenta la producción del péptido  $\beta$ A. Además, se ha relacionado con un incremento de la inflamación, el deterioro de la memoria,

una reducción de la síntesis de acetilcolina y se ha descrito como mediador en la apoptosis contribuyendo directamente a la pérdida de neuronas. Basándose en que es un punto de unión entre los dos principales marcadores patológicos del Alzheimer, tau y  $\beta$ A, y varios signos de esta enfermedad, se planteó la hipótesis de que la desregulación de la GSK3 en las neuronas puede ser clave en el desarrollo de la EA (Hooper, Killick et al. 2008; Hernandez, Lucas et al. 2013). De hecho, estudios realizados en modelos de ratones transgénicos aportan pruebas a esta hipótesis de participación directa de GSK3 en esta enfermedad y proponen como secuencia general de eventos un aumento inicial de la producción aberrante del péptido  $\beta$ A que activan la GSK3, que a su vez incrementaría la fosforilación de la proteína tau (Kremer, Louis et al. 2011).

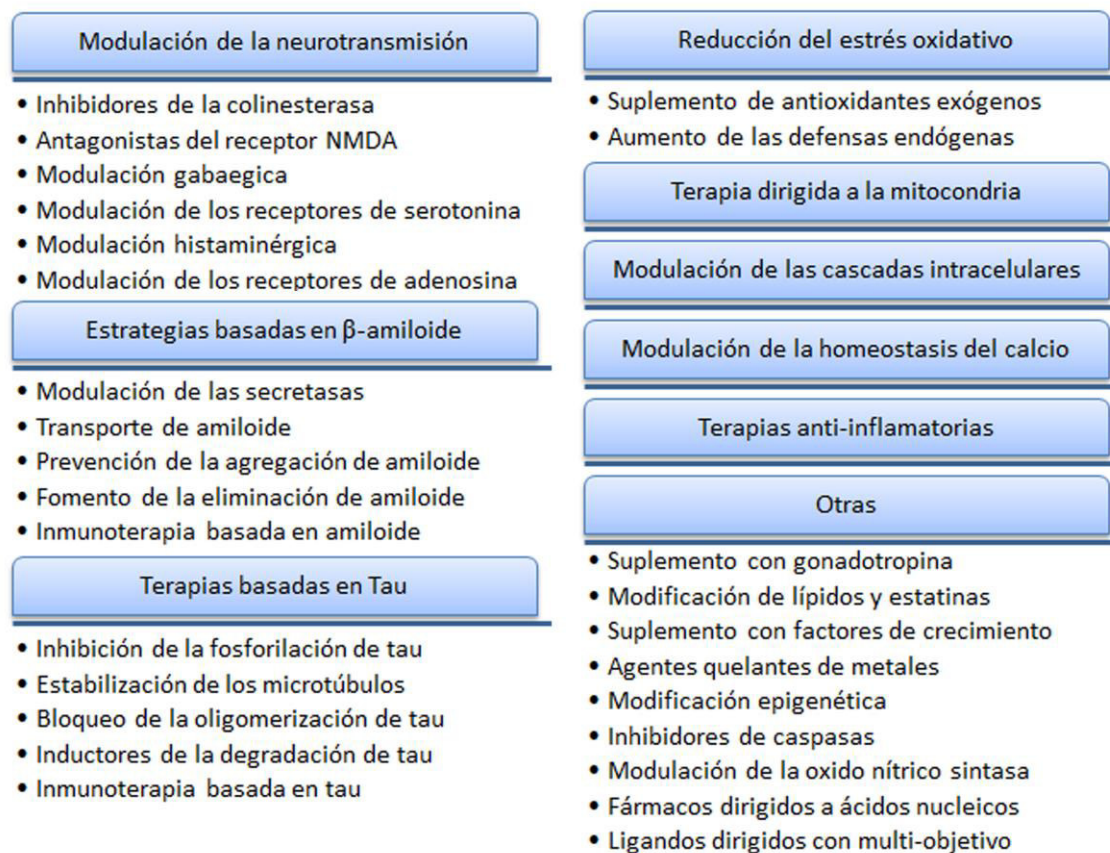
- MAPK: por otra parte las MAPK son enzimas que fosforilan los aminoácidos serina y treonina y que en la patología de la EA van a fosforilar la proteína tau. Estas cinasas son de gran importancia puesto que median la señalización intracelular en actividades celulares tan fundamentales como la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la muerte celular. La acción de estas enzimas sobre las rutas de señalización se cree que también contribuye a la patología de la EA a través de la inducción de la apoptosis neuronal, la activación de la transcripción, el incremento de la actividad enzimática de la BACE y la  $\gamma$ -secretasas y la fosforilación y estabilización de la APP. Los agregados formados por el péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> inducen la activación de los macrófagos microgliales, dando lugar a la producción de ROS y citoquinas pro-inflamatorias, las cuales estimulan las rutas de señalización de las MAPK. En condiciones de estrés oxidativo, las cinasas JNK y p38 se activan e inducen la expresión del gen de la  $\beta$ -secretasa, mientras que la ERK1/2 regula negativamente la expresión de la misma (Kim and Choi 2010).

Concretamente el aumento de la actividad de ERK1/2 se ha asociado con la fosforilación de tau anormal en cerebros con la EA (Pei, Braak et al. 2002) y se ha descrito que la actividad de la cinasa ERK está regulada por las presenilinas 1 y 2, dichas proteínas conforman el centro catalítico de la  $\gamma$ -secretasa (Dehvari,

Isacson et al. 2008). En conclusión, esta MAPK podría estar involucrada en la patogénesis de la EA constituyendo una diana terapéutica relevante en la EA.

### 3.3. Estrategias terapéuticas

Existen numerosas estrategias terapéuticas en estudio que tratan de abordar la EA (Fig. 20), tantas como hipótesis hay intentando explicar esta compleja enfermedad, dado que hasta ahora los investigadores no han sido capaces de esclarecer todos los mecanismos involucrados en esta patología y su origen.



**Figura 20.** Resumen de las estrategias terapéuticas que se investigan para desarrollar un fármaco anti-Alzheimer (Anand, Gill et al. 2014).

Los fármacos aprobados actualmente para el tratamiento del Alzheimer son básicamente moduladores de la neurotransmisión: un antagonista del receptor de NMDA y cuatro inhibidores de la colinesterasa; no obstante uno de ellos, la tacrina, apenas se utiliza debido a su hepatotoxicidad. Sin embargo, estos tratamientos son paliativos y no curan ni evitan el avance de la enfermedad (Anand, Gill et al. 2014).



También se están estudiando otras estrategias terapéuticas como las basadas en los principales marcadores de la patología, beta-amiloide y tau, o los abordajes basados en el estrés oxidativo y la mitocondria debido a su papel en la propagación de la enfermedad y como posibles inductores de la misma. En apartados anteriores se ha hecho referencia a estas estrategias y a continuación haremos un resumen de las mismas.

### **3.3.1. Estrategia terapéutica basada en $\beta$ -amiloide**

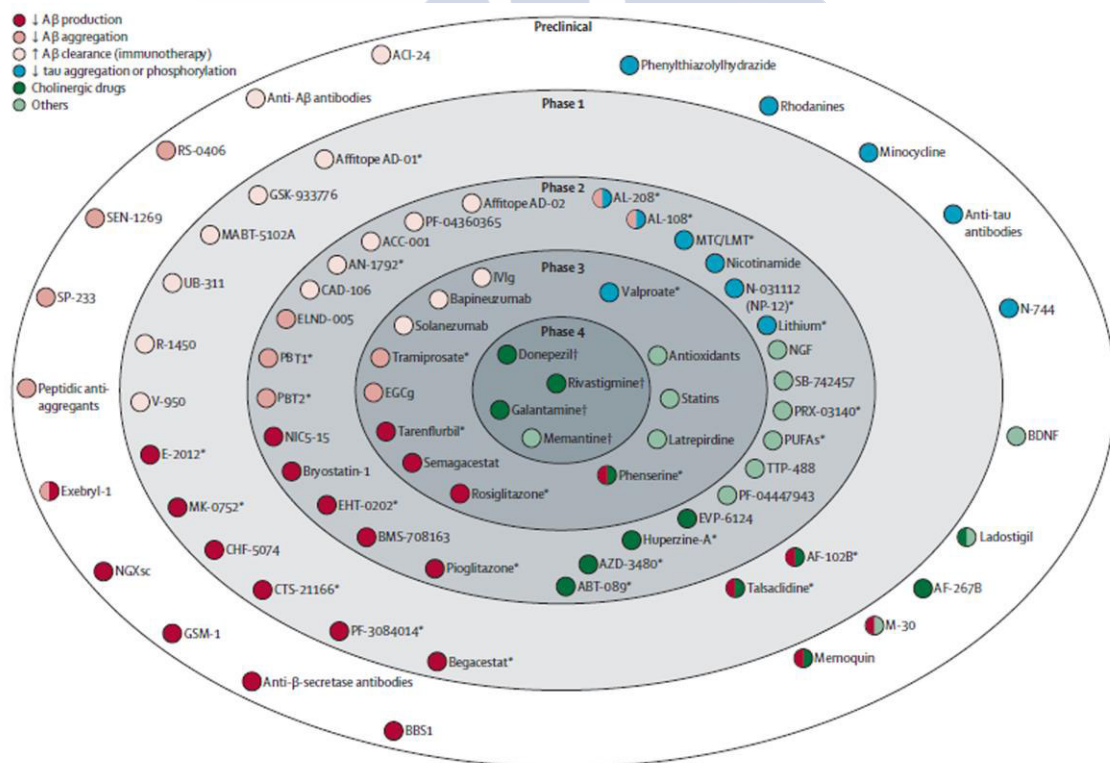
La hipótesis de la cascada amiloide es la más investigada desde que se expuso por primera vez en 1991 y por tanto la estrategia terapéutica predominante en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la EA. Esta hipótesis propone que la agregación del péptido  $\beta$ A es un proceso patológico temprano que induce la fosforilación de tau, la consiguiente formación de ovillos neurofibrilares y finalmente la muerte neuronal. La EA sería resultado de un aumento de la producción del  $\beta$ A tóxico o un deterioro del aclaramiento del mismo y basándose en esta premisa se han desarrollado tratamientos que intentan modular este procesamiento. A pesar de la extensa investigación preclínica y clínica con compuestos que actúan sobre el metabolismo del  $\beta$ A, hasta el momento no se ha obtenido ningún fármaco que actuando sobre estas dianas terapéuticas, haya resultado efectivo en el tratamiento de la EA (Schneider, Mangialasche et al. 2014). Lo más lejos que han llegado este tipo de compuestos en su estudio ha sido la fase 3 de ensayos clínicos y lo han hecho con distintas aproximaciones tales como la disminución de la producción y la agregación del  $\beta$ A, la modulación de las secretasas y la eliminación del  $\beta$ A tóxico por inmunoterapia (Fig. 20) (Mangialasche, Solomon et al. 2010).

### **1.1.1. Estrategia terapéutica basada en tau**

La hipótesis de tau como causa de la EA ha sido la principal rival de la hipótesis amiloide. Sin embargo, hasta el momento pocas terapias basadas en tau han alcanzado la fase 3 de los ensayos clínicos (Fig. 21).

Aunque existen varios enfoques en las terapias basadas en tau, los principales son la modulación de la fosforilación de tau con inhibidores de cinasas, la inhibición de la

agregación de tau y la inducción de la degradación de la proteína tau fosforilada. El primer enfoque está basado en que la hiperfosforilación de tau y la formación de los ovillos neurofibrilares son promovidos por la actividad de las proteínas cinasas como la GSK3 y la fosfatasa PP2A. Como acabamos de mencionar, la desregulación de la GSK3 podría tener un papel clave en la patogénesis de la EA, porque la GSK3 está implicada en el procesamiento del  $\beta$ A y la tau, la señalización celular y la transcripción de genes. Fármacos como el litio y el valproato inhiben la GSK3, reduciendo la fosforilación de tau y previniendo los daños derivados de la misma en modelos animales. Además, estudios realizados en pacientes ambulatorios con estadios de leve a moderado tratados con el valproato determinaron que este compuesto no reduce los efectos sobre la cognición y el estado funcional, pero parece disminuir la agitación y la psicosis de estos pacientes. Varios inhibidores de la GSK3 están en desarrollo (Mangialasche, Solomon et al. 2010) y se ha identificado un inhibidor de la agregación de tau, el cloruro de metiltioninio, que recientemente ha llegado a la fase 3 y cuyos ensayos clínicos están en marcha con un estabilizador que mejora su tolerabilidad y absorción (Wischik, Harrington et al. 2014).



**Figura 21.** Principales fármacos en desarrollo para la terapia de la EA, clasificados según la fase de estudio y sus propiedades terapéuticas (Mangialasche, Solomon et al. 2010)

### **1.1.2. Estrategia terapéutica basada en la reducción del estrés oxidativo**

Como se ha mencionado anteriormente, las neuronas son células muy sensibles al estrés oxidativo y por lo tanto estos procesos están estrechamente relacionados con las enfermedades neurodegenerativas y concretamente con la EA. No está claro si puede ser la causa o una consecuencia de los procesos neurodegenerativos, pero es evidente su implicación en la propagación del daño celular (Andersen 2004). Las ROS están implicadas en la formación de las placas amiloideas mediante la activación de la agregación del  $\beta$ A y también participan en la activación de algunas cinasas responsables de la hiperfosforilación de tau (Borza 2014). A su vez, la agregación del péptido  $\beta$ A y la formación de los ovillos neurofibrilares se produce asociada a interacciones con metales, tales como el hierro y el cobre, que dan lugar a la generación de las ROS, contribuyendo a incrementar esta situación de estrés oxidativo, lo cual da lugar a un aumento de las reacciones de peroxidación lipídica, la formación de proteínas aberrantes, la aparición de procesos de inflamación y disfunción mitocondrial que finalmente llevan a la muerte de las células (Savelieff, Lee et al. 2013).

Así pues, teniendo en cuenta esta estrecha vinculación de la EA y el estrés oxidativo es lógico abordar una estrategia antioxidante en el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, existen resultados contradictorios sobre la aplicación de este tipo de terapia. Los tratamientos basados en esta estrategia han demostrado ser eficaces en modelos de ratón para la EA y en pequeños estudios clínicos, pero la eficacia en pacientes aún es controvertida y no concluyente. Los ensayos clínicos para la prevención y el tratamiento de la EA mediante el uso de antioxidantes aún son preliminares, por lo que es imprescindible la realización de más estudios en este campo para determinar si éstos pueden reducir el riesgo o retrasar la progresión de la enfermedad en los pacientes con la EA (Feng and Wang 2012). Un ejemplo de antioxidantes directos son la vitamina E y la vitamina C que se utilizaron en un estudio transversal prospectivo de demencia en personas de edad avanzada en el condado de Cache (Utah, EE.UU.), en el que su uso combinado se asoció con una reducción de la prevalencia e incidencia de la EA. En otro estudio se analizaron los efectos de la vitamina E en comparación con la selegilina, un inhibidor de la monoamina oxidasa B (MAO-B), pero también de ambos agentes en

combinación. Tras dos años de tratamiento se observó un retraso significativo en la aparición de parte de los síntomas con la vitamina E, la selegilina o la terapia combinada en comparación con un grupo placebo. Sin embargo, en un estudio reciente a doble ciego en pacientes con deterioro cognitivo leve, no hubo diferencias significativas entre los grupos que recibieron la vitamina E o el placebo en la probabilidad de progresión de la EA. Otros antioxidantes directos están siendo investigados, pero el uso de la vitamina E está siendo reexaminado, debido al riesgo cardiovascular de las dosis altas (Singh, Kushwah et al. 2012).

Existe otra estrategia antioxidante en la que en vez del uso de antioxidantes directos, se utilizan inductores de los antioxidantes endógenos a través de la ruta Nrf2-ARE. Aunque se ha demostrado que la activación del Nrf2 reduce la toxicidad debida al  $\beta$ A, la mayoría de estudios se centran en la neuroprotección por la vía Nrf2-ARE contra la generación de ROS y la muerte celular inducida por  $\beta$ A, puesto que los efectos de esta ruta sobre el procesamiento, el aclaramiento y la agregación  $\beta$ A *in vivo* son todavía controvertidos. Un ejemplo de activador de Nrf2 es la terbutilhidroquinona (TBHQ) que se ha descrito como inhibidor de la toxicidad inducida del  $\beta$ A<sub>1-42</sub> en la línea celular NT2N, permitiendo un aumento de la viabilidad celular. Sin embargo, se desconoce si esa reducción es debida a que evita la agregación del péptido o si está actuando impidiendo la liberación del  $\beta$ A por las células muertas. Otro inductor del Nrf2, el sulforafano, ha demostrado mejorar la función cognitiva en un modelo de ratón para la EA. La sobreexpresión de la catalasa en estos ratones transgénicos para APP (Tg2576), inducida por la activación de la ruta Nrf2-ARE, produce una reducción drástica de la longitud de APP disminuyendo así los niveles del  $\beta$ A solubles e insolubles que consecuentemente da lugar a la extensión de la vida de estos ratones y la mejora de la memoria. En otro estudio, la sobreexpresión de Nrf2 a través de lentivirus en el hipocampo de ratones con mutaciones para APP y PS1 ha demostrado una mejora de la memoria espacial y la capacidad de aprendizaje en un test cognitivo (Gan and Johnson 2014).

### **1.1.3. Estrategia terapéutica dirigida a la mitocondria**

Ligada a la estrategia terapéutica antioxidante encontramos el uso de la mitocondria como diana farmacológica. La mitocondria, como principal productor de las ROS está



implicada en la patología de la EA. Las neuronas entran en un círculo vicioso de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en el que el incremento de las ROS produce daños en la mitocondria, lo que a su vez favorece la producción de ROS y da lugar a un deterioro progresivo de las neuronas que acaban sufriendo mal funcionamiento celular y termina finalmente con la muerte de las mismas. Este proceso jugaría un papel fundamental en el desarrollo de la patología de la EA que de hecho comparte muchas de las características de la disfunción mitocondrial, como la reducción de metabolismo energético debido a alteraciones en las enzimas encargadas de la fosforilación oxidativa, la pérdida de la homeostasis del calcio, la acumulación de mutaciones esporádicas en el ADN mitocondrial y la activación o modificación de la vía intrínseca de la apoptosis (Wang, Wang et al. 2014).

Se están investigando varios compuestos dirigidos a la mitocondria, uno de ellos es la coenzima Q10 (CoQ10), también llamada ubiquinona que, como se mencionó anteriormente, es una proteína que transfiere electrones del complejo I al complejo II de la cadena de transporte de electrones. El suplemento con CoQ10 tiene potenciales efectos neuroprotectores incluyendo la disminución de la generación de las ROS, minimizando los daños que estas producen y estabilizando la función mitocondrial. Por otra parte, aunque los estudios preclínicos realizados con la CoQ10 han sido alentadores, lamentablemente los estudios en humanos no han podido confirmar estas expectativas.

Otro compuesto interesante con diana en la mitocondria es la idebenona, un análogo soluble en agua de la ubiquinona que también ha sido probado en seres humanos demostrando efectos beneficiosos sobre la cognición y progresión de la enfermedad, sin embargo en un estudio realizado posteriormente no se encontraron efectos significativos. La falta de eficacia de los fármacos podría ser debido a que ambos compuestos, la CoQ10 y la idebenona, necesitan una cadena de transporte de electrones intacta y completamente funcional y en la EA las mitocondrias se encuentran dañadas. En esta línea de tratamiento se han investigado otros antioxidantes mitocondriales como el azul de metileno, la acetil-L-carnitina, el ácido R- $\alpha$ -lipoico, el MitoQ, el péptido

Szeto-Schiller (SS-31), el MitoVitE o los cationes selectivos SkQR1 y C12R1 de reciente identificación.

Otra estrategia terapéutica dirigida a la mitocondria se basa en la importancia de la apertura transitoria del poro de permeabilidad mitocondrial en la disfunción mitocondrial. Por ejemplo, se ha descrito que la interacción del péptido  $\beta$ A con la ciclofilina D, uno de los componentes del poro de permeabilidad mitocondrial, también produce disfunción mitocondrial mediante el aumento de la producción de ROS o la desregulación de la apertura transitoria del poro de permeabilidad mitocondrial. Por ello, se ha propuesto que en un entorno rico en  $\beta$ A, la formación de este poro de transición mediada por la ciclofilina D contribuye al fallo mitocondrial y neuronal y el bloqueo de la ciclofilina D protegería la mitocondria de la toxicidad derivada del  $\beta$ A. Los compuestos capaces de bloquear este proceso resultan muy interesantes y están siendo evaluados como posibles tratamientos en la EA (Eckert, Renner et al. 2012).

Como resumen podemos concluir que si bien la EA es un trastorno multifactorial complejo, las estrategias terapéuticas abordadas hasta el momento son tratamientos dirigidos a una sola característica de la enfermedad. Este enfoque, a pesar de haber obtenido algún resultado positivo, fundamentalmente preclínico, ha finalizado en datos poco alentadores en los estudios en fase clínica. Por ello el planteamiento de terapias combinatorias o estrategias multimodales pueden ser de utilidad para encontrar nuevas terapias que consigan mantener sus buenos resultados en las fases finales de la investigación farmacéutica (Persson, Popescu et al. 2014).



# Objetivo

La enfermedad de Alzheimer es uno de los mayores problemas socio-económicos de la sociedad occidental en la actualidad. Se desconoce el origen de la enfermedad y los fármacos que existen para esta patología son solamente paliativos e incapaces de detener el proceso neurodegenerativo. El hallazgo de una cura específica es todo un reto, debido a la complejidad de esta enfermedad en la que se produce pérdida de la homeostasis, apoptosis, fallos en la regulación de la transcripción, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo entre otros procesos. Debido a ello algunos investigadores se han centrado en la búsqueda de compuestos capaces de atacar varias dianas terapéuticas que en su conjunto puedan frenar el avance de esta enfermedad multifactorial.

Los compuestos de origen marino tienen un gran potencial terapéutico, puesto que este tipo de moléculas son producidas por organismos vivos con un propósito concreto, como por ejemplo defensa frente a otros organismos. Por lo tanto, estos compuestos a menudo son biológicamente activos y muy interesantes en el desarrollo de fármacos.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es la evaluación de 15 compuestos de origen marino para determinar su potencial como posibles fármacos anti-Alzheimer en tres fases de estudio:

- Evaluación de la capacidad neuroprotectora de los compuestos en un modelo *in vitro* de estrés oxidativo.
- Evaluación de los efectos de los compuestos sobre los principales marcadores del Alzheimer en modelos celulares *in vitro*.
- Análisis de comportamiento y evaluación de los principales marcadores del Alzheimer en ratones 3xTg-AD tratados con los compuestos objeto de estudio.



# Publicaciones

En este apartado se recogen los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral presentados en un total de cinco artículos. Aunque podrían dividirse en dos bloques estudio, uno centrado en la neuroprotección frente al estrés oxidativo y otro analizando los efectos beneficiosos de los compuestos en la EA, todos ellos conforman una única sección debido a la continuidad de los experimentos.

Así pues, inicialmente se estudiaron los compuestos de origen marino en neuronas corticales primarias en un modelo de estrés oxidativo analizando sus capacidades protectoras y antioxidantes. Dichos resultados han sido recogidos en las siguientes publicaciones:

- 1. Mitigation of ROS insults by *Streptomyces* secondary metabolites in primary cortical neurons**
- 2. *Spongionella* secondary metabolites protect mitochondrial function in cortical neurons against oxidative stress**
- 3. Bromoalkaloids protect primary cortical neurons from induced oxidative stress**

Los compuestos que proporcionaron los resultados más prometedores en los estudios realizados en el modelo de estrés oxidativo fueron analizados en dos modelos celulares y un modelo animal para la EA. En estos experimentos se estudió la capacidad de dichos compuestos para reducir los niveles de los principales marcadores patológicos de la EA y su eficacia como inhibidores de las enzimas implicadas en la formación de estos marcadores. Todos estos resultados se recogen en dos artículos:

- 4. The *Streptomyces* metabolite anhydroexfoliamycin ameliorates hallmarks of Alzheimer's disease *in vitro* and *in vivo***
- 5. Gracilins: *Spongionella*-derived promising compounds for Alzheimer disease**

A continuación se presentan los artículos escritos en inglés descritos en este apartado, junto con una traducción del resumen en castellano.

## 1. Mitigation of ROS insults by *Streptomyces* secondary metabolites in primary cortical neurons

### RESUMEN

El estrés oxidativo es un factor común en las enfermedades neurodegenerativas, ampliamente relacionadas con la disfunción mitocondrial. En este estudio hemos examinado los efectos de siete compuestos naturales, procedentes de muestras de *Streptomyces*, en neuronas corticales primarias tratadas con peróxido de hidrógeno, el cual es un modelo *in vitro* para el estudio del estrés oxidativo. Hemos demostrado la capacidad de estos compuestos para inhibir la citotoxicidad neuronal y reducir la liberación de las ROS después de 12 horas de tratamiento. Entre los compuestos analizados destacan la quinona anhidroexfoliamicina y el pigmento rojo pirrólico undecilprodigiosina. Estos dos compuestos muestran la protección más completa contra el estrés oxidativo, produciendo la mejora de la función mitocondrial, la inhibición de la producción de las ROS y el aumento de los niveles de las moléculas antioxidantes, glutatión y catalasa. Otros experimentos confirmaron que la anhidroexfoliamicina actúa sobre la vía Nrf2-ARE, como inductor de la translocación de Nrf2 al núcleo, y es capaz de producir una potente inhibición del efecto del desacoplador mitocondrial FCCP sobre el calcio citosólico, lo que señala a la mitocondria como una diana celular para esta molécula. Además, ambos compuestos fueron capaces de reducir la actividad de la caspasa-3 inducida por el potenciador de apoptosis estaurosporina, pero la undecilprodigiosina no logró inhibir los efectos del FCCP y no actuó sobre la ruta Nrf2-ARE como fue el caso de anhidroexfoliamicina. Estos resultados muestran que los metabolitos derivados de *Streptomyces* podrían ser útiles para el desarrollo de nuevos fármacos para la prevención de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la isquemia cerebral.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cn4001878>





## **2. *Spongionella* secondary metabolites protect mitochondrial function in cortical neurons against oxidative stress**

### RESUMEN

El hábitat marino proporciona un gran número de compuestos bioactivos estructuralmente diversos para el desarrollo de fármacos. Las esponjas marinas se han estudiado durante muchos años y han resultado ser una fuente rica en este tipo de sustancias biológicamente activas. Este estudio se centra en la evaluación de seis diterpenos derivados de *Spongionella sp.* en un modelo de estrés oxidativo *in vitro*, en el cuál se estudiaron sus efectos sobre la función mitocondrial. Los compuestos analizados incluyen las gracilinas (A, H, K, J y L) y la tetrahidroaplisulphurina-1. Los compuestos se co-incubaron con peróxido de hidrógeno durante doce horas para determinar su capacidad de protección y se evaluaron sus efectos sobre los marcadores de la apoptosis y la vía Nrf2-ARE. Los resultados concluyen que las gracilinas preservan las neuronas contra el daño oxidativo, y que concretamente la tetrahidroaplisulphurina-1 muestra una actividad neuroprotectora completa. El estrés oxidativo está relacionado con la disfunción mitocondrial y por lo tanto con los trastornos neurodegenerativos como son las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, la ataxia de Friedreich o la esclerosis lateral amiotrófica. Esta neuroprotección en condiciones de oxidación sugiere que estos metabolitos pueden ser candidatos interesantes en el desarrollo de fármacos para enfermedades neurodegenerativas.



### **3. Bromoalkaloids protect primary cortical neurons from induced oxidative stress**

#### RESUMEN

Los bromoalcaloides son metabolitos secundarios altamente activos, lo cual ha sido demostrado en varias áreas terapéuticas. En esta investigación analizamos la actividad neuroprotectora y antioxidante de la himenialdisina y la himenina. Ambas estructuras se probaron en un modelo celular de estrés oxidativo, que consiste en neuronas corticales incubadas con los compuestos estudiados y el inductor oxidativo peróxido de hidrógeno. Se analizaron varios marcadores de oxidación en las neuronas sometidas a estrés oxidativo y se compararon los resultados en presencia y ausencia de los bromoalcaloides. Ambos compuestos demostraron gran habilidad para proteger a las neuronas en condiciones de estrés a concentraciones nM, destacando la himenialdisina con una protección más completa. Además, se estudió la actividad de la himenialdisina y la himenina sobre la vía Nrf2-ARE y por primera vez estos metabolitos halogenados se han descrito como inductores de Nrf2, reforzando la capacidad antioxidante observada y suponiendo la apertura de una nueva línea de investigación. Estos resultados, sumados a los efectos de esta familia de compuestos que se caracterizan por modular negativamente varias cinasas y citocinas proinflamatorias, han posicionado a la himenialdisina y la himenina como buenos candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades neurodegenerativas.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cn500258c>



#### 4. The *Streptomyces* metabolite anhydroexfoliamycin ameliorates hallmarks of Alzheimer's disease *in vitro* and *in vivo*

##### RESUMEN

La anhidroexfoliamicina y la undecilprodigiosina se han descrito anteriormente como moléculas neuroprotectoras contra el estrés oxidativo en neuronas. Dado que el estrés oxidativo está fuertemente correlacionado con las enfermedades neurodegenerativas, hemos evaluado sus efectos sobre los principales marcadores de la enfermedad de Alzheimer. Ambos compuestos se estudiaron *in vitro* en dos modelos celulares de neuroblastoma diferentes, uno para estudios del metabolismo de la proteína precursora de amiloide (BE(2)-M17) y otro específico de taupatologías como la enfermedad de Alzheimer (SH-SY5Y-TMHT441). Se analizaron los niveles de  $\beta$ A, la actividad de la BACE1, la fosforilación de tau y la expresión de las cinasas ERK y GSK3. Así, la undecilprodigiosina obtuvo pobres resultados, mientras que la anhidroexfoliamicina (0.1  $\mu$ M) produjo una fuerte inhibición de la GSK3, reduciendo los niveles de  $\beta$ A y la fosforilación de tau *in vitro*. Un ensayo competitivo entre la anhidroexfoliamicina y el inhibidor específico de JNK, SP600125, mostró que la reducción de los niveles de tau fosforilada está mediada por la vía de la JNK en las células SH-SY5Y-TMHT441. Por ello, este compuesto fue probado *in vivo* en ratones 3xTg-AD por administración intraperitoneal y confirmó los resultados positivos registrados en los ensayos *in vitro*. Este trabajo presenta la anhidroexfoliamicina como un candidato prometedor para estudios en el desarrollo de fármacos contra las enfermedades neurodegenerativas.

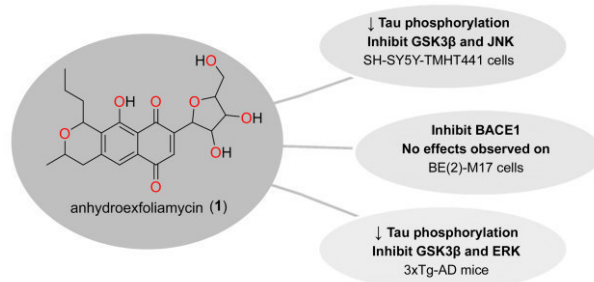
## The *Streptomyces* Metabolite Anhydroexfoliamycin Ameliorates Hallmarks of Alzheimer's Disease in Vitro and in Vivo

Marta Leirós<sup>†</sup>, Eva Alonso<sup>†</sup>, Mostafa E. Rateb<sup>‡§</sup>, Rainer Ebel<sup>‡</sup>, Marcel Jaspars<sup>‡</sup>, Amparo Alfonso<sup>†</sup>, Luis M. Botana<sup>†\*</sup>.

<sup>†</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain. <sup>‡</sup> Marine Biodiscovery Centre, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Meston Walk, Aberdeen AB24 3UE, Scotland, U.K. <sup>§</sup> Pharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy, Beni-Suef University, Beni-Suef 32514, Egypt.

### KEYWORDS

Anhydroexfoliamycin; *Streptomyces*; Alzheimer's disease; Glycogen synthase kinase-3beta; 3xTg-AD.



## ABSTRACT

Anhydroexfoliamycin (**1**) and undecylprodigiosin (**2**) have been previously described as neuroprotective molecules against oxidative stress in neurons. Since oxidative stress is strongly correlated with neurodegenerative diseases, we have evaluated their effects over the principal hallmarks of Alzheimer's disease. Both compounds were tested in vitro in two different neuroblastoma cellular models, one for amyloid precursor protein metabolism studies (BE(2)-M17) and another one specific for tau pathology in Alzheimer's disease (SH-SY5Y-TMHT441). Amyloid-beta (A $\beta$ ) levels, BACE1 activity, tau phosphorylation, ERK and GSK3 $\beta$  expression were analyzed and while undecylprodigiosin (**2**) produced poor results, anhydroexfoliamycin (**1**) strongly inhibited GSK3 $\beta$ , reducing A $\beta$  levels and tau phosphorylation in vitro (0.1  $\mu$ M). A competitive assay of anhydroexfoliamycin (**1**) and the specific JNK inhibitor, SP600125, showed that the reduction of the phosphorylated tau levels is mediated by the JNK pathway in SH-SY5Y-TMHT441 cells. Thus, this compound was tested in vivo by intraperitoneal administration in 3xTg-AD mice, confirming the positive results registered in the in vitro assays. This work presents anhydroexfoliamycin (**1**) as a promising candidate for further studies in drug developing against neurodegenerative diseases.

Alzheimer's disease (AD) is a neuropathology characterized by a slow and progressive degeneration process with synaptic loss and a final neuronal death. These damages are located in specific brain regions involved in learning and memory processes. The principal hallmarks of this disorder are the presence of senile plaques and neurofibrillary tangles (NFTs). These senile plaques are extracellular aggregates of amyloid-beta ( $A\beta$ ) protein produced by the incorrect cleavage of the amyloid precursor protein (APP) and NFTs are intracellular accumulations of microtubules that have lost their structural disposition due to the hyperphosphorylation of tau proteins and oxidative modifications.

APP is an integral membrane protein that can be processed by two different pathways. The non-amyloidogenic pathway produces  $sAPP\alpha$  by the action of the  $\alpha$ -secretase, while in the amyloidogenic pathway,  $\beta$ -secretase (BACE) breaks APP, resulting in a  $sAPP\beta$  fragment that later on will be cut again by the  $\gamma$ -secretase producing a final insoluble fragment,  $A\beta_{40/42}$ , which will aggregate to form amyloid plaques (Mattson 2004). On the other hand, Tau is a cytosolic protein associated with microtubules dynamics that is crucial for maintaining the neuronal integrity and morphology. In AD, this protein appears hyperphosphorylated by several kinase enzymes such as glycogen synthase kinase-3beta ( $GSK3\beta$ ), cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5), mitogen-activated protein kinases (MAPK) and SRC family tyrosine kinases, leading to the NFTs formation, disassembling of microtubules, disruption of axonal transport, neurotoxicity and consequently cognitive impairment (Cardenas, Ardiles et al. 2012). These kinases have a conserved catalytic core that consists of an ATP/GTP binding pocket and an attachment site for the substrates susceptible of phosphorylation, in this case tau protein. Tau presents 85 supposed phosphorylation sites and among them only 28 are exclusively found in brains affected by AD. None of these kinases are the responsible for all of them and thus a specific inhibitor for one kinase would not represent a promising strategy for AD treatment, but in contrast a molecule able to inhibit several tau kinases simultaneously would be a more suitable option (Martin, Latypova et al. 2013).

Amyloid  $\beta$  aggregation and NFT formation occur in association with metal ion dyshomeostasis. The interactions of redox active metals, such as copper and iron, with these hallmarks lead into reactive oxygen species (ROS) formation and consequently to

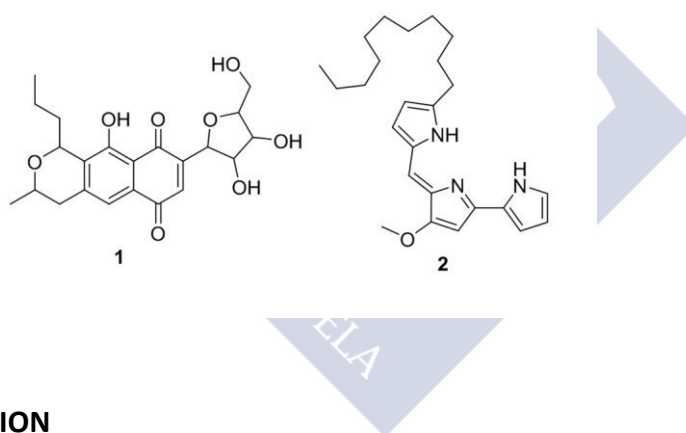


an oxidative stress condition which contributes to the neurodegenerative process (Savelieff, Lee et al. 2013). This ROS production is also implicated in triggering the A $\beta$  aggregation and activating some kinases responsible for tau hyperphosphorylation, thereby further aggravating the pathological situation (Borza 2014). In addition, neurons are more vulnerable to oxidative stress due to their elevated lipid concentrations, their high oxygen metabolism and their poor antioxidant defenses (Li, O et al. 2013), which easily leads to lipid peroxidation, aberrant protein formation, inflammation, mitochondrial dysfunction and ultimately, cell death. Therefore, even if it remains unclear whether oxidative stress is the cause or the consequence of neurodegeneration, it is clear that oxidation processes are intimately related with the propagation of cell damage and contribute to the neurodegeneration process (Andersen 2004). In this sense, aging is defined by an augmentation of oxidative stress processes, but in AD brains this increase is even higher. This greater increase also appears before the first AD hallmarks are detected, pointing to oxidative stress as an initiator and amplifier of the pathology (Poljsak and Milisav 2013; Wang, Wang et al. 2014). The main producer of reactive oxygen species (ROS) are mitochondria, thus a dysfunction of mitochondrial dynamics, either due to genetic mutations or environmental damage, leads to a decreased response capacity of mitochondria against oxidative stress. Many features of mitochondrial dysfunction, such as reduction of energy metabolism, alterations in oxidative phosphorylation enzymes, calcium dyshomeostasis, accumulation of sporadic mutations in mitochondrial DNA, and activation or modification of the intrinsic apoptotic pathway, have been described in AD. This vicious circle of oxidative stress and mitochondria dysfunction weakens neurons and is responsible for cellular degeneration, playing a crucial role in the development of the AD pathology (Wang, Wang et al. 2014).

To date, there are many hypotheses trying to explain the mechanisms and origin of AD, among others oxidative stress (Padurariu, Ciobica et al. 2013), mitochondrial cascade (Swerdlow, Burns et al. 2013), calcium dyshomeostasis (Berridge 2010), cholinergic (Craig, Hong et al. 2011) or the tau hypothesis (Maccioni, Farias et al. 2010). However, the most accepted is the amyloid cascade hypothesis that proposes the abnormal amyloid processing as the central event of AD (Karran, Mercken et al. 2011).

But this amyloid hypothesis has some shortcomings such as the fact that A $\beta$  plaques have been detected in healthy patients, and that the link between A $\beta$  plaques and NFTs formation remains unclear (Reitz 2012). Moreover, based on this hypothesis diverse therapeutic strategies have emerged (Anand, Gill et al. 2014), but there are to date no positive results in this investigation line. Recently, approaches targeting tau are receiving more attention and different strategies focused on GSK3 $\beta$  inhibition, activation of phosphatases, microtubule stabilization, prevention of tau aggregation, increasing of tau degradation or immunotherapy have emerged (Medina and Avila 2014). Some of them are achieving phase III clinical trials (Wischik, Harrington et al. 2014), but the success of tau-based therapeutics remains unknown. However, although amyloid and tau approaches have been widely adopted and currently are the most studied ones, oxidative stress-based strategies have also been tried, using two different routes: through exogenous antioxidants or by the induction of endogenous antioxidant defenses through the nuclear receptor factor 2 (Nrf2). This transcriptional factor is responsible for the transcription of a group of genes encoding the antioxidant response element (ARE) of cells (Anand, Gill et al. 2014). In in vitro assays, the Nrf2 activation/overexpression have exhibited protective abilities against A $\beta$  toxicity and moreover, in vivo experiments with transgenic mice carrying two human APP mutations (Tg19959 mouse) showed a diminution of inflammation and oxidative stress levels, altogether with an improvement of spatial memory and a reduction of A $\beta$  plaques through Nrf2 inducers (Joshi and Johnson 2012). Meanwhile, as the exogenous antioxidant approach is having a poor success in clinical trials, the induction of Nrf2/ARE pathway may be considered a promising strategy worth pursuing for AD. To date, drugs approved by the US Food and Drug administration for the treatment of AD are four cholinesterase inhibitors and an NMDA antagonist. These are only palliative treatments and are unable to stop the degenerative process. The complexity and unknown mechanism of AD has led researchers into the search of new multi-target molecules that could modulate different hallmarks of AD pathology at the same time and that have a capacity of slowing the advance of the disease (Anand, Gill et al. 2014).

Anhydroexfoliamycin (compound **1**) and undecylprodigioisin (compound **2**) are *Streptomyces*-derived compounds that have previously shown antioxidant properties. The activity of these two compounds have been described in an oxidative stress model in primary cortical neurons showing the ability to reduce ROS levels and to enhance the antioxidant defenses through the increase of catalase activity and glutathione levels, however only compound **1** has proved to be a Nrf2 inducer. In addition, they acted over mitochondria, maintaining the mitochondrial membrane potential and reducing caspase-3 activity and, while compound **1** modulated also calcium homeostasis, compound **2** only ameliorated the mitochondrial function (Leiros, Alonso et al. 2014). Considering that oxidative stress damages and mitochondrial function failures are found in initial AD stages and that these processes contribute in a critical manner in the pathology advance, the aim of this work is to evaluate the possible effect of these two antioxidant compounds in the principal hallmarks of this disease, A $\beta$  and tau proteins, in two cellular models and in a transgenic animal for AD studies.

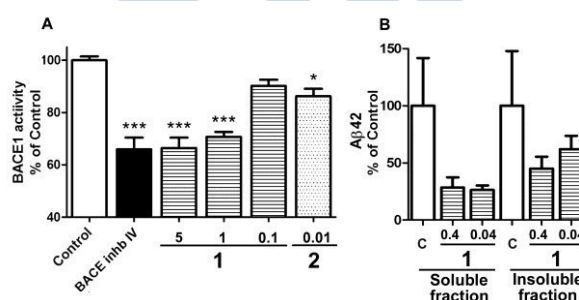


## RESULTS AND DISCUSSION

The secondary metabolites anhydroexfoliamycin (**1**) and undecylprodigioisin (**2**) have demonstrated neuroprotective effects and antioxidant properties. Since the oxidative stress is strongly linked with amyloid plaques formation and tau hyperphosphorylation, these active compounds were tested in vitro in two cellular models to evaluate their effects in these important AD hallmarks.

***Streptomyces* Metabolites In Vitro Activity over A $\beta$  Metabolism.** BACE1 is responsible of the insoluble and toxic A $\beta$  production and its inhibition is considered an

important target in AD pathology (Yan and Vassar 2014). Firstly, an in vitro assay was performed to evaluate the ability of the two compounds to inhibit BACE1 activity. Using a fluorescent resonance energy transfer assay, we studied whether **1** and **2** could regulate BACE1 activity. In this assay the enzyme and the substrate are co-incubated and the fluorescence emitted is related to the total enzymatic activity. For this assay concentrations tested were 5, 1 and 0.1  $\mu\text{M}$  of compound **1**, which previously had been demonstrated to display no cytotoxicity, and 0.01  $\mu\text{M}$  of compound **2**, due to the previously described cytotoxic activity over several cell lines and primary cortical neurons (Liu, Cui et al. 2005; Leiros, Alonso et al. 2014). Both compounds produced a significant BACE1 inhibition, resulting in a decrease of the enzyme activity of  $13.7 \pm 2.8\%$  ( $p < 0.05$ ) with compound **2**, and of  $33.6 \pm 4.0\%$  ( $p < 0.001$ ) and  $29.3 \pm 1.9\%$  ( $p < 0.001$ ) with compound **1** at 5 and 1  $\mu\text{M}$  respectively. No significant diminution was observed for compound **1** at the lowest concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  (Fig. 2A).



**Figure 1. BACE inhibition and A $\beta$  decrease induced by compounds derived from *Streptomyces*.**

**(A)** The ability of compound **1** and **2** to inhibit BACE1 were studied in an in vitro assay and compared to a commercial inhibitor. **(B)** In vivo treatments with compound **1** at 0.4 and 0.04 mg/kg produce a non-significant decrease of A $\beta$ 42 relative to the control group in soluble and insoluble brain fractions. Results are presented as percentage. \* ( $p < 0.05$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ). Data are mean  $\pm$  SEM of 3 or more independent experiments performed in duplicate.

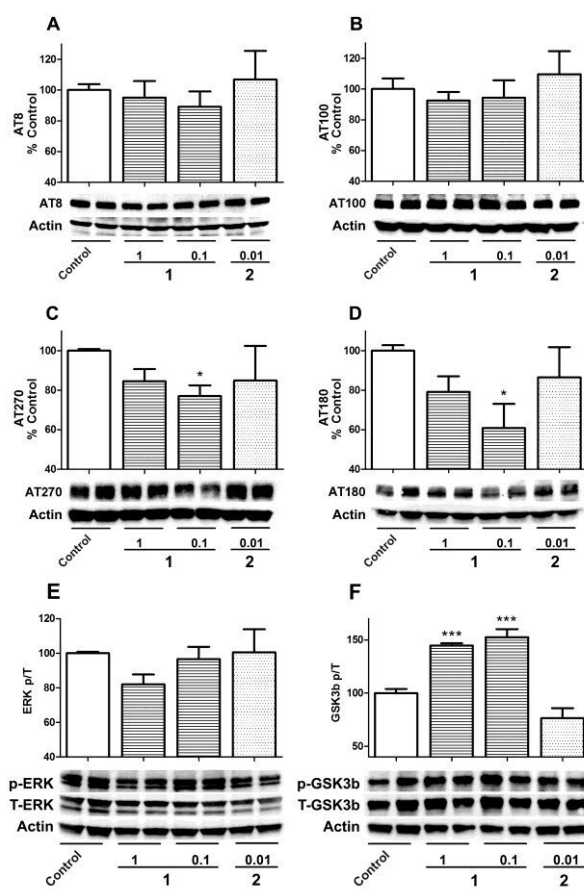
The effects of the compounds on A $\beta$  metabolism were also evaluated in BE(2)-M17 human neuroblastoma cells. This cellular line has recently been characterized with APP-cleavage studies that showed their ability to endogenously express key components of the amyloidogenic pathway (Macias, Gonzales et al. 2014). After cell differentiation with retinoic acid for 4 days, cells were treated with compound **1** (1 and 0.1  $\mu\text{M}$ ) and

compound **2** (0.01  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. A $\beta$  levels were measured in culture media with a commercial kit and results were expressed as percentage of control without treatment. Unfortunately, although compound **1** showed BACE1 activity inhibition neither of the compounds decreased A $\beta$  production in BE(2)-M17 cells (Fig.2B).

**Modifications of Phosphorylated Tau Expression by Anhydroexfoliamycin (1).** Tau is an important protein in the binding, assembling and stabilization of microtubules. In some pathology like AD, tau appears hyperphosphorylated, producing a loss of structure in microtubules and the formation of tau aggregates that induces neuronal death and memory deficits. The SH-SY5Y-TMHT441 cell line contains two human mutations, V337M and R406W, that promote tau phosphorylation at residues Thr231 and Ser396, Ser406 and imitate the tau hyperphosphorylation observed in human tauopathologies. This cell line has been proposed as a screening tool for the study of this kind of diseases and the kinases implicated on them (Loffler, Flunkert et al. 2012), therefore these neuroblastoma cells were used to analyze the effects of these two *Streptomyces*-derived metabolites on phosphorylated tau levels and related kinases expression. Cells were differentiated for 7 *div* with 10  $\mu\text{M}$  retinoic acid after they had been treated with the compounds for 48 h. Following the incubation cells were lysed and cytosolic fractions were used for western blotting to assess the expression of phosphorylated tau residues.

Tau hyperphosphorylation was studied with four specific antibodies for different phosphorylated residues: AT8 (pSer202), AT100 (pThr212 and pSer214), AT270 (pThr181) and AT180 (pThr231 and pSer235) and as a control an antibody which recognized total tau protein levels. Results were expressed in percentage of untreated control. No significant effects were observed in any of the phosphorylated tau residues studied with compound **2** treatment. However, while compound **1** produced no differences in tau residues expression recognized by AT8 or AT100 antibodies (Fig. 3A and 3B), AT270 signal decreased by  $23.0 \pm 5.4\%$  ( $p < 0.05$ ) when cells were treated with 0.1  $\mu\text{M}$  (Fig. 3C), and by  $39.1 \pm 12.2\%$  ( $p < 0.05$ ) in AT180 residues (Fig. 3D), but in contrast no effect was observed when neurons were incubated with this molecule at 1  $\mu\text{M}$ . No changes in total tau expression were observed with any of the two *Streptomyces* derived compound (data not shown). This lack of effect at higher concentrations was

also previously reported in antioxidant studies where lower concentrations were generally more effective (Leiros, Alonso et al. 2014).



**Figure 2: In vitro effects of compounds derived from *Streptomyces* on tau and kinases expression in SH-SY5Y-TMHT441 cells.** Cells were treated with compounds 1 and 2 at  $\mu\text{M}$  concentrations and their lysates were analyzed by western blot experiments, measuring tau expression with AT8 (A), AT100 (B), AT270 (C), and AT180 antibodies (D) for tau studies and ERK (E) and GSK3 $\beta$  antibodies (F) for kinases studies. Data are expressed as percentage of the non-treated control, being the result of mean  $\pm$  SEM of 3 or more independent experiments performed in duplicate. Statistical differences were analyzed by ANOVA \* ( $p < 0.05$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

**In Vitro Effects over Kinases Expression.** Since some kinases belonging to the proline-directed protein kinases group such as ERK1/2 or GSK3 $\beta$  are implicated in tau hyperphosphorylation in AD, their expression was analyzed. For these assays phosphorylated and total kinases levels were measured to calculate the final ratio.

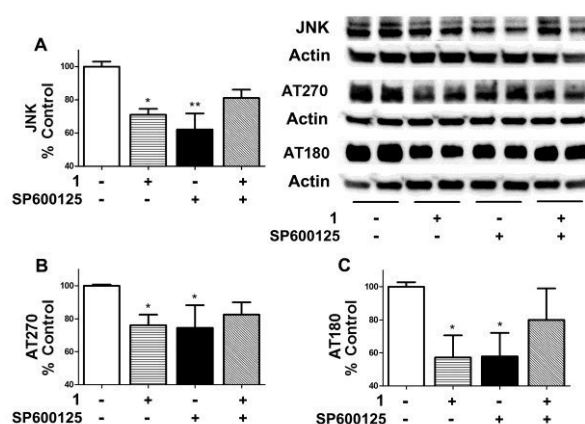
The phosphorylated isoform of ERK1/2 corresponds to the active isoform that phosphorylates tau proteins. Thus, a decrease in the ratio of ERK entails a reduction of tau phosphorylation, but in this case neither of the treatments was effective on ERK blockage. Only compound **1** produced a slight reduction of a  $17.9 \pm 5.6\%$  respective to the untreated control, but it was not significant (Fig. 3E).

Furthermore, GSK3 $\beta$  expression was also studied by the analyses of the inactive isoform phosphorylated on Ser9 and the total protein levels. In this case, an increase of GSK3 $\beta$  ratio implies an elevation of the inactive isoform and consequently the inhibition of the kinase. Western blot experiments showed a great increase in the GSK3 $\beta$  ratio compared to basal conditions when cells were treated with compound **1**. As can be observed in figure 3F, both concentrations, 1 and 0.1  $\mu\text{M}$ , increased the inactive isoform by  $44.6 \pm 2.3\%$  ( $p < 0.001$ ) and by  $52.5 \pm 7.6\%$  ( $p < 0.001$ ) respectively. Once again, no effects on GSK3 $\beta$  were observed in the treatments carried out with compound **2**.

Since compound **1** produced a diminution of tau phosphorylation on sites Thr231, Ser235 and Thr181 which have been related to JNK action in SH-SY5Y-TMHT441 cells (Loffler, Flunkert et al. 2012), we compared the effect of compound **1** with the specific JNK inhibitor SP600125. SP600125 at 1  $\mu\text{M}$  and compound **1** at 0.1  $\mu\text{M}$ , corresponding to the concentration at which tau phosphorylation was reduced, were incubated alone and as co-incubations. Phosphorylated tau (AT180 and AT270) and JNK expressions were evaluated and as can be seen in figure 4A, the JNK inhibitor produced a decrease of  $37.9 \pm 9.6\%$  ( $p < 0.01$ ) in JNK expression, while compound **1** led to a reduction of  $29.0 \pm 3.5\%$  ( $p < 0.05$ ), however, the co-incubation of both reversed the effect of the compounds separately. The same effect was observed in phosphorylated tau proteins, when the inhibitor SP600125 or the compound **1** were incubated alone, a decrease on hyperphosphorylated tau expression was observed, but the combination of both compounds once again reversed the effect. In figure 4 can be observed that compound **1** reduced the AT270 signal by  $23.0 \pm 5.4\%$  ( $p < 0.01$ ) and the AT180 signal by  $39.1 \pm 12.2\%$  ( $p < 0.05$ ). Similarly, the JNK inhibitor produced a signal decrease of  $25.5 \pm 13.8\%$  ( $p < 0.05$ ) and  $42.1 \pm 12.4\%$  ( $p < 0.05$ ) for AT270 and AT180 respectively, while co-incubation



of both compounds reduced this inhibition by  $17.5 \pm 7.4\%$  for AT270 and by  $20.0 \pm 19.0\%$  for AT180 with no significant differences to the untreated control (Fig. 4B and 4C).

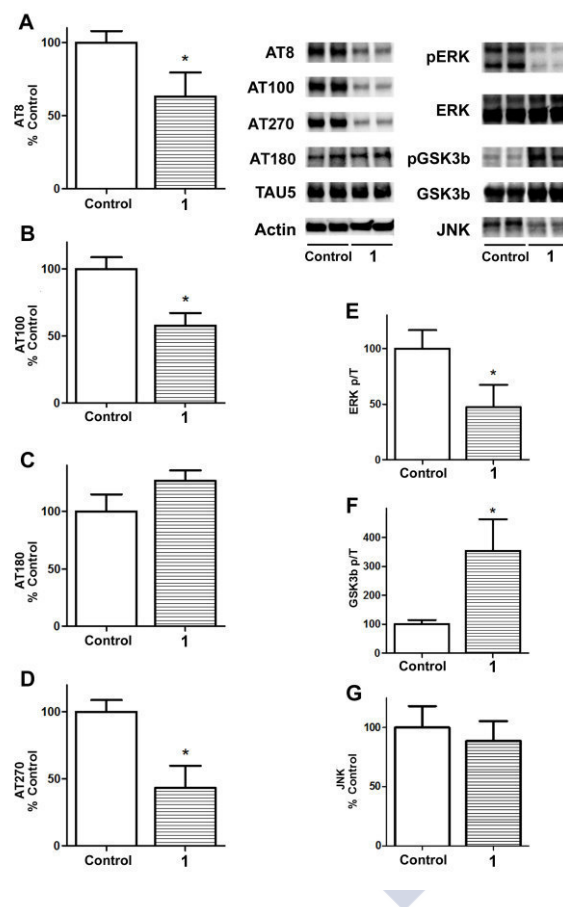


**Figure 3: Anhydroexfoliamycin (1) acts on JNK pathway.** Effects of compound **1** and the specific JNK inhibitor SP600125 on JNK and tau expression were compared by protein expression studies with western blot of phosphorylated JNK (A), AT270 (B) and AT180 (C). Results are presented as percentage of the untreated control. \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ). Data are mean  $\pm$  SEM of 3 or more independent experiments performed in duplicate.

**Anhydroexfoliamycin (1) Effects on AD Pathology in 3xTg-AD mice.** In view of the beneficial effects of compound **1** over phosphorylated tau residues and the clear inhibition of GSK3 $\beta$ , we decided to test the potential effect of this compound in an in vivo model for AD, the triple-transgenic mice model for Alzheimer (3xTg-AD) (Oddo, Caccamo et al. 2003). Animals were treated by intraperitoneal injection (IP) twice a week for a month. Anhydroexfoliamycin was administered at 0.4 and 0.04 mg/kg dissolved in saline solution. After treatments, brain samples were collected for A $\beta$  and hyperphosphorylated tau analysis. Once again, experiments showed that the elevated dose (0.4 mg/kg) was less effective than the lower one (0.04 mg/kg) and only produced a slightly decrease in tau phosphorylated Ser202 residue (data not shown). Nevertheless, the lowest concentration 0.04 mg/kg reduced AT8 levels by  $36.9 \pm 16.4\%$  ( $p < 0.05$ ), AT100 levels by  $42.2 \pm 9.5\%$  ( $p < 0.05$ ) and AT270 levels by  $56.7 \pm 16.5\%$  ( $p < 0.05$ ). No significant effects were observed with AT180 and total tau antibodies (Fig. 5 A-D).



In contrast with the observed in vitro tests, levels of the active JNK isoform did not significantly vary upon treatment with compound **1**, but as in the cellular model the inactive isoform of GSK3 $\beta$  was also increased in vivo with duplicated levels ( $p < 0.05$ ). In addition, surprisingly the active isoform of ERK was halved, decreasing by  $52.7 \pm 20.1\%$  ( $p < 0.05$ ) relative to control while no significant differences were observed in vitro (Fig. 5 E-G).



**Figure 4: In vivo effects of anhydroexfoliamycin (1) over tau and kinases expression.** The chronic treatment with compound **1** at 0.04 mg/kg (IP) was studied. Brains lysates were analyzed by western blot experiments, measuring tau expression with AT8 (**A**), AT100 (**B**), AT270 (**C**) and AT180 (**D**) antibodies for tau studies and ERK (**E**), GSK3 $\beta$  (**F**) and JNK (**G**) antibodies for kinases studies. Data are expressed as percentage of the non-treated control 3xTg-AD, being the result of mean  $\pm$  SEM of 3 experiments performed in duplicate. Student's t-test was used to analyze differences between control and treatment (\* $p < 0.05$ ).

Finally, A $\beta$  levels in soluble and insoluble fractions were analyzed with a specific ELISA kit. Although it seems that there is a marked tendency to reduce A $\beta$  levels with the treatment, the high variability found in 3xTg-AD controls results in no significant differences between controls and treatments (Fig. 2B). Nevertheless these results suggest a potential inhibitory trend and are consistent with the inhibition of BACE1 observed with the FRET assay. Differences to the results obtained with the BE(2)-M17 cell line, where no changes in A $\beta$  levels were observed, can be explained with the different A $\beta$  origin and processing, since 3xTg-AD mice and the FRET assay are based on the same APP human mutation, while in contrast BE(2)-M17 cells do not harbor APP mutations.

Since oxidative stress and mitochondrial dysfunction are strongly linked to neurodegenerative processes, neuroprotective compounds are interesting molecules worth pursuing as potential AD drug candidates. Thus, anhydroexfoliamycin (**1**) and undecylprodigiosin (**2**) were studied in cellular models for AD and while compound **2** did not show any inhibitory effects on tau phosphorylation or kinases and only produced a slight inhibitory effect of BACE1, compound **1** was able to reduce phosphorylated tau, to inhibit GSK3 $\beta$ , JNK and BACE1 *in vitro*. The antioxidant therapeutic approach includes two strategies, the use of exogenous antioxidants, that has demonstrated a poor efficacy in AD treatments, and the use of Nrf2 inducers with a greater potential (Anand, Gill et al. 2014). In a previous report, undecylprodigiosin (**2**) had no effects on Nrf2 translocation and it was proposed as a direct scavenger for free radicals, while anhydroexfoliamycin (**1**) induced the Nrf2 translocation (Leiros, Alonso et al. 2014). The results of the current study, where compound **2** has shown no effects on AD pathological hallmarks and compound **1** has shown a potent activity against them, seem to agree with the fact that Nrf2 inducers are better therapeutic options than exogenous antioxidants with more complete effects.

The effect of compound **1** on phosphorylated tau residues observed with the line SH-SY5Y-TMHT441 can be explained by the increase of the inactive isoform of GSK-3 $\beta$  levels by approximately 50%, and also by the observed inhibition of JNK, two kinases responsible of tau phosphorylation.

In addition, the competitive in vitro assays between a specific JNK inhibitor and compound **1** have shown that the JNK pathway is mainly responsible of tau phosphorylation in residues Thr231, Thr181 and Ser235 and that compound **1** interacts with JNK function. Meanwhile the compound alone is able to reduce tau phosphorylation and to inhibit JNK, the presence of SP600125 blocks these effects. SP600125 is a specific inhibitor of JNK that acts by a reversible ATP-competitive inhibition, which means that the inhibitor occupies the ATP-binding site of JNK, blocking its activation (Cui, Zhang et al. 2007). It remains to study whether or not the compound acts in the same binding site and how the interaction of both compounds prevents the effect on JNK phosphorylation. JNK inhibitors, besides reducing the levels of tau phosphorylation in tau pathologies (Cui, Zhang et al. 2007), have been described to prevent synaptic dysfunction (Sclip, Tozzi et al. 2014), APP phosphorylation and to induce APP degradation (Colombo, Bastone et al. 2009), therefore inhibition of JNK is an interesting therapeutic target in AD.

The promising results obtained with compound **1** in vitro led us to perform in vivo experiments where we confirmed these positive results in a chronic treatment. As observed in vitro, tau phosphorylation levels were decreased and the GSK3 $\beta$  inactive form was augmented. However, the effect on MAPK pathway was different in vitro, where no changes were observed in the expression of ERK but JNK was decreased, from in vivo, where the compound also inhibited ERK kinase. In AD human pathology, no mutations related to tau pathology have been described (Kim, Yeo et al. 2014), thus, research models had used diverse mutations to mimic the pathology. Differences in results obtained in the cellular and animal models could be due to the variations in the mutations used in these two models, where the SH-SY5Y-TMHT441 cell line presents the mutations V337M and R406W (Loffler, Flunkert et al. 2012) and the 3xTg-AD animal model harbors the P301L mutation (Oddo, Caccamo et al. 2003). The three mutations are observed in familiar cases of frontotemporal dementia and are linked to chromosome 17. But while P301L affects the exon 10, V337M and R406W are mutations outside exon 10. The mutations in exon 10 are associated with tau isoforms with 4 microtubule binding repeats and filaments with longer periodicities than those observed

in the paired helical filaments (PHFs) of AD and moreover they are also associated with tau glial isoforms, whereas mutations outside exon 10 contain the six tau isoforms observed in AD and their filaments are like PHFs found in AD that induce tau phosphorylation in different sites and restricted to neuronal tau (Nacharaju, Lewis et al. 1999).

In A $\beta$  related experiments differences between in vitro and in vivo assays were also reported. While no effects were detected in A $\beta$  levels in BE(2)-M17 cells, it seems that A $\beta$  inhibition trend is observed in 3xTg-AD treated animals being in agreement with the BACE1 inhibition. BE(2)-M17 cells are not based on AD mutations, otherwise this model shows endogenous amyloidogenic properties after retinoic acid differentiation with A $\beta$  production (Macias, Gonzales et al. 2014). BACE1 inhibition assay used a substrate based on APP Swedish mutation which is also harbored in 3xTg-AD mice. Thus, we can conclude that the differences in A $\beta$  levels results are due to the different models employed and that the effect of anhydroexfoliamycin (**1**) on AD pathology induced by the Swedish mutation is very promising through the inhibition of BACE1 and the reduction of A $\beta$  levels in vivo. Further studies increasing the number of animals in each group might reduce the variability of 3xTg-AD controls and reach statistical significance for the differences observed.

Despite these encouraging results, it should be noted that during treatment, the test animals seemed very nervous and frightened, reaching sometimes aggressive states. After the administration period, a Morris water maze test (MWM) was carried out, but no positive results were obtained (unpublished data). MWM is one of the most frequently tools used in behavioral neuroscience to evaluate spatial memory impairment and the effects of compounds for improvement of cognitive capabilities in AD models (Puzzo, Lee et al. 2014). The state of excitation during treatments mentioned above and training probably affected the capacity of mice to learn and memorize the position of the platform used in these assays.

These *Streptomyces* secondary metabolites are interesting structures in the neurodegenerative research area. Undecylprodigiosin (**2**) is an exogenous antioxidant

with no effect on AD hallmarks and anhydroexfoliamycin (**1**), besides being an endogenous antioxidant, provides a complete protection against AD pathology through kinases modulation, reducing tau phosphorylation and A $\beta$  insoluble levels. It is important to emphasize that in all experiments, in vitro and in vivo, the most effective concentration was the lower one. Therefore, it remains to be studied if the adverse effects on behavior could be eliminated by lowering the administration dose, without thereby losing the beneficial effects of treatment.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Test Compounds.** The tested compounds anhydroexfoliamycin (**1**) and undecylprodigiosin (**2**) were provided by the Marine Biodiscovery Centre (Department of Chemistry, University of Aberdeen). These compounds were isolated upon large scale fermentation in ISP2 medium (5 L each) and subjecting the crude extract to multiple steps of liquid/liquid fractionation, SiO<sub>2</sub>, Sephadex LH-20 and RP-C-18 chromatography. The structure elucidation of these compounds was based on their HRESIMS analysis as well as direct comparison with reported NMR spectral data as described previously (Potterat, Zahner et al. 1993; Liu, Cui et al. 2005). Both compounds were 95 % pure based on their LC-MS and NMR analyses.

**Neuroblastoma Lines and Treatments.** SH-SY5Y human neuroblastoma tau441 (SH-SY5Y-TMHT441) was kindly provided by QPS Austria GmbH (Loffler, Flunkert et al. 2012) and neuroblastoma cell line BE(2)-M17 was purchased from the European Collection of Cell Cultures (ATCC Salisbury, UK) (Macias, Gonzales et al. 2014). Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mg/ml gentamicin, glutamax and non-essential amino acids. For SH-SY5Y-TMHT441 maintenance 0.6% geneticin was added to culture medium. Cells were dissociated weekly using 0.05% trypsin/EDTA. All cell culture reagents were supplied by Life technologies (Paisley, UK).

For cell treatments SH-SY5Y-TMHT441 and BE(2)-M17 cells were seeded in 6 well-plates at a 60% confluence to differentiate them with retinoic acid (10  $\mu$ M) for 7 or 4 div

respectively before experimental procedures. Differentiated cells were treated with compounds A (1 and 0.1  $\mu\text{M}$ ) and U (0.01  $\mu\text{M}$ ) for 48 h or 24 h.

**Animals and Treatments.** All animal procedures were conducted according to the principles approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad de Santiago de Compostela in the protocol 011/14 (AE-LU-002). Triple transgenic mice for Alzheimer's disease (3xTg-AD mice) male and female between 7 and 10 month old were used. Food and water was supplied ad libitum. All specimens weighed 22-34 g and were kept in controlled conditions. Mice were singly housed. Health condition was controlled daily. 3xTg-AD colonies were bred and kept in Universidad de Santiago de Compostela animal care facilities. Animals were obtained from Dr Giménez-Llort (Universidad Autonoma de Barcelona) and Dr Laferla (University of California, Irvine).

Animals were grouped in three treatment groups. A control group treated with saline solution and vehicle and a second and a third group treated with 0.4 mg/kg and 0.04 mg/kg of compound **1** respectively. Administrations were performed by intraperitoneal injection (IP) twice a week for a month. Behavioral analysis was performed prior to animal sacrifice for brain samples collection.

**Protein Extraction.** Cells were washed with cold PBS after treatments and lysed in a 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA buffer solution, containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany). Cell lysates were collected and centrifuged at 12000 rpm at 4 °C for 20 min to separate the cytosolic fraction. Bradford assay was used to quantify total protein concentration.

Brain samples were lysed in a 2% sodium dodecyl sulfate, containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany). Samples were vortexed and sonicated in three cycles and then centrifuged at 13200 rpm at 4 °C for 60 min to obtain the soluble fraction. The resulting pellet was homogenized again in 70% formic acid and processed as previously mentioned to obtain the insoluble fraction. Direct detect technology (Millipore, Darmstadt, Germany) was used to determine total protein

concentration in both fractions, soluble and insoluble. Insoluble fraction was neutralized with a 1 M Tris-Base, 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dibasic buffer solution before analyses.

**BACE Inhibition.** The BACE 1 FRET assay kit (PanVera, Madison, WI, USA) was used for measuring the  $\beta$ -secretase inhibition ability of the compounds, following the commercial protocol. This kit provides a BACE1 substrate with two fluorophores, a fluorescent donor and a quenching acceptor, that only emit fluorescence when the enzyme BACE1 cleaves the substrate and the quenching acceptor is separated from the donor. Enzyme activity is linearly related to the increase in fluorescence. Fluorescence measurement was carried out using a fluorescence plate reader where excitation was monitored at 545 nm and emission at 585 nm.

**A $\beta$  Determination.** A $\beta$ 42 levels were studied in cell lysates and in the soluble and insoluble fractions obtained from mice brain samples that were processed following the commercial protocol of ELISA kit human A $\beta$ 42 (Invitrogen, Camarillo, CA, USA).

**Western Blotting.** Cellular and brain lysates containing 20  $\mu$ g of total protein were dissolved in gel loading buffer and samples were electrophoresed through a 4-20% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (Biorad, Hercules, CA, USA) and transferred onto PVDF membranes (Millipore, Darmstadt, Germany). The membrane blocking and antibody incubation was performed using the Snap i.d. protein detection system. The immunoreactive bands were detected using the Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate or Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) and the Diversity 4 gel documentation and analysis system (Syngene, Cambridge, U.K.). Chemiluminescence was measured with the Diversity GeneSnap software (Syngene, Cambridge, U.K.). Primary antibodies are summarized in table 1. Protein signal was corrected by the structural protein actin and the ratio phosphorylated *versus* total was calculated to verify the activation or inactivation of kinases. In order to compare all results, they were always expressed in percentage *versus* control without treatment.



**Table 2. Primary Antibodies used for Western Blot Assays.**

<b>Antibody</b>	<b>Immunogen</b>	<b>Host</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source</b>
<b>AT8</b>	Peptide with phospho-S199/S202/T205	Mouse	1:1000	Pierce
<b>AT100</b>	Peptide with phospho-S212/T214	Mouse	1:1000	Pierce
<b>AT270</b>	Detects PHF-tau (Thr181)	Mouse	1:1000	Pierce
<b>AT180</b>	A phospho specific peptide corresponding to human tau (Ser235)	Rabbit	1:1000	ABCAM
<b>TAU-5</b>	Detects level of tau	Mouse	1:1000	Millipore
<b>Phospho ERK1/2</b>	Recognizes 42–44 kD phospho ERK1/2	Mouse	1:1000	Cell signaling
<b>Total ERK</b>	Recognizes 42–44 kD ERK	Mouse	1:1000	Cell signaling
<b>Phospho GSK-3b</b>	Phosphoepitopes Ser 9 of GSK-3b	Rabbit	1:10000	Millipore
<b>GSK-3b</b>	Recognizes 47 kD GSK-3b proteins	Rabbit	1:1000	Millipore
<b>Phospho-JNK</b>	Phosphorylated Human JNK/SAPK (pT183/pY185) Peptide	Mouse	1:500	BD
<b>Actin</b>	C-terminal actin fragment, clone C4	Mouse	1:20000	Millipore

**Statistical Analysis.** All the results are expressed as means  $\pm$  SEM of three or more experiments. Statistical comparison was performed by one way ANOVA with Dunnett's posthoc analysis or Student's t-test.  $p$  values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

#### AUTHOR INFORMATION

##### **Corresponding Author**

\* Correspondence Author: Luis M Botana, Dpto de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27003 Lugo, Spain. e-mail:Luis.Botana@usc.es, Phone/Fax: +34982822233.

##### **Notes**

The authors declare no competing financial interest.

##### **Funding Sources**



The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofunded-grants: from CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía y Competitividad, AGL2012-40185-CO2-01 and Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, GRC2013-016, and through Axencia Galega de Innovación, Spain, ITC-20133020 SINTOX, IN852A 2013/16-3 MYTIGAL; from CDTI under ISIP Programme, Spain, IDI-20130304 APTAFOOD; from the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA – Research Executive Agency (FP7/2007-2013) under grant agreement Nos. 265409  $\mu$ AQUA, 315285 CIGUATOOLS and 312184 PHARMASEA.

#### ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the contribution of the Institute of Applied Science at the University of the South Pacific in Suva, Fiji for assistance in the collection of the sponge material. The Scottish University Life Science Alliance is acknowledged for their funding of the Marine Biodiscovery Centre Compound Library. We thank Dr Gimenez-Llort and Dr Laferla for providing the 3xTg-AD mice.

#### ABBREVIATIONS

AD, Alzheimer's disease; A $\beta$ , amyloid-beta; APP, amyloid precursor protein; ARE, antioxidant response element; BACE,  $\beta$ -secretase; Cdk5, cyclin-dependent kinase 5; GSK3 $\beta$ , glycogen synthase kinase-3beta; MAPK, mitogen-activated protein kinases; MWM, Morris water maze test; NFTs, neurofibrillary tangles; Nrf2, nuclear receptor factor 2; PHFs, paired helical filaments; ROS, reactive oxygen species.

#### REFERENCES

1. Mattson, M.P., *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 631-9.
2. Cardenas, A.M., et al., *Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's disease and Down syndrome*. Arch Med Res, 2012. **43**(8): p. 645-54.
3. Martin, L., et al., *Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease*. Ageing Res Rev, 2013. **12**(1): p. 289-309.
4. Savelieff, M.G., et al., *Untangling amyloid-beta, tau, and metals in Alzheimer's disease*. ACS Chem Biol, 2013. **8**(5): p. 856-65.

5. Borza, L.R., *A review on the cause-effect relationship between oxidative stress and toxic proteins in the pathogenesis of neurodegenerative diseases*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2014. **118**(1): p. 19-27.
6. Li, J., et al., *Oxidative stress and neurodegenerative disorders*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(12): p. 24438-75.
7. Andersen, J.K., *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S18-25.
8. Wang, X., et al., *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(8): p. 1240-7.
9. Poljsak, B. and I. Milisav, *Aging, Oxidative Stress and Antioxidants. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. 2013.
10. Padurariu, M., et al., *The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. Psychiatr Danub, 2013. **25**(4): p. 401-9.
11. Swerdlow, R.H., J.M. Burns, and S.M. Khan, *The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives*. Biochim Biophys Acta, 2013.
12. Berridge, M.J., *Calcium hypothesis of Alzheimer's disease*. Pflugers Arch, 2010. **459**(3): p. 441-9.
13. Craig, L.A., N.S. Hong, and R.J. McDonald, *Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease*. Neurosci Biobehav Rev, 2011. **35**(6): p. 1397-409.
14. Maccioni, R.B., et al., *The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease*. Arch Med Res, 2010. **41**(3): p. 226-31.
15. Karran, E., M. Mercken, and B. De Strooper, *The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(9): p. 698-712.
16. Reitz, C., *Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 369808.
17. Anand, R., K.D. Gill, and A.A. Mahdi, *Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future*. Neuropharmacology, 2014. **76 Pt A**: p. 27-50.
18. Medina, M. and J. Avila, *New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy*. Biochem Pharmacol, 2014. **88**(4): p. 540-7.
19. Wischik, C.M., C.R. Harrington, and J.M. Storey, *Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease*. Biochem Pharmacol, 2014. **88**(4): p. 529-39.
20. Joshi, G. and J.A. Johnson, *The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases*. Recent Pat CNS Drug Discov, 2012. **7**(3): p. 218-29.
21. Leiros, M., et al., *Mitigation of ROS insults by Streptomyces secondary metabolites in primary cortical neurons*. ACS Chem Neurosci, 2014. **5**(1): p. 71-80.
22. Yan, R. and R. Vassar, *Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy*. Lancet Neurol, 2014. **13**(3): p. 319-29.
23. Liu, R., et al., *Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete Saccharopolyspora sp. nov.* Arch Pharm Res, 2005. **28**(12): p. 1341-4.
24. Macias, M.P., et al., *A cellular model of amyloid precursor protein processing and amyloid-beta peptide production*. J Neurosci Methods, 2014. **223**: p. 114-22.

25. Loffler, T., et al., *Stable mutated tau441 transfected SH-SY5Y cells as screening tool for Alzheimer's disease drug candidates*. J Mol Neurosci, 2012. **47**(1): p. 192-203.
26. Oddo, S., et al., *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction*. Neuron, 2003. **39**(3): p. 409-21.
27. Cui, J., et al., *JNK pathway: diseases and therapeutic potential*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(5): p. 601-8.
28. Sclip, A., et al., *c-Jun N-terminal kinase has a key role in Alzheimer disease synaptic dysfunction in vivo*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1019.
29. Colombo, A., et al., *JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 2009. **33**(3): p. 518-25.
30. Kim, D.H., et al., *Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease*. Gene, 2014. **545**(2): p. 185-93.
31. Nacharaju, P., et al., *Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations*. FEBS Lett, 1999. **447**(2-3): p. 195-9.
32. Puzzo, D., et al., *Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines*. Biochem Pharmacol, 2014. **88**(4): p. 450-67.
33. Potterat, O., et al., *Metabolic products of microorganisms. 264. Exfoliamycin and related metabolites, new naphthoquinone antibiotics from Streptomyces exfoliatus*. J Antibiot (Tokyo), 1993. **46**(2): p. 346-9.



## 5. Gracilins: *Spongionella*-derived promising compounds for Alzheimer disease

### RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa que está estrechamente ligada al estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial. El origen poco claro de la EA llevó a los investigadores a estudiar varias dianas farmacológicas y se ha propuesto que un fármaco multi-diana sería un candidato más prometedor. Las gracilinas son compuestos diterpenoides derivados de esponjas que han sido descritos como antioxidantes, actuando a través de dianas mitocondriales y a través de la inducción de la translocación de Nrf2. En este trabajo se han estudiado las gracilinas H, A y L y la tetrahydroaplisulphurina-1 en dos modelos celulares de neuroblastoma. En primer lugar la línea celular BE(2)-M17 se utilizó como modelo para estudios del metabolismo de la APP y segundo, las células SH-SY5Y-TMHT441 se usaron en el *screening* de fármacos para la EA con diana en la fosforilación de la proteína tau. Los experimentos *in vitro* mostraron que las gracilinas fueron capaces de inhibir la BACE1, reducir la hiperfosforilación de tau e inhibir la cinasa ERK. Estos resultados positivos nos llevaron a probar las gracilinas H y L en ratones 3xTg-AD. Después del tratamiento crónico realizado por inyección intraperitoneal, se realizó una prueba de comportamiento que indicó una tendencia positiva en el aprendizaje y la memoria espacial de los ratones tratados con estos compuestos. Además, los ensayos *in vivo* confirmaron los resultados anteriores. Los niveles de  $\beta_{A_{1-42}}$  y de tau hiperfosforilada disminuyeron después de los tratamientos y también se observó la inhibición de la cinasa ERK. Esta investigación pone de relieve nuevas actividades biológicas para las gracilinas, tales como la inhibición de las enzimas BACE1 y ERK, y proporciona más evidencias de su potencial aplicación terapéutica en enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la EA, debido a su actividad multi-diana.

## **Gracilins: *Spongionella*-derived promising compounds for Alzheimer disease**

*Marta Leirós<sup>#</sup>, Eva Alonso<sup>#</sup>, Mostafa E. Rateb<sup>+±</sup>, Wael E. Housen<sup>+§</sup>, Rainer Ebel<sup>+</sup>, Marcel Jaspars<sup>+</sup>, Amparo Alfonso<sup>#</sup>, Luis M. Botana<sup>#\*</sup>*

<sup>#</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain. <sup>+</sup> Marine Biodiscovery Centre, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Meston Walk, Aberdeen AB24 3UE, Scotland, U.K. <sup>±</sup> Pharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy, Beni-Suef University, Beni-Suef 32514, Egypt. <sup>§</sup> Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Ashgrove Road West, Aberdeen AB25 2ZD, Scotland, UK.

\* Correspondence Author: Luis M Botana, Dpto de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27003 Lugo, Spain. e-mail:

[Luis.Botana@usc.es](mailto:Luis.Botana@usc.es), Phone/Fax: +34982822233.



## Abstract

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative pathology that is strongly linked with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. The unclear origin of AD lead researchers to study several drug targets and it has been proposed that a multi-target drug would be a more promising candidate. Gracilins are sponge-derived diterpenoid compounds that have been described to act as antioxidants through mitochondrial targeting and through the induction of Nrf2 translocation. In this work gracilin H, A and L and tetrahydroaplysulphurin-1 have been studied in two neuroblastoma cellular models. First the BE(2)-M17 cell line has been used as a model for APP metabolism studies and next, SH-SY5Y-TMHT441 cells were used for AD drugs screening targeting tau phosphorylation. *In vitro* assays showed that gracilins were able to inhibit BACE1, reduce tau hyperphosphorylation and inhibit ERK. These positive results lead us to test gracilin H and L in 3xTg-AD mice. After chronic intraperitoneal treatments, the behavioral test indicated a positive trend on learning and spatial memory of mice treated with these compounds. Moreover *in vivo* assays confirmed the previous results. Amyloid- $\beta$ 42 and hyperphosphorylated tau levels were decreased after treatments and the ERK inhibition was also observed. This research highlights new bioactivities for gracilins, such as BACE1 and ERK inhibition, and provides more evidence for their potential therapeutic application in neurodegenerative diseases due to their multi-target activities, especially in AD.

**Key words:** Gracilin; *Spongionella*; Alzheimer disease; ERK; 3xTg-AD; Morris water maze.

## Introduction

Since the early 21<sup>st</sup> century the interest in marine natural products has increased considerably. Evidence of this growing importance is the publication of annual summaries with the new products that are being reported (Blunt, Copp et al. 2003; Blunt, Copp et al. 2004; Blunt, Copp et al. 2005; Blunt, Copp et al. 2006; Blunt, Copp et al. 2007; Blunt, Copp et al. 2008; Blunt, Copp et al. 2009; Blunt, Copp et al. 2010; Blunt, Copp et al. 2011; Blunt, Copp et al. 2012; Blunt, Copp et al. 2013; Blunt, Copp et al. 2014) and biannual reports of their pharmacological application (Mayer and Hamann 2002; Mayer and Hamann 2004; Mayer and Hamann 2005; Mayer, Rodriguez et al. 2007; Mayer, Rodriguez et al. 2009; Mayer, Rodriguez et al. 2011; Mayer, Rodriguez et al. 2013). Between 2001 and 2010, 8368 new compounds of marine origin were identified. About 30% of known marine natural products are derived from sponges, accounting for approximately 4800 compounds with one-third of these isolated between 2008 and 2012 (Mehbub, Lei et al. 2014). These impressive numbers are partly explained by the wide distribution and variety of habitats where these sessile organisms can be found. They have to adapt to all types of biotic and abiotic stresses (Van Soest, Boury-Esnault et al. 2012) and therefore produce a seemingly endless number of different metabolites to ensure their survival (Mollica, Locatelli et al. 2012). These metabolites have drawn the attention of many researchers in the last few years for their diverse biological effects as antibacterial, antifungal, anticancer, antiviral, anti-inflammatory, immunosuppressive, neurosuppressive or neuroprotective agents among others (Mehbub, Lei et al. 2014).

Sponge-derived metabolites have shown potent and selective activity in a range of central nervous system targets. Various compounds mimic or enhance neuronal growth factors for growth, maintenance, and cell survival such as nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Other effects observed with sponge-derived compounds are modulation of ion channels under pathological conditions and anti-neurodegenerative effects through inhibition of cholinesterase, BACE1 and protein kinases, but also cell protection from toxic molecules produced by neurodegenerative processes, opening a new perspective of drug development for neurodegenerative diseases (Grosso, Valentao et al. 2014).



Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative pathology characterized by the elevation of amyloid beta peptide (A $\beta$ ) levels inside neurons and extracellular senile amyloid plaques formation and the augmentation of tau hyper-phosphorylation and consequently their accumulation in neurofibrillary tangles (NFT), along with multiple secondary pathologies such as inflammation, oxidative stress and ionic imbalances. Altogether they lead to synaptic loss, neuronal degeneration, gliosis and finally neuronal death (Honig and Mayeux 2001; Selkoe 2001; Mattson 2004). However, an increase in oxidative stress processes is a common feature in neurodegenerative diseases that contributes to the pathological condition and appears in earlier stages (Tuppo and Forman 2001). Reactive oxygen species (ROS) are produced in mitochondria under physiological conditions, but ROS levels can increase due to mutations or environmental damage. This augmentation of ROS causes mitochondrial dysfunction which in turn produces more ROS, entering a vicious cycle. ROS are able to interact with proteins, lipids, RNA and DNA forming toxic byproducts inducing cell dysfunction and finally cell death. In AD, oxidative stress has been suggested as an enhancer of the pathology. In fact, AD is frequently preceded by mild cognitive impairment (MCI) in which oxidative damage is enhanced and no other specific AD hallmarks are yet significantly increased such as NFTs or senile plaques. In addition, oxidative stress is related to disease propagation and aggravation, due to the vicious cycle in which falls with the mitochondria, as the main ROS producer (Madeo and Elsayad 2013; Zhao and Zhao 2013; Wang, Wang et al. 2014).

Mitochondria are the main energy provider of cells. Neurons need a great amount of energy for normal functioning and hence these cells are especially susceptible to mitochondrial dysfunction (Galindo, Ikuta et al. 2010). Dysfunctional mitochondria are less effective producers of ATP but more efficient in ROS production. In addition, the expression and/or activity of enzymes involved in oxidative phosphorylation is reduced, there is a loss of calcium homeostasis and an increase of sporadic mutations in mitochondrial DNA. Altogether this results in a final apoptotic stage where molecules needed for apoptosis are activated. All these events are common factors in AD, pointing to a clear relation between oxidative stress, mitochondrial dysfunction and this neurodegenerative disease (Luque-Contreras, Carvajal et al. 2014; Wang, Wang et al.



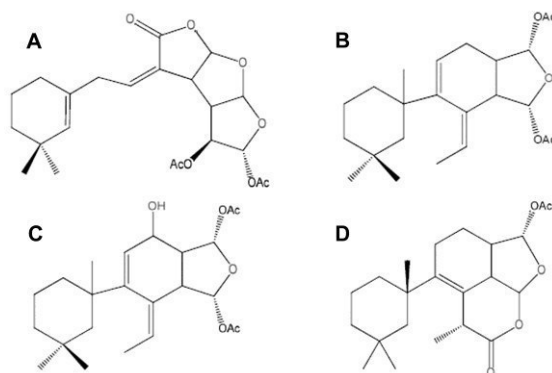
2014) and turn compounds that are able to protect the optimum mitochondrial function in valuable molecules for AD studies.

*Spongionella*-derived gracilins are interesting compounds for drug development owing to their potential anticancer effect through the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibition (Rateb, Houssen et al. 2009) and anti-inflammatory abilities by acting as phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inhibitors (Nirmal, Praba et al. 2008). Recently, we have described gracilins as antioxidants and neuroprotective molecules through Nrf2 induction and mitochondrial targeting (Leiros, Sanchez et al. 2014). Hence, the aim of this work is in-depth study of these neuroprotective effects of four compounds from the gracilin family (gracilin H, gracilin A, gracilin L and tetrahydroaplysulphurin-1) first by testing these molecules on two cellular models for AD to study the potential effect of these molecules over the main hallmarks of AD, A $\beta$  and tau hyperphosphorylation. For this purpose, we used the neuroblastoma cell line BE(2)-M17 for amyloid metabolism studies, since it has been recently described that these cells have the ability to endogenously express key components of the amyloidogenic pathway (Macias, Gonzales et al. 2014) which result in a final production of A $\beta$ <sub>40-42</sub> cleavage products that turn this cellular line into a suitable and robust tool for the screening of new therapeutic compounds with the ability to modulate the A $\beta$  production. Furthermore, the SH-SY5Y human neuroblastoma tau441 cellular line (SH-SY5Y-TMHT441) was used to analyze the effects of gracilins over tau phosphorylation. This stably transfected cellular line that over express the mutant human tau 441 has been characterized as an *in vitro* model for taupathologies studies, since the presence of the human mutations V337M and R406W rise into the presence of tau phosphorylation at AD related residues such as Thr231, Thr181 and Ser396 with the involvement of kinases as GSK-3 $\beta$ , JNK or CDK5 (Loffler, Flunkert et al. 2012). In addition, *in vivo* preliminary experiments were performed in a triple transgenic mice model (3xTg-AD) that presents mutations on presenilin 1, amyloid precursor protein and tau genes and progressively develop plaques and tangles mimicking AD pathology (Oddo, Caccamo et al. 2003). These studies complete the knowledge of the *in vitro* antioxidant effects of these compounds and their possible future application in neurodegenerative disease therapies.

## 1. Methods

### 1.1. Compounds information

Gracilins were provided by the Marine Biodiscovery Centre (Department of Chemistry, University of Aberdeen). The present work is focused on four natural compounds: gracilin H (A), gracilin A (B), gracilin L (C) and tetrahydroaplysulphurin-1 (D) (Fig. 1). All of them were isolated from the sponge *Spongionella sp.* and identified by comparison with the reported NMR spectral data as described previously (Rueda, Losada et al. 2006; Rateb, Houssem et al. 2009).



**Figure 1: Gracilin structures. (A) Gracilin H, (B) Gracilin A, (C) Gracilin L and (D) Tetrahydroaplysulphurin-1.**

### 1.2. Neuroblastoma lines and treatments

The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y tau441 (SH-SY5Y-TMHT441) was kindly supplied by QPS Austria GmbH (Loffler, Flunkert et al. 2012) and the BE(2)-M17 was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ATCC Salisbury, UK) (Macias, Gonzales et al. 2014). Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mg/ml gentamicin, glutamax and non-essential aminoacids. For SH-SY5Y-TMHT441 maintenance 0.6% geneticin was added to culture medium. Neuroblastoma cells were dissociated weekly using 0.05% trypsin/EDTA. All cell culture reagents were provided by Life technologies.

Before experiments, both cell lines were seeded at a 60% confluence to differentiate them with 10  $\mu$ M retinoic acid for 7 *div* (SH-SY5Y-TMHT441) or 4 *div* (BE(2)-M17). Differentiated cells were treated with gracilin compounds at 1 and 0.1  $\mu$ M for 48 h or 24 h.

### 1.3. Animals and treatments

3xTg-AD colonies were bred in Universidad de Santiago de Compostela animal care facilities. Animals were obtained from Dr. Giménez-Llort (Universidad Autónoma de Barcelona) and Dr. Laferla (University of California, Irvine). All animal protocols were carried out following the principles approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad de Santiago de Compostela. Male and female non-transgenic wild type (WT) and triple transgenic mice for Alzheimer disease (3xTg-AD mice) were used. The groups of animals for the experiments were formed with balanced age. For these initial experiments, and due to the compound scarcity, 3 animals per group were used. The age of 3xTg-AD animals administered with saline solution was  $9.03 \pm 0.6$  months, for the group administered with compound A  $8.7 \pm 0.7$  and  $8.67 \pm 0.3$  for the highest and lowest dose respectively and finally for compound C  $9.03 \pm 0.6$  and  $8.3 \pm 0.3$ . Mice were kept in the facilities of the animal care center of Universidad de Santiago de Compostela (Spain). Food and water was supplied *ad libitum*. All specimens weighed 20-35 g and were kept in controlled conditions. Mice were singly housed and their health condition was controlled daily.

Animals were arranged in two control groups, a non-transgenic wild type and a 3xTg-AD, and four treatment groups of 3xTg-AD mice. Since no previous *in vivo* studies were available for this family of compounds an initial protocol with two doses administered twice a week for a month was used. Control groups were treated with the vehicle dissolved in saline solution. Treatment groups were administered with 0.4 mg/kg and 0.04 mg/kg of compounds A and C. Mice were administered by intraperitoneal injection (IP). Behavioral test was performed prior to animal sacrifice for brain samples collection.

#### 1.4. Protein extraction

Protein fractions were obtained from cells and brain tissue. After treatments, neuroblastoma cells were rinsed with cold PBS and subsequently lysed in a 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA buffer solution, containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche). Cell lysates were centrifuged at 12000 rpm at 4 °C for 20 min to separate the cytosolic fraction. Bradford assay was used to quantify total protein concentration.

Brain samples were lysed in a 2% sodium dodecyl sulfate, containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche). Three cycles of vortex and sonication were

performed and then samples were centrifuged at 13200 rpm at 4 °C for 60 min to obtain the soluble fraction. Pellets were homogenized in 70% formic acid and processed as previously mentioned to obtain the insoluble fraction (13200 rpm at 4 °C for 60 min). Direct detect technology (Millipore) was used to determinate total protein concentration in both fractions, soluble and insoluble. Insoluble fraction was neutralized with a 1 M Tris-Base and 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dibasic buffer before analyses.

### 1.5. BACE inhibition

The ability of compounds to inhibit  $\beta$ -secretase was measured with the BACE 1 FRET assay kit (Panvera) following the commercial protocol. A BACE1 substrate with two fluorophores, a fluorescent donor and a quenching acceptor, is exposed to the compounds and BACE1 enzyme. This substrate only emits fluorescence when it is cleaved by BACE1 and the donor and the quenching acceptor are separated. Enzyme activity is linearly related to the fluorescent increase. Fluorescence was measured using a plate reader (545 nm excitation, 585 nm emission).

### 1.6. A $\beta$ 42 levels measurement

The levels of A $\beta$ 42 were analyzed in cell lysates, the soluble and the insoluble fractions obtained from mice brain samples. A sandwich ELISA reaction was used to detect A $\beta$ 42 following the commercial protocol of ELISA kit human A $\beta$ 42 (Invitrogen). Absorbance was measured at 450 nm in an automated plate reader.

### 1.7. Western Blotting

The expression of proteins was measured by western blot in cellular and brain lysates containing 20  $\mu$ g of total protein. Protein fractions were resolved in gel loading buffer and samples were electrophoresed through a 4-20% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (Biorad) and transferred onto PVDF membranes (Millipore). Snap i.d protein detection system was employed for blocking membranes and for antibody incubation. Diversity GeneSnap analysis system and software (Syngene, Cambridge, U.K.) was used to detect immunoreactive bands with the Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate or Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce). Primary antibodies are summarized in table 1. Protein signal was corrected by the structural protein actin and the ratio phosphorylated *versus* total protein levels was

calculated to verify the activation or inactivation of kinases. In order to compare all data, they were expressed in percentage *versus* control.

Antibody	Immunogen	Host	Dilution	Source
<b>AT8</b>	Peptide with phospho-199/S202/T205	Mouse	1:1000	Pierce
<b>AT100</b>	Peptide with phospho-S212/T214	Mouse	1:1000	Pierce
<b>AT270</b>	Detects PHF-tau (Thr181)	Mouse	1:1000	Pierce
<b>AT180</b>	Peptide with phospho-Ser235	Rabbit	1:1000	ABCAM
<b>TAU-5</b>	Detects level of tau protein	Mouse	1:1000	Millipore
<b>Phospho ERK1/2</b>	Recognizes 42–44 kD phospho ERK1/2	Mouse	1:1000	Cell signaling
<b>ERK</b>	Recognizes 42–44 kD ERK	Mouse	1:1000	Cell signaling
<b>Phospho GSK-3b</b>	Phosphoepitopes Ser 9 of GSK-3b	Rabbit	1:10000	Millipore
<b>GSK-3b</b>	Recognizes 47 kD GSK-3b proteins	Rabbit	1:1000	Millipore
<b>Actin</b>	C-terminal actin fragment, clone C4	Mouse	1:20000	Millipore

**Table 1. Primary antibodies used for Western blot assays.**

### 1.8. Cognitive test: Morris Water Maze (MWM)

To analyze spatial memory and cognitive capabilities the MWM was used for cognitive evaluation of 3xTg-AD mice (Puzzo, Lee et al. 2014). Briefly, a 122 cm diameter pool with white water was used in maintained control temperature (20-22 °C) conditions. Mice were trained to swim and find an invisible submerged platform of 12 cm of diameter in the pool using visual clues. For the MWM test, mice were trained two trials per day during at least 8 consecutive days. On each training trial, mice were placed into the tank at one of the four designated start points in a pseudorandom order. In each trial 60 s were given to each mice to locate the platform and if the mouse failed, it was guided to the platform by the operator. Probe trials were performed without platform for all groups and they were realized 1.5 h and 24 h after the last training trial. During tests all animals started from the same position and were allowed to swim for 30 s. Data were recorded using a video camera and images were analyzed with the software Tracker 4.86 (Open Source Physics). The parameters measured during the probe trials were: the number of platform crossings, latency to first cross and percent time spent in each quadrant.

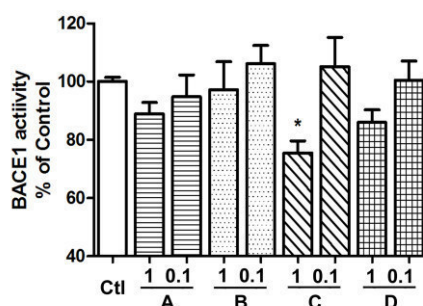
### 1.9. Statistical analysis

Data were presented as means  $\pm$  SEM of three or more experiments. Statistical analyses were performed by one way ANOVA with Dunnett's posthoc tests.  $P$  values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## 2. Results

### 2.1. Gracilin effect in cellular AD models

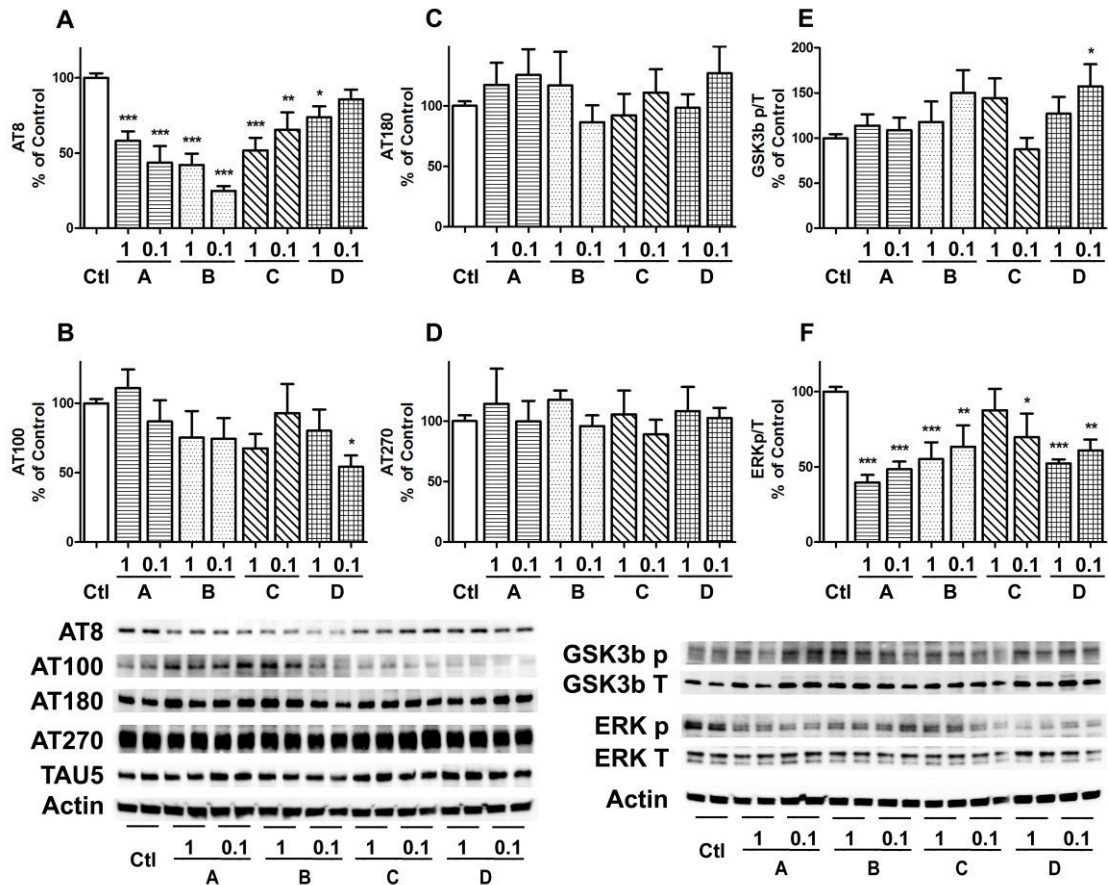
The relationship between AD and oxidative stress has led into a different approach for drug development. Thus, exogenous antioxidants and enhancers of endogenous antioxidant defenses have been tested in neurodegenerative models where the best results have been obtained with the induction of innate antioxidant protection of cells (Anand, Gill et al. 2014). Our group has previously shown the antioxidant activity of gracilins (Leiros, Sanchez et al. 2014) that led us to investigate the *in vitro* effects of gracilin H (A), A (B), L (C) and tetrahydroaplysulphurin-1 (D) on amyloid-beta ( $A\beta$ ) metabolism.  $A\beta$  is a protein that in AD appears as senile plaques due to an incorrect cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$ -secretase (BACE) and  $\gamma$ -secretase (Mattson 2004). First, the BACE1 inhibition capacity of these compounds was evaluated at 1 and 0.1  $\mu$ M with the BACE 1 FRET assay kit. Compound C at 1  $\mu$ M was the only one able to produce a significant inhibition of BACE1, decreasing its activity by  $24.6 \pm 4.2$  % ( $p < 0.05$ ). Compounds A and D at 1  $\mu$ M also reduced BACE1 activity, but not in a significant manner (Fig. 2). Following with the  $A\beta$  metabolism study, compounds were tested in the neuroblastoma cell line BE(2)-M17 that has been recently reported as a proper model for APP-cleavage pathway research (Macias, Gonzales et al. 2014). Retinoic acid differentiated cells were treated with compounds at 1 and 0.1  $\mu$ M for 24 h prior to medium collection.  $A\beta_{42}$  levels were measured in extracellular medium with the ELISA kit human  $A\beta_{42}$  but no effect was observed by the gracilins (data not shown).



**Figure 2: Inhibition effect of gracilins over BACE1.** Compounds A – D were evaluated *in vitro* at 1 and 0.1  $\mu\text{M}$ . BACE1 inhibition was studied and only compound C produced a significant enzyme inhibition. \* ( $p < 0.05$ ). Data are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments performed by duplicate.

Hyperphosphorylated tau is one of the main hallmarks of AD and the effect of gracilin compounds on this feature was studied on SH-SY5Y-TMHT441, a cell line described as an optimal tool for AD-tau screening (Loffler, Flunkert et al. 2012). Cells were differentiated as detailed in the methods section and treated with gracilins (1 and 0.1  $\mu\text{M}$ ) for 48 h. Tau expression levels were studied by western blotting and measured with several antibodies which recognize different phosphorylation sites typical in AD, such as AT8 (pSer202), AT100 (pThr212 and pSer214), AT270 (pThr181) and AT180 (pThr231 and pSer235). TAU5 was used for total tau expression analysis. As can be seen in figure 3C and 3D, no significant variations were observed between treatments and control when tau levels were measured with AT270 and AT180 and only compound D at 0.1  $\mu\text{M}$  produced a significant decrease in tau expression of  $45.6 \pm 9.3$  % ( $p < 0.05$ ) measured by AT100 (Fig. 3B). Nevertheless, when tau expression levels were studied with AT8 a large effect was observed with the whole family where all of them were able to reduce tau phosphorylated at Ser202. The largest inhibition was produced by compound B which reduced tau levels by  $57.8 \pm 7.4$  % ( $p < 0.001$ ) at 1  $\mu\text{M}$  and by  $75.2 \pm 3.3$  % ( $p < 0.001$ ) at 0.1  $\mu\text{M}$  relative to controls. The effects of compounds A and C were also pronounced. Compound A produced a decrease in tau expression levels of  $41.8 \pm 6.2$  % ( $p < 0.001$ ) at 1  $\mu\text{M}$  and  $56.4 \pm 11.0$  % ( $p < 0.001$ ) at 0.1  $\mu\text{M}$  and compound C reduced the expression by  $48.2 \pm 8.5$  % ( $p < 0.001$ ) at 1  $\mu\text{M}$  and a  $34.5 \pm 11.6$  % ( $p < 0.01$ ) at 0.1  $\mu\text{M}$ . Finally, compound D was the least efficient one achieving only a  $26.0 \pm 7.2$  % ( $p < 0.05$ ) inhibition at 1  $\mu\text{M}$  with no significant difference at 0.1  $\mu\text{M}$  (Fig. 3A).





**Figure 3: Gracilins reduce tau hyperphosphorylation levels with ERK inhibition in vitro.** SH-SY5Y-TMHT441 cells were treated with compounds A - D (1 and 0.1  $\mu$ M) and then tau and kinases expression were measured in cellular lysates by western blot. Several antibodies were used to detect tau phosphorylated in different sites measured with AT8 (A), AT100 (B), AT180 (C) and AT270 (D) antibodies. Also the expression levels of GSK3b (E) and ERK (F) were measured and analyzed as the ration between inactive/total GSK3b protein levels and active/total ERK protein levels. Results are expressed in percentage of control, being the result of mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments performed by duplicate. ANOVA statistical analysis differences are presented on the graph as \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

Tau phosphorylation is controlled by kinases and phosphatases. The imbalance between them leads to tau phosphorylation and aggregation. In AD, several kinases are involved in the disease development, such as glycogen synthase kinase-3 (GSK3), cyclin-dependent protein kinase-5 (CDK) and mitogen-activated protein kinases (MAPK) (Martin, Latypova et al. 2013). In this research we focused on GSK3b and extracellular signal-regulated kinases (ERK) that is a MAPK implicated in the pathology. The inactive

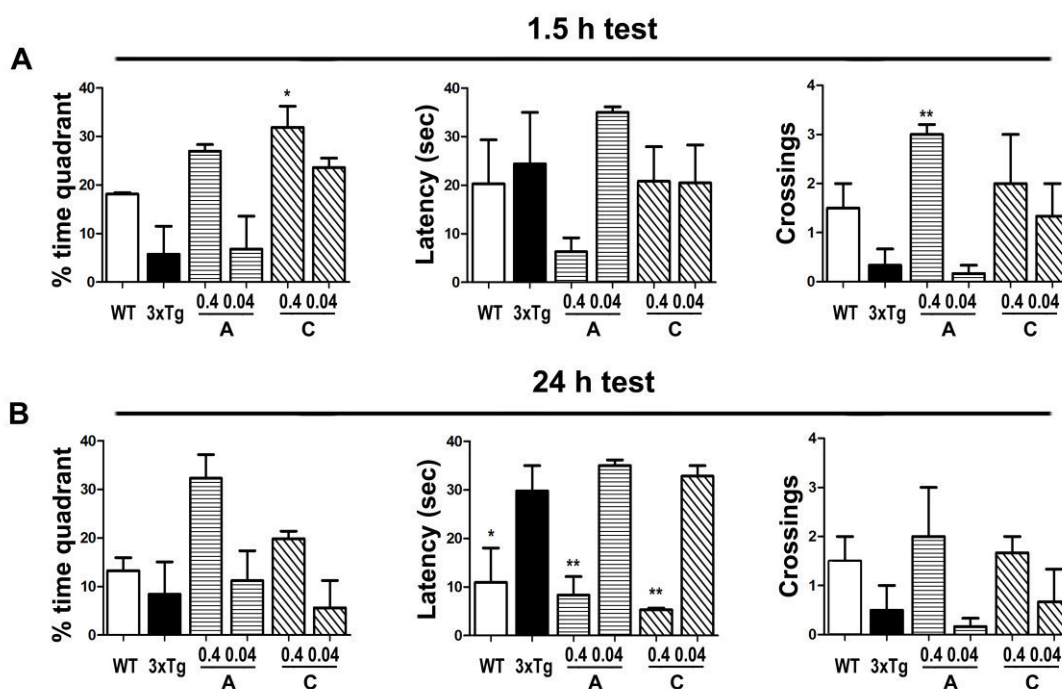


isoform of GSK3b was measured in cytosolic fractions and, as observed for AT100, only compound D displayed a statistically significant effect, in this case increasing its level by a  $57.1 \pm 24.7 \%$  ( $p < 0.05$ ) at  $0.1 \mu\text{M}$ . Compound B at  $0.1 \mu\text{M}$  and C at  $1 \mu\text{M}$  produced increments of  $50.2 \pm 25.1 \%$  and  $44.2 \pm 21.8 \%$  respectively, but they were not statistically significant (Fig. 3E). As in the AT8 experiments, the effects on ERK were more pronounced. All compounds reduced the active isoform of ERK. This time compound A was the most active and inhibited ERK by  $60.3 \pm 5.0 \%$  ( $p < 0.001$ ) at  $1 \mu\text{M}$  and  $51.40 \pm 5.0 \%$  ( $p < 0.001$ ) at  $0.1 \mu\text{M}$ . Compounds B and D at  $1 \mu\text{M}$  were also highlighted with inhibitions of  $44.7 \pm 11.1 \%$  and  $47.6 \pm 2.6 \%$  (both  $p < 0.001$ ) (Fig. 3F).

## **2.2. Gracilin family preliminary studies show AD-cognitive impairment improvement**

The large reduction in phosphorylated tau expression at Ser202 and the inhibition of ERK by gracilins prompted us to perform preliminary *in vivo* experiments. Unfortunately, due to the scarcity of these compounds, experiments could only be carried out with compounds A and C. Four 3xTg-AD treatment groups of three animals were arranged for compounds A and C that were administered by IP injection at  $0.4$  and  $0.04 \text{ mg/kg}$  twice a week for a month. WT and 3xTg-AD control mice were also administered with vehicle dissolved in saline solution. After treatments, the spatial memory of mice was analyzed by the Morris water maze (MWM) test performed short-term ( $1.5 \text{ h}$ ) and long-term ( $24\text{h}$ ). Previously to the probe trials, trainings showed no differences between control 3xTg-AD and treated 3xTg-AD where most of the animals did not reach the required criteria until the 8<sup>th</sup> training day (data not shown). MWM test was performed at  $1.5 \text{ h}$  (Fig. 4A) and  $24\text{h}$  (Fig. 4B) after the last training. However, even though the small quantity of compounds available only allowed us to test a small group of animals, a positive trend to cognitive improvement was observed with compound A and C at  $0.4 \text{ mg/kg}$ . The short term test using both compounds, at the highest concentration tested, increased the percentage of time in the quadrant, but due to the variability of the 3xTg-AD control group only compound C reached a statistically significant value. In contrast, in the long term assay both compounds at  $0.4 \text{ mg/kg}$  significantly reduced the latency time *versus* 3xTg-AD control group ( $p < 0.01$ ). These results point out that a cognitive

amelioration by gracilins at 0.4 mg/kg seems plausible and therefore an animal per group enlargement or increasing the treatment time could improve the behavioral results observed in the present work.

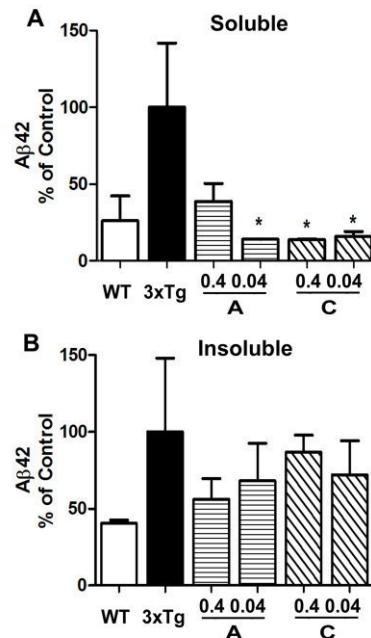


**Figure 4: Behavioral evaluation of 3xTg-AD mice after gracilins treatment.** After training trials two tests were performed at 1.5 h (A) and 24 h later (B). In both tests the percentage of time in quadrant, the latency time to cross for first time and the number of crossings over the place where the platform was located in trials were studied to evaluate the abilities of mice to learn and memorize the spatial position of the platform. Data are mean of 3 mice in each group of treatment. ANOVA statistical test was used to analyze results. \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ).

### 2.3. Gracilins treatments reduce A $\beta$ accumulation in vivo

Finally, after MWM, mice were sacrificed and brains were collected to obtain insoluble and soluble fractions. A $\beta$ 42 levels were studied in both fractions with an ELISA commercial kit. Both gracilin treatments produced a large reduction in A $\beta$  levels. In soluble fractions, A $\beta$ 42 levels were reduced by compound A by  $61.3 \pm 11.8$  % at 0.4 mg/kg but this was not a significant reduction due to the great variability of controls. However compound A at 0.04 mg/kg and compound C at both concentrations produced a significant decrease in A $\beta$ 42 levels ( $p < 0.05$ ), between a 83.9-86.2%, respectively (Fig. 5A) when compared to the control 3xTg-AD. No significant effects were observed in

insoluble samples (Fig. 5B). This clear effect of compound C over A $\beta$  metabolism was already observed in BACE1 inhibition experiments, where this gracilin was the only one producing a significant inhibition of BACE1.

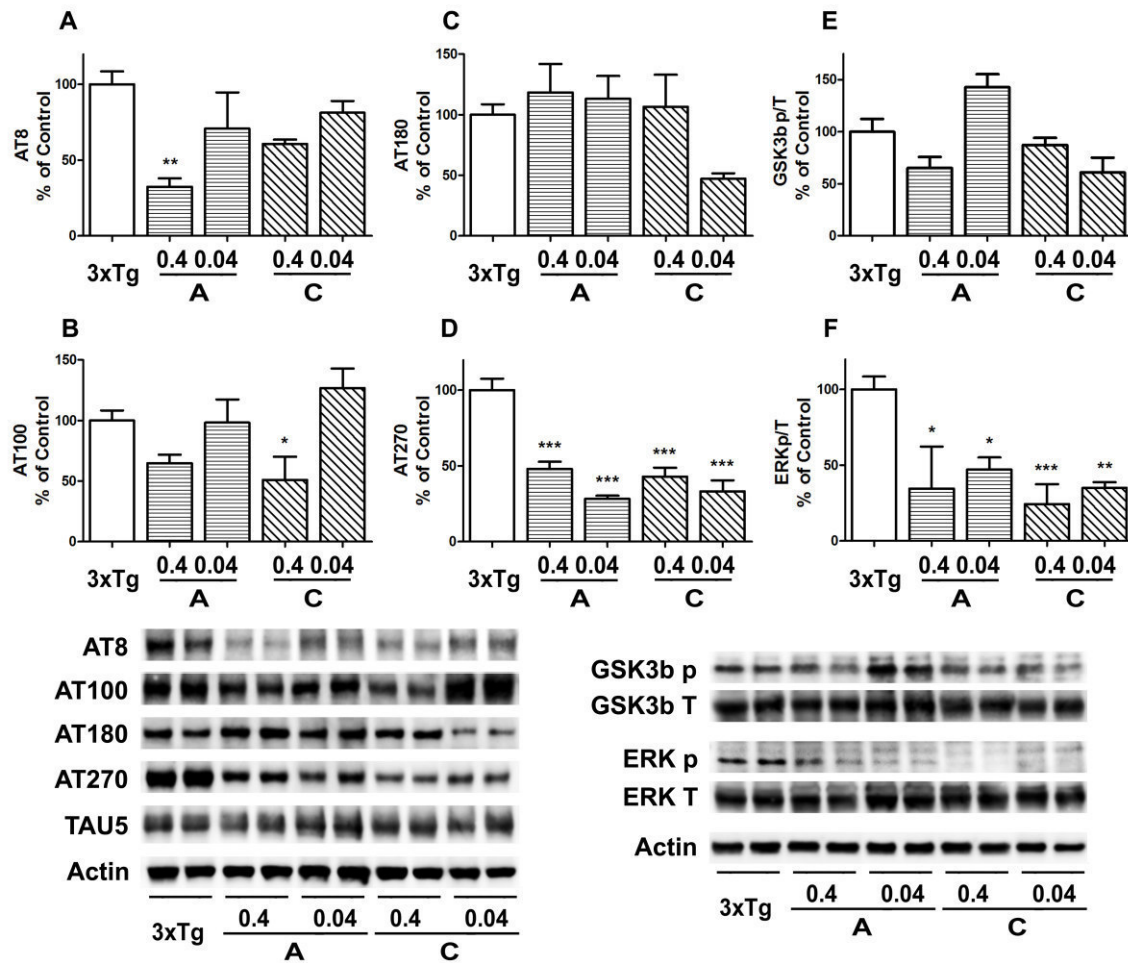


**Figure 5: In vivo effects of gracilins over A $\beta$  metabolism. (A)** Compounds A and C were tested at 0.4 and 0.04 mg/kg *in vivo*. Both compounds produced a significant decrease of A $\beta$ 42 levels respect to 3xTg-AD control group in brain soluble fractions **(B)** but no significant differences were found in insoluble fractions. Results are presented in percentage of control. \* ( $p < 0.05$ ). Data are mean  $\pm$  SEM of 3 mice per group and performing experiments by duplicate.

#### 2.4. Gracilin H and L reduce tau hyperphosphorylation through ERK-inhibition

In addition, soluble fractions were studied by western blotting focusing on phosphorylated tau and kinases expression. The same antibodies as in the *in vitro* assays were used. No significant changes on phosphorylated tau expression levels were observed with AT180. In contrast with the observed data *in vitro*, only compound A at 0.4 mg/kg decreased AT8 levels by  $67.5 \pm 5.5$  % ( $p < 0.01$ ) compared to control 3xTg-AD (Fig. 6A). Compound C was the only one that reduced AT100 expression in a  $49.0 \pm 19.2$  % ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6B), also at the highest concentration. But a more notable diminution was found with AT270, showing a tau decrease of  $52.0 \pm 4.8$  % ( $p < 0.001$ ) and  $71.7 \pm 2.0$

% ( $p < 0.001$ ) with compound A treatments and of  $57.0 \pm 5.9$  % ( $p < 0.001$ ) and  $66.6 \pm 7.1$  % ( $p < 0.001$ ) with compound C at 0.4 and 0.04 mg/kg, respectively (Fig. 6D).



**Figure 6: In vivo effects of gracilin H and L over tau and kinases expression.** 3xTg-AD mice were administered by IP injection with compounds A and C at 0.4 and 0.04 mg/kg in a chronic treatment. A group of 3xTg-AD mice treated with vehicle was used as controls. Brains lysates were analyzed by western blot experiments, measuring tau expression with AT8 (A), AT100 (B), AT180 (C), AT270 (D) and two kinases related with AD, ERK (E) and GSK3b (F). Data are expressed in percentage of the 3xTg-AD control, being the result of mean  $\pm$  SEM of 3 mice per group and performing experiments by duplicate. ANOVA statistical test was used to analyze differences between 3xTg-AD control and the treatment (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Following these investigations, ERK and GSK3b were analyzed again and, as in the *in vitro* model, no activity over GSK3b was observed with the treatments (Fig. 6E). However ERK was inhibited by the two gracilins at both concentrations, which is consistent with

the *in vitro* results. Compound A inhibited ERK a  $65.3 \pm 27.6 \%$  ( $p < 0.05$ ) at the most elevated dose and a  $52.7 \pm 7.8 \%$  ( $p < 0.05$ ) at the lowest one. Results obtained with compound C were even better than the observed with compound A, reducing the active isoform of ERK a  $75.7 \pm 13.2 \%$  ( $p < 0.001$ ) at 0.4 mg/kg and a  $65.0 \pm 3.7 \%$  ( $p < 0.01$ ) at 0.04 mg/kg (Fig. 6F).

### 3. Discussion

Gracilins are secondary metabolites derived from *Spongionella sp* that have recently proved to have an important antioxidant activity in primary neurons, where these compounds reduced ROS generation and maintained mitochondrial function. Gracilin A and tetrahydroaplysulphurin-1 were able to preserve mitochondrial membrane potential and Gracilin L increased levels of the antioxidant molecule glutathione. All these effects were produced through the induction of Nrf2 translocation (Leiros, Sanchez et al. 2014), pointing out that this family of compounds could be of great interest for neurodegenerative disease research. In fact, Nrf2 is studied as a possible target for AD treatment since it has been reported the effectiveness of the antioxidant protection through this pathway against A $\beta$ -mediated toxicity *in vitro* (Joshi and Johnson 2012). Part of the A $\beta$  toxicity comes from the reaction of this peptide with metals ions such as Fe<sup>3+</sup> and Cu<sup>2+</sup>, producing ROS and increasing the oxidative stress condition (Huang, Moir et al. 2004). Furthermore the accumulation of this toxic peptide in the mitochondria causes morphological alterations and damage on the mitochondrial function that imply a reduction on the energy production, an elevation of ROS generation and the failure of membrane potential, leading to apoptosis (Meraz-Rios, Franco-Bocanegra et al. 2014). However AD is also characterized by hyperphosphorylated tau aside to the mentioned toxic A $\beta$  peptide, and both signs are increased in oxidative stress conditions. It has been proposed that tau protein phosphorylation is enhanced in endoplasmic reticulum stress conditions and vice versa, leading to a feedback of the state (Mondragon-Rodriguez, Perry et al. 2013). In this work we studied the effects of several gracilin derived compounds with antioxidant capacity over A $\beta$  and tau hallmarks. We proved that despite the differences between *in vitro* and *in vivo* experiments, hyperphosphorylated tau was reduced by gracilins in cellular and animal models. These compounds reduced

tau phosphorylations at Ser202 and Thr205 *in vitro* while *in vivo* the most important effect was observed on Thr181 phosphorylation site. These variations in the phosphorylation pattern could be due to the different models employed. The SH-SY5Y-TMHT441 cell line contains two mutations for tau pathology, V337M and R406W (Loffler, Flunkert et al. 2012), while 3xTg-AD mice have the P301L mutation (Oddo, Caccamo et al. 2003). V337M and R406W are located in exons 12 and 13, respectively (Goedert, Crowther et al. 1998) and they are associated with the presence of six tau isoforms and filaments similar to the paired helical filaments (PHF) presented in AD. Nevertheless, P301L affects exon 10 which is related to tau isoforms with four microtubule-binding repeats and filaments with a longer periodicity than the PHF found in AD (Nacharaju, Lewis et al. 1999). A previous study in the lamprey ABC model presented a comparison of the tau mutants with different exonic locations, where all of them (P301L, V337M and R406W) increased the incidence of distal dendritic expansion, but the greatest one was produced by P301L. However the main difference between these mutations was that V337M and R406W produced an elevation of phosphorylated tau detected with AT8, while P301L caused a diminution (Lee, Jung et al. 2009). Similar variations in the phosphorylation pattern detected by AT8 were observed in our experiments where the SH-SY5Y-TMHT441 cell line, with the mutations V337M and R406W, showed a reduction in AT8 with gracilin compounds and the 3xTg-AD animal model, with the mutation P301L, did not show any differences with this antibody.

In the *in vitro* experiments it was pointed out that effects on AT100 expression seem to be related to modulation of GSK3b activity, while in contrast the common inhibition of AT8 of all the gracilin family seems to be related to ERK kinase activity. This effect of the gracilin family was corroborated with the *in vivo* experiment where this kinase was also inhibited. ERK has been proposed as a pivotal enzyme in AD due to that, on the one hand, this kinase is involved in tau phosphorylation (Martin, Latypova et al. 2013) but on the other hand, it is a suppressor of the expression and activity of BACE1. Thus, the inhibition of ERK increases the expression and activity of this secretase, leading to an elevation of A $\beta$ 42 levels in neuroblastoma cells (Tamagno, Guglielmotto et al. 2009). Our results demonstrate that despite that gracilin compounds are ERK inhibitors, gracilin L inhibits BACE1 *in vitro* and that the two compounds tested *in vivo*, gracilins H and L,



reduce A $\beta$ 42 levels. Therefore we can conclude that the inhibition of ERK by gracilins is not affecting the amyloid metabolism.

Effects on A $\beta$ 42 levels *in vitro* and *in vivo* also differ between the two models employed. While gracilins produced no diminutions in A $\beta$ 42 levels *in vitro*, gracilin H and L decreased them *in vivo* in the soluble fraction. BE(2)-M17 differentiated cells are a model for APP metabolism studies based on the endogenous properties of these neuroblastoma cells (Macias, Gonzales et al. 2014), but 3xTg-AD mice contain the APP Swedish mutation and the M146V mutation for presenilin1, both mutations described in familiar AD (Oddo, Caccamo et al. 2003). Moreover, the Swedish mutation harbored by 3xTg-AD model is the same used for the BACE-1 fret assay in which gracilin L showed activity.

Finally, MWM was used as a behavioral test to evaluate the cognitive impairment in rodents that can be correlated with the cognitive decline in AD patients as spatial learning and long-term memory are dependent on the hippocampal region, which is affected in AD (Puzzo, Lee et al. 2014). Since the compounds availability was limited and therefore the size of treatment mice groups was small, the MWM test performed was preliminary and results have to be considered in this way. Gracilin treatments seem to not affect the learning ability of 3xTg-AD and no differences were observed between treatment and control groups. However, gracilins partially rescued the learning deficits in short-term and long-term assays where the latency time to find the platform location was reduced with both compounds at the highest concentration tested in 24 h probe. A positive trend to cognitive improvement was observed for both compounds at 1.5 and 24 h tests in all the parameters measured, so it would be interesting to test more doses or longer treatments in experiments with a larger number of animals per group.

#### **4. Conclusion**

In this report we showed the ability of gracilin compounds to inhibit ERK and reduce the phosphorylation of tau at Ser202 and Thr205 *in vitro*. *In vivo* experiments confirmed the capacity of gracilin H and L to inhibit ERK and reduce tau phosphorylation but on different sites than in *in vitro* assays. Both gracilins reduced A $\beta$ 42 levels in soluble brains fractions but only gracilin L also inhibited BACE1 activity. The behavior test performed provides a positive trend to cognitive improvement with the highest concentration

tested. AD is a multifactorial pathology and therefore needs a multifactorial response (Tell and Hilgeroth 2013). The neuroprotective and antioxidant abilities of gracilins described in a previous work (Leiros, Sanchez et al. 2014) and the more specific AD targets like BACE1 and ERK inhibitions correlated with a decrease of A $\beta$  and hyperphosphorylated tau levels, are good starting points for the promotion of gracilin compounds as valuable options for multi-target drug development. Further investigations are needed into the mechanism of these molecules for determine the real potential in AD treatment.

## 5. Funding and acknowledgments

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofunded-grants. From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía y Competitividad, AGL2012-40185-CO2-01 and Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, GRC2013-016, and through Axencia Galega de Innovación, Spain, ITC-20133020 SINTOX, IN852A 2013/16-3 MYTIGAL. From CDTI under ISIP Program, Spain, IDI-20130304 APTAFOOD.

From the European Union's Seventh Framework Program managed by REA – Research Executive Agency (FP7/2007-2013) under grant agreement Nos. 265409  $\mu$ AQUA, 315285 CIGUATOOLS and 312184 PHARMASEA. We acknowledge the contribution of the National Cancer Institute via its Open Repository Programme for provision of the original *Spongionella* extracts. The Scottish University Life Science Alliance is acknowledged for their funding of the Marine Biodiscovery Centre Compound Library.

We thank Dr. Giménez-Llort (Universidad Autónoma de Barcelona) and Dr. Laferla (University of California, Irvine) for their collaboration providing the 3xTg-AD mice.

## 6. References

1. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2014. **31**(2): p. 160-258.
2. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2013. **30**(2): p. 237-323.



3. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2012. **29**(2): p. 144-222.
4. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2011. **28**(2): p. 196-268.
5. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2010. **27**(2): p. 165-237.
6. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2009. **26**(2): p. 170-244.
7. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2008. **25**(1): p. 35-94.
8. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2007. **24**(1): p. 31-86.
9. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2006. **23**(1): p. 26-78.
10. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2005. **22**(1): p. 15-61.
11. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2004. **21**(1): p. 1-49.
12. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2003. **20**(1): p. 1-48.
13. Mayer, A.M., et al., *Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action*. Mar Drugs, 2013. **11**(7): p. 2510-73.
14. Mayer, A.M., et al., *Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2011. **153**(2): p. 191-222.
15. Mayer, A.M., et al., *Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(5): p. 283-308.
16. Mayer, A.M., et al., *Marine pharmacology in 2003-4: marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2007. **145**(4): p. 553-81.
17. Mayer, A.M. and M.T. Hamann, *Marine pharmacology in 2001--2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2005. **140**(3-4): p. 265-86.
18. Mayer, A.M. and M.T. Hamann, *Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action*. Mar Biotechnol (NY), 2004. **6**(1): p. 37-52.

19. Mayer, A.M. and M.T. Hamann, *Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2002. **132**(3): p. 315-39.
20. Mehbub, M., et al., *Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives*. *Marine Drugs*, 2014. **12**(8): p. 4539-4577.
21. Van Soest, R.W., et al., *Global diversity of sponges (Porifera)*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35105.
22. Mollica, A., et al., *Synthesis and bioactivity of secondary metabolites from marine sponges containing dibrominated indolic systems*. *Molecules*, 2012. **17**(5): p. 6083-99.
23. Grosso, C., et al., *Bioactive marine drugs and marine biomaterials for brain diseases*. *Mar Drugs*, 2014. **12**(5): p. 2539-89.
24. Mattson, M.P., *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*. *Nature*, 2004. **430**(7000): p. 631-9.
25. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(2): p. 741-66.
26. Honig, L.S. and R. Mayeux, *Natural history of Alzheimer's disease*. *Aging (Milano)*, 2001. **13**(3): p. 171-82.
27. Tuppo, E.E. and L.J. Forman, *Free radical oxidative damage and Alzheimer's disease*. *J Am Osteopath Assoc*, 2001. **101**(12 Suppl Pt 1): p. S11-5.
28. Wang, X., et al., *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1842**(8): p. 1240-7.
29. Zhao, Y. and B. Zhao, *Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. **2013**: p. 316523.
30. Madeo, J. and C. Elsayad, *The Role of Oxidative Stress in Alzheimer 's Disease*. *Journal of Alzheimers Disease & Parkinsonism*, 2013. **3**(2): p. 116.
31. Galindo, M.F., et al., *Mitochondrial biology in Alzheimer's disease pathogenesis*. *J Neurochem*, 2010. **114**(4): p. 933-45.
32. Luque-Contreras, D., et al., *Oxidative stress and metabolic syndrome: cause or consequence of Alzheimer's disease?* *Oxid Med Cell Longev*, 2014. **2014**: p. 497802.
33. Rateb, M.E., et al., *Bioactive diterpene derivatives from the marine sponge Spongionella sp.* *J Nat Prod*, 2009. **72**(8): p. 1471-6.
34. Nirmal, N., G.O. Praba, and D. Velmurugan, *Modeling studies on phospholipase A2-inhibitor complexes*. *Indian J Biochem Biophys*, 2008. **45**(4): p. 256-62.
35. Leiros, M., et al., *Spongionella secondary metabolites protect mitochondrial function in cortical neurons against oxidative stress*. *Mar Drugs*, 2014. **12**(2): p. 700-18.
36. Macias, M.P., et al., *A cellular model of amyloid precursor protein processing and amyloid-beta peptide production*. *J Neurosci Methods*, 2014. **223**: p. 114-22.
37. Loffler, T., et al., *Stable mutated tau441 transfected SH-SY5Y cells as screening tool for Alzheimer's disease drug candidates*. *J Mol Neurosci*, 2012. **47**(1): p. 192-203.

38. Oddo, S., et al., *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction*. *Neuron*, 2003. **39**(3): p. 409-21.
39. Rueda, A., et al., *Gracilins G-I, Cytotoxic Bisnorditerpenes from Spongionella pulchella, and the Anti-Adhesive Properties of Gracilin B*. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2006. **3**(10): p. 753-760.
40. Puzzo, D., et al., *Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines*. *Biochem Pharmacol*, 2014. **88**(4): p. 450-67.
41. Anand, R., K.D. Gill, and A.A. Mahdi, *Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future*. *Neuropharmacology*, 2014. **76 Pt A**: p. 27-50.
42. Martin, L., et al., *Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease*. *Ageing Res Rev*, 2013. **12**(1): p. 289-309.
43. Joshi, G. and J.A. Johnson, *The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases*. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2012. **7**(3): p. 218-29.
44. Huang, X., et al., *Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1012**: p. 153-63.
45. Meraz-Rios, M.A., et al., *Early onset Alzheimer's disease and oxidative stress*. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. **2014**: p. 375968.
46. Mondragon-Rodriguez, S., et al., *Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: implications for Alzheimer's disease*. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. **2013**: p. 940603.
47. Goedert, M., R.A. Crowther, and M.G. Spillantini, *Tau mutations cause frontotemporal dementias*. *Neuron*, 1998. **21**(5): p. 955-8.
48. Nacharaju, P., et al., *Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations*. *FEBS Lett*, 1999. **447**(2-3): p. 195-9.
49. Lee, S., et al., *Exonic point mutations of human tau enhance its toxicity and cause characteristic changes in neuronal morphology, tau distribution and tau phosphorylation in the lamprey cellular model of tauopathy*. *J Alzheimers Dis*, 2009. **16**(1): p. 99-111.
50. Tamagno, E., et al., *JNK and ERK1/2 pathways have a dual opposite effect on the expression of BACE1*. *Neurobiol Aging*, 2009. **30**(10): p. 1563-73.
51. Tell, V. and A. Hilgeroth, *Recent developments of protein kinase inhibitors as potential AD therapeutics*. *Front Cell Neurosci*, 2013. **7**: p. 189.



# Discusión

Los organismos de origen marino son una importante fuente de moléculas para el desarrollo de nuevos fármacos. La gran diversidad taxonómica de estos organismos se debe a su necesidad de adaptarse a un sinnúmero de ecosistemas hostiles para lo cual producen distintos metabolitos secundarios y por tanto generan una enorme variedad de estructuras. Muchos de estos compuestos han resultado ser moléculas biológicamente activas lo que les confiere un mayor potencial para su aplicación terapéutica (Murray, Moane et al. 2013).

Concretamente los metabolitos secundarios obtenidos de bacterias del género *Streptomyces* y de esponjas son muy interesantes en el desarrollo de fármacos por su gran diversidad de estructuras. En el caso de las esponjas, por citar un ejemplo, las estructuras de estos metabolitos incluyen elementos como el bromo que no suelen encontrarse en metabolitos secundarios terrestres, aportando una mayor singularidad (Glaser and Mayer 2009). El potencial terapéutico de estos compuestos ha sido demostrado en numerosas ocasiones siendo descritos como potenciales anti-tumorales (Mollica, Locatelli et al. 2012), antifúngicos, antiinflamatorios (Hong, Kim et al. 2003), antivirales (Sagar, Kaur et al. 2010), antioxidantes (Lysek, Kinscherf et al. 2003) y neuroprotectores (Zhang, Wang et al. 2008; Hong, Gao et al. 2009; Eftekharzadeh, Hamedi et al. 2010) entre otros.

Puesto que el objetivo de la presente Tesis Doctoral era analizar el potencial de 15 compuestos de origen marino en el tratamiento de la EA, nos pareció interesante comenzar el estudio de los compuestos analizando su capacidad neuroprotectora en un modelo *in vitro* de estrés oxidativo, que también se ha utilizado para estudios en la enfermedad de Parkinson (Facecchia, Fochesato et al. 2011), dada la estrecha relación que existe entre el estrés oxidativo y las enfermedades neurodegenerativas. El modelo utilizado recrea las condiciones de estrés oxidativo mediante el tratamiento de neuronas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhao, Yao-Yue et al. 2012), de forma que se rompe el equilibrio entre los niveles de las ROS y las defensas antioxidantes provocando una disfunción mitocondrial y una elevación de los niveles de radicales libres que dará lugar al consiguiente daño celular (Melo, Monteiro et al. 2011; Basli, Soulet et al. 2012). En nuestro caso, tras el tratamiento de las neuronas corticales primarias con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM) durante 24h de

incubación estudiamos distintos parámetros indicadores de estrés oxidativo como la viabilidad, los niveles de ROS, la función mitocondrial y su potencial de membrana o las defensas antioxidantes.

Inicialmente el estudio se comenzó con 25 compuestos de los cuales 1 era derivado de tunicados, 17 procedían de esponjas y 7 fueron extraídos de *Streptomyces*, pero tras un primer proceso de selección en estudios de neuroprotección frente al estrés oxidativo se eliminaron el compuesto procedente de tunicado y 9 compuestos derivados de esponjas por su baja capacidad neuroprotectora, por lo que se continuaron los estudios con los 15 metabolitos secundarios seleccionados (7 de *Streptomyces* y 8 de esponjas).

En estos experimentos de neuroprotección contra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observamos que todos los compuestos derivados de *Streptomyces*, salvo la metacicloprodigiosina, reducían la generación de las ROS, mientras que la función mitocondrial fue conservada por todos ellos menos por la anhidroexfoliamicina, que a pesar de ello resultó ser uno de los compuestos más prometedores al finalizar el estudio.

Aunque no existe un amplio conocimiento de la actividad biológica de estos compuestos, la mayoría de ellos han sido descritos como antitumorales (Montaner and Perez-Tomas 2003; Moore, Kalaitzis et al. 2005; Kalinovskaya, Romanenko et al. 2011) y antibióticos (Potterat, Zahner et al. 1993; Kalinovskaya, Romanenko et al. 2011). Además, existen estudios sobre las propiedades antioxidantes de los compuestos nocardamina (Shimoni, Ampel et al. 1998) y undecilprodigiosina (Stankovic, Radulovic et al. 2012), sin embargo, dichos estudios nunca se habían realizado en neuronas corticales hasta ahora, suponiendo una gran aportación para su posible aplicación terapéutica en enfermedades neurodegenerativas.

Tras el estudio de neuroprotección realizado en neuronas primarias, destacamos por sus propiedades antioxidantes dos compuestos de los siete metabolitos secundarios derivados de *Streptomyces*: la anhidroexfoliamicina y la undecilprodigiosina.

Como ya resaltamos anteriormente la anhidroexfoliamicina no fue capaz de recuperar la función mitocondrial, sin embargo este compuesto redujo considerablemente los niveles de las ROS, mantuvo el potencial de membrana mitocondrial, la actividad de la enzima



antioxidante CAT y los niveles del GSH, consiguiendo así un alto grado de neuroprotección frente a los daños producidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Asimismo, este compuesto fue capaz de inhibir los efectos del desacoplador mitocondrial FCCP sobre el calcio intracelular e inhibir la actividad de la enzima caspasa-3, ofreciendo una completa neuroprotección contra el estrés oxidativo. Por otro lado el compuesto undecilprodigiosina, pese a ser citotóxico a concentraciones elevadas, fue el único compuesto que proporcionó resultados positivos en todos los ensayos de neuroprotección realizados manteniendo la función mitocondrial y su potencial de membrana, conservando la actividad de la CAT y los niveles de la molécula antioxidante GSH reduciendo así la generación de las ROS y, al igual que la anhidroexfoliamicina, fue capaz de inhibir la caspasa-3 protegiendo a las neuronas de la apoptosis. Al contrario que la undecilprodigiosina, su análogo metacicloprodigiosina no demostró ninguna capacidad antioxidante, dicha pérdida de actividad biológica podría atribuirse a la ciclación adicional de este compuesto. Sin embargo, ambas estructuras comparten otras propiedades y han sido descritas como inmunosupresores mediante la inhibición de la proliferación de los linfocitos T, como antitumorales (Montaner and Perez-Tomas 2003), inhibidores de las MAPK y activadores de la NF-kappa B en macrófagos, lo que da lugar a una disminución en la producción de NO y la activación de genes anti-inflamatorios (Huh, Yim et al. 2007). Dichas propiedades podrían ser también de gran interés en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Cabe destacar que, pese a que los compuestos anhidroexfoliamicina y undecilprodigiosina son potentes antioxidantes, el primer compuesto lo hace vía inducción de la translocación del Nrf2 al núcleo, con la consecuente activación de la transcripción de los genes de la región ARE, mientras que el segundo es un antioxidante directo y no tiene ningún efecto sobre el factor de transcripción Nrf2. Estos datos vienen reforzados por investigaciones previas en las que la undecilprodigiosina retrasó la peroxidación lipídica inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, confirió propiedades antioxidantes y protección contra la luz UV a bacterias pigmentadas (Stankovic, Radulovic et al. 2012). Estos resultados están recogidos en la publicación titulada **“Mitigation of ROS insults by *Streptomyces* secondary metabolites in primary cortical neurons”**.

En segundo lugar, realizamos experimentos de neuroprotección frente al  $H_2O_2$  con ocho metabolitos secundarios de esponjas agrupados en dos familias de compuestos: por un lado seis gracilinas derivadas esponjas del género *Spongionella* y por otro la himenialdisina y la himenina obtenidas de esponjas procedentes de las islas Fiji.

Así pues, las propiedades antioxidantes de las gracilinas se analizaron en neuronas corticales primarias sometidas a condiciones de estrés oxidativo inducido por el  $H_2O_2$ , consiguiendo efectos neuroprotectores. Destaca la actividad de esta familia de compuestos en la que, salvo la gracilina K, todas ellas protegieron a las neuronas contra el daño oxidativo a nivel de la función mitocondrial y redujeron la producción de las ROS. Además, las gracilinas A, H y L y la tetrahidroaplisulfurina-1 mostraron un claro efecto sobre la mitocondria, restaurando el potencial de membrana mitocondrial y reduciendo las alteraciones producidas por el desacoplador mitocondrial FCCP. Estos cuatro compuestos vieron confirmada su actividad antioxidante por su capacidad para inducir la translocación de Nrf2 al núcleo, aunque la gracilina H lo hizo de forma menos eficaz. Sin embargo este compuesto, al igual que la tetrahidroaplisulfurina-1, consiguió preservar la integridad de la membrana celular. Por otro lado, las gracilinas A y L fueron las únicas capaces de reducir la actividad de la caspasa-3 y dado que estas moléculas son totalmente idénticas salvo por un radical, este efecto podría ser explicado debido a su estructura. Esta intensa actividad antioxidante se ve apoyada por la capacidad de estos compuestos para inhibir la tirosina cinasa asociada al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Rateb, Housen et al. 2009), dicha enzima es la encargada de regular la proliferación celular y la apoptosis, por lo que los inhibidores de estas cinasas han sido descritos como potenciales fármacos contra el cáncer (Cagle and Allen 2012). Todos los datos obtenidos en la investigación realizada sobre los efectos neuroprotectores de las gracilinas en un modelo de estrés oxidativo in vitro se recopilaron en el artículo **“*Spongionella* secondary metabolites protect mitochondrial function in cortical neurons against oxidative stress”**.

Los otros dos metabolitos secundarios obtenidos de esponjas que fueron analizados en el modelo oxidativo fueron los bromopirrolalcaloides himenialdisina e himenina. Ambos compuestos resultaron ser muy efectivos en la neuroprotección frente al daño oxidativo



producido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones nanomolares, consiguiendo mantener la viabilidad celular. Asimismo la integridad de la membrana celular no se veía afectada, al igual que la función mitocondrial y su potencial de membrana. Además las defensas antioxidantes se preservaron a niveles basales, reduciendo así la producción de las ROS. Ambas moléculas indujeron la translocación del Nrf2 al núcleo, de forma que su actividad biológica va más allá de ser un simple antioxidante siendo capaz de incrementar las defensas endógenas de las células. Sin embargo, estos experimentos marcan como un antioxidante más potente al compuesto himenialdisina, puesto que es capaz de reducir la peroxidación lipídica, frente a la himenina que no produjo efectos significativos en estos ensayos. Y es que la protección frente a la peroxidación lipídica evita el aumento de la rigidez de las membranas, los daños en los receptores de membrana, las alteraciones en su permeabilidad, la disminución de la actividad de algunos enzimas relacionados y la formación de productos tóxicos derivados de estos procesos metabólicos, como son el malondialdehído (MDA), el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y la acroleína. Estos aldehídos modifican las proteínas y contribuyen a la pérdida de homeostasis celular, por lo que frenar su formación, evitando la peroxidación lipídica, puede ser una buena estrategia para prevenir o retardar la progresión de patologías relacionadas (Sultana, Perluigi et al. 2013).

Además de la actividad antioxidante presentada en este trabajo sobre la himenialdisina, previamente se ha descrito que este compuesto es capaz de inhibir el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB). Este factor es responsable de la transcripción de varios genes que favorecen la inflamación como son las citoquinas (Roshak, Jackson et al. 1997), lo que refuerza los resultados obtenidos en este trabajo aunque la inhibición de las citoquinas se producía a concentraciones micromolares (Sharma, Lansdell et al. 2004), superiores a las estudiadas en los ensayos de neuroprotección frente al estrés oxidativo. La investigación realizada analizando las propiedades antioxidantes de la himenialdisina y la himenina fue descrita en la publicación **“Bromoalkaloids protect primary cortical neurons from induced oxidative stress”**.

Es interesante resaltar que en este bloque de experimentos muchos compuestos, derivados tanto de *Streptomyces* como de esponjas, han mostrado una mayor eficacia a la concentración más baja estudiada (0.1  $\mu$ M). Un comportamiento similar ha sido anteriormente descrito en tratamientos con el ácido cumárico y el resveratrol, los cuales actúan como antioxidantes a dosis bajas mientras que a dosis más altas producen el efecto contrario. De esta manera, se promueve el estrés oxidativo de forma dosis-dependiente, elevando las ROS, produciendo daños celulares y actuando sobre la regulación de Akt (Pasciu, Posadino et al. 2010). Además, diversos compuestos flavonoides profesan alta afinidad por receptores a bajas concentraciones y a concentraciones elevadas producen la desensibilización de los mismos, perdiendo el efecto observado (Williams and Spencer 2012; Jiang, Li et al. 2013). De esta manera la actividad de los compuestos estudiados, que actúan a bajas concentraciones, podría deberse a interacciones con una vía de señalización celular de transducción o con un receptor que podría estar sufriendo un efecto umbral o de desensibilización a concentraciones altas.

De todos los compuestos analizados en el modelo *in vitro* de estrés oxidativo los más eficaces en neuroprotección son la anhidroexfoliamicina y la undecilprodigiosina de *Streptomyces* y la himenialdisina, himenina, tetrahidroaplisulfurina-1 y las gracilinas A, L y H derivadas de esponjas. Salvo la undecilprodigiosina, todos estos compuestos son inductores del Nrf2 y por tanto activadores de las defensas endógenas de las células. En varias enfermedades neurodegenerativas se ha observado una reducción de la expresión del Nrf2, disminuyendo las defensas antioxidantes celulares y favoreciendo los daños por estrés oxidativo, por lo que la inducción de la translocación del Nrf2 es uno de los mecanismos terapéuticos estudiados en este tipo de trastornos y se han obtenido efectos beneficiosos activando la ruta Nrf2-ARE en modelos *in vitro* e *in vivo* para enfermedades neurodegenerativas (Kumar, Kim et al. 2014).

Es necesario resaltar que la himenialdisina y la himenina han sido descritas como inhibidores de cinasas, tales como la MEK-1 (Tasdemir, Mallon et al. 2002), la CK1, la CDK2, la CDK5 y la GSK3b, todas ellas implicadas en la patología del Alzheimer (Meijer, Thunnissen et al. 2000). Esta inhibición de cinasas sumada a la actividad antioxidante a

través de la vía Nrf2-ARE descrita en este trabajo, supone un nuevo abordaje multiestrategia que hace muy interesante su posible utilización como fármacos anti-Alzheimer.

RESUMEN ESTRÉS OXIDATIVO	Función mitocondrial	↓ROS	Potencial de membrana mitocondrial	GSH	CAT	Nrf2
Anhidroexfoliamicina		✓	✓	✓	✓	✓
Naptopiranicina	✓	✓	✓			
3-epi-5-deoxinterocina	✓	✓			✓	
5-deoxinterocina			✓	✓		
Nocardamina	✓	✓			✓	
Undecilprodigiosina	✓	✓	✓	✓	✓	
Metacicloprodigiosina						
Gracilina J	✓	✓				
Gracilina K		✓	✓			
Gracilina H	✓	✓			✓	✓
Gracilina A	✓	✓	✓			✓
Gracilina L	✓	✓		✓		✓
Tetrohidroaplisulfurina-1	✓	✓	✓		✓	✓
Himentialdisina	✓	✓	✓	✓		✓
Himenina	✓	✓	✓	✓		✓

**Figura 22.** Tabla resumen de los resultados obtenidos en los estudios de neuroprotección frente al estrés oxidativo. Los resultados positivos son marcados con un ✓.

Continuando con los estudios, los compuestos anhidroexfoliamicina, undecilprodigiosina, tetrahidroaplisulfurina-1 y las gracilinas A, L y H se analizaron en dos modelos celulares para la enfermedad de Alzheimer, primero en un modelo de neuroblastoma, que de forma endógena reproduce el metabolismo del APP en la EA, llamado Be(2)-M17 (Macias, Gonzales et al. 2014), y segundo en un modelo de neuroblastoma transfectado con dos mutaciones presentes en taupatologías, el SH-SY5Y-TMHT441 (Loffler, Flunkert et al. 2012). Tras los tratamientos realizados con los compuestos, en la línea Be(2)-M17 se estudiaron los niveles del  $\beta A_{1-42}$  en el medio celular. Asimismo, de la línea SH-SY5Y-TMHT441 se obtuvieron lisados celulares en los que se analizaron los niveles de la proteína tau con anticuerpos que marcan distintos

sitios de fosforilación típicos de la EA así como los niveles de las cinasas ERK y GSK3b por su implicación en la fosforilación de tau. Además se analizó la capacidad de estos compuestos para inhibir la BACE1 en un ensayo sin células, es decir, incubando el compuesto con la secretasa y un sustrato de la misma. En estos experimentos *in vitro* se obtuvieron resultados positivos con todos los compuestos estudiados, salvo con la undecilprodigiosina que no fue capaz de inhibir ninguna cinasa y apenas produjo un ligero efecto inhibitorio sobre la BACE1. Como anteriormente apuntábamos, a diferencia del resto de compuestos seleccionados, la undecilprodigiosina no induce la translocación del Nrf2, por lo que su efecto parece ser debido a una acción antioxidante directa. Dado que el uso de antioxidantes exógenos en la EA ha demostrado tener menor eficacia que los tratamientos con inductores de antioxidantes endógenos (Anand, Gill et al. 2014), los resultados presentados en este trabajo parecen coincidir con esta teoría.

Por el contrario, el otro compuesto derivado de *Streptomyces* analizado en los modelos de neuroblastoma para la EA, la anhidroexfoliamicina, fue capaz de reducir los niveles de tau fosforilada mediante la inhibición de la GSK3b, así como también inhibir la BACE1 *in vitro*, pero no tuvo efecto sobre los niveles de  $\beta$ A en el medio de las células Be(2)-M17. Además, al observar que los niveles de tau fosforilada disminuían con el mismo patrón que con los tratamientos realizados en esta misma línea con el inhibidor de JNK SP600125 (Loffler, Flunkert et al. 2012), decidimos realizar un estudio comparativo entre la anhidroexfoliamicina y este inhibidor de JNK que actúa produciendo una inhibición competitiva reversible por el sitio de unión a ATP de esta cinasa (Cui, Zhang et al. 2007). En este estudio observamos que la anhidroexfoliamicina y el SP600125 eran capaces de inhibir la JNK y reducir los niveles de tau fosforilada en los residuos Thr231, Thr181 y Ser235 por separado, mientras que un tratamiento combinado de ambos compuestos bloqueaba dichos efectos. La inhibición de JNK no es una estrategia terapéutica principal en la EA, sin embargo se ha descrito que los inhibidores de JNK son capaces de reducir los niveles de fosforilación de tau (Cui, Zhang et al. 2007), prevenir la disfunción sináptica (Sclip, Tozzi et al. 2014) y la fosforilación de APP para así inducir su degradación (Colombo, Bastone et al. 2009), por lo que la inhibición de JNK es una diana terapéutica interesante en la EA.

Los resultados obtenidos sobre la anhidroexfoliamicina en este punto de la investigación eran muy prometedores, lo cual nos llevó a su estudio *in vivo* en un modelo animal específico para la EA, los ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) (Oddo, Caccamo et al. 2003). Para ello se realizó un tratamiento crónico en el que se confirmaron los efectos beneficiosos de esta molécula y al igual que en los experimentos *in vitro*, la anhidroexfoliamicina redujo los niveles de la proteína tau fosforilada en el cerebro de los ratones 3xTg-AD, actuando a través de la cinasa GSK3b. Sin embargo, los resultados en el estudio de las MAPK variaron con respecto a los experimentos *in vitro* en los cuales el compuesto inhibía la JNK y no producía ningún efecto sobre la cinasa ERK. *In vivo* ocurre exactamente lo contrario y no observamos efectos sobre la JNK, pero sí una inhibición de la ERK. Por otro lado, en el estudio de los niveles de  $\beta$ A, aunque no son resultados significativos, se observa una clara tendencia de disminución de los niveles de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> en el cerebro de los 3xTg-AD que coincide con la inhibición de BACE1 determinada en los experimentos *in vitro*.

Previamente al sacrificio de los ratones tratados para este estudio se realizó una prueba cognitiva, llamada el laberinto acuático de Morris (MWM), para evaluar el deterioro de la memoria espacial y la capacidad de aprendizaje de los animales. Este experimento consiste en entrenar a los ratones tratados para que sirviéndose de signos visuales encuentren una plataforma sumergida en una piscina circular y tras este período de aprendizaje se comprueba el estado de su memoria espacial en dos pruebas en las que se ha retirado la plataforma. La primera se realizó a la 1h30 de finalizar el último entrenamiento, que corresponde con la memoria a corto plazo, y la segunda prueba se realizó a las 24h correspondiendo con la memoria a largo plazo. En estas pruebas, el ratón tiene un minuto para buscar la plataforma, y durante ese minuto se mide el tiempo en pasar por primera vez por donde estaba situada la plataforma en los entrenamientos, el número de veces que pasa por esta localización y el tiempo que permanece en el cuadrante en el que estaba situada la plataforma. Este test, muy frecuentemente utilizado en estudios de conducta en neurociencia (Puzzo, Lee et al. 2014), no aportó resultados positivos, seguramente debido a que durante los tratamientos los animales parecían muy nerviosos y asustados, llegando incluso a

mostrarse agresivos durante la manipulación, lo que sin duda afectó a su capacidad de aprendizaje y memorización.

Estos datos fueron descritos en el artículo titulado **“The *Streptomyces* metabolite anhydroexfoliamycin ameliorates hallmarks of Alzheimer’s disease *in vitro* and *in vivo*”**.

Por último, se estudiaron los efectos de las gracilinas A, H y L y la tetrahidroaplisulfurina-1, en los modelos celulares para la EA anteriormente descritos, y se observó que producían una disminución de los niveles de tau fosforilada en los aminoácidos Ser202 y Thr205, detectados con el anticuerpo AT8, mediante la inhibición de la cinasa ERK. Curiosamente la tetrahidroaplisulfurina-1 resultó ser la única capaz de reducir los niveles de la proteína tau fosforilada en Ser212 y Thr214, lo cual parece estar relacionado con la inhibición de la GSK3b, efecto que también sólo se produjo por acción de este compuesto. Una vez más, no observamos efectos sobre los niveles del péptido  $\beta$ A en los estudios realizados en la línea celular Be(2)-M17, pero la gracilina L fue capaz de inhibir la actividad de la enzima BACE1. Los cuatro compuestos resultaron ser muy prometedores en estos estudios, como inductores de la Nrf2 e inhibidores de la cinasa ERK, lamentablemente la cantidad disponible de los mismos es muy limitada y solamente se pudieron continuar los estudios *in vivo* con las gracilinas H y L.

Al igual que en los experimentos *in vitro*, los tratamientos crónicos llevados a cabo con las gracilinas H y L en ratones 3xTg-AD redujeron los niveles de tau fosforilada, pero en vez de detectar esta disminución en los aminoácidos Ser202 y Thr205, en estos animales se detectó fundamentalmente en la Thr181, detectado con el anticuerpo AT270, aunque el efecto seguía siendo mediado por la cinasa ERK. Esta cinasa se cree que puede jugar un papel clave en la patología de la enfermedad de Alzheimer puesto que además de ser responsable de la fosforilación de tau (Martin, Latypova et al. 2013), también es un supresor de la expresión y la actividad de la BACE1, de forma que la inhibición de la ERK aumentaría la expresión y la actividad de esta secretasa, dando lugar a una elevación de los niveles de  $\beta$ A tóxico (Tamagno, Guglielmotto et al. 2009). No obstante, en este estudio, pese a inhibir la cinasa ERK, los niveles de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> disminuyeron significativamente en los lisados cerebrales de los 3xTg-AD tratados con las gracilinas. Esta reducción del péptido amiloide contrasta con los resultados *in vitro* en los que no se

encontraron efectos, sin embargo, la disminución más potente se produce con la gracilina L, la cual fue la única capaz de inhibir BACE1.

Del mismo modo que en los experimentos *in vivo* realizados con la anhidroexfoliamicina, se realizaron pruebas de cognición a los ratones tratados para evaluar las capacidades de aprendizaje y memorización utilizando el laberinto acuático de Morris. En este caso, no se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento y control en la evolución del proceso de aprendizaje. A pesar de la variabilidad de los datos obtenidos en las dos pruebas realizadas (1h30 y 24h), se observó una tendencia positiva de mejora en la memoria a corto y largo plazo. Dicha variabilidad es inherente a los grupos pequeños que en nuestro caso, debido a la escasez de compuesto no pudieron ser más amplios. Todo ello hace pensar que posiblemente un aumento del número de animales por grupo o un aumento de la duración del tratamiento podrían dar lugar a resultados más concluyentes.

Los ensayos realizados con las gracilinas en los distintos modelos de la EA fueron recogidos en el artículo “**Gracilins: *Spongionella*-derived promising compounds for Alzheimer disease**”.

RESUMEN	<i>In vitro</i>					<i>In vivo</i>			
	BACE1	Tau	ERK	GSK3b	JNK	βA	Tau	ERK	GSK3b
<b>Anhidroexfoliamicina</b>	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
<b>Undecilprodigiosina</b>	✓								
<b>Gracilina H</b>		✓	✓			✓	✓	✓	
<b>Gracilina A</b>		✓	✓						
<b>Gracilina L</b>	✓	✓	✓			✓	✓	✓	
<b>Tetrohidroaplisulfurina-1</b>		✓	✓	✓					

**Figura 23.** Tabla resumen del estudio de los efectos de los compuestos en los principales marcadores de la EA y las enzimas relacionadas. Los resultados positivos están marcados con un ✓.

En los dos estudios realizados con la anhidroexfoliamicina y con las gracilinas H y L en los modelos celulares y en el modelo animal para Alzheimer nos encontramos con variaciones en los resultados de los niveles de fosforilación de tau y el metabolismo de la APP, las cuales vienen dadas por los distintos modelos empleados *in vitro* e *in vivo*. En el caso de la proteína tau, no se han descrito mutaciones relacionadas específicamente con



la EA, por lo que los modelos empleados utilizan mutaciones de otras patologías de tau para imitar la enfermedad. Concretamente la línea celular SH-SY5Y-TMHT441 contiene dos mutaciones, la V337M y la R406W (Loffler, Flunkert et al. 2012), mientras que los ratones 3xTg-AD tienen una única mutación, la P301L (Oddo, Caccamo et al. 2003). Estas mutaciones se observan en la demencia frontotemporal y en un estudio previo realizado en un modelo animal de lamprea se compararon las tres mutaciones P301L, V337M y R406W y se observó un aumento de problemas en la expansión distal de las dendritas, siendo P301L la mutación con mayor efecto. Sin embargo, la principal diferencia entre estas mutaciones fue que la V337M y la R406W producen una elevación de los niveles de tau fosforilada detectados con el anticuerpo AT8, mientras que la P301L causó una disminución de los mismos (Lee, Jung et al. 2009). Y es que las mutaciones V337M y R406W se encuentran en los exones 12 y 13, respectivamente (Goedert, Crowther et al. 1998) y están asociadas con la presencia de seis isoformas de tau y la aparición de filamentos similares a los filamentos helicoidales pareados (PHF) presentes en la EA. Sin embargo, la P301L se encuentra en el exón 10 y se ha relacionado con la formación de isoformas de tau con cuatro repeticiones y la aparición de filamentos de unión a los microtúbulos con una periodicidad más larga que los PHF encontrados en la EA (Nacharaju, Lewis et al. 1999).

Por otra parte, también se encontraron diferencias en los experimentos centrados en el metabolismo de APP *in vitro* e *in vivo* y mientras que no se detectaron efectos en los niveles de  $\beta$ A en la línea de neuroblastoma Be(2)-M17, en los animales 3xTg-AD éstos disminuyen coincidiendo con la inhibición de la BACE1 observada también *in vitro* pero en un experimento realizado directamente con la enzima aislada. Estas diferencias son debidas a que las células Be(2)-M17 no presentan las mutaciones típicas de la EA, sino que este modelo presenta propiedades amiloidogénicas endógenas después de su diferenciación con ácido retinoico, dando lugar a una producción de  $\beta$ A anómala (Macias, Gonzales et al. 2014) mientras que, tanto el ensayo de inhibición de la BACE1 como el modelo animal 3xTg-AD, están basados en la mutación familiar APP<sub>Swe</sub> y por tanto los resultados correspondientes a estos ensayos coinciden entre ellos, pero no con los obtenidos a partir de la línea Be(2)-M17, por lo que se podría concluir que el efecto



de estos compuestos se produce sobre alguna diana afectada por esta mutación familiar para la APP.

A pesar de estas diferencias en los distintos modelos, los resultados del estudio fueron muy prometedores. Los experimentos iniciales ya marcaban a la anhidroexfoliamicina, la undecilprodigosina, las gracilinas, la tetrahydroaplisulfurina-1, la himenialdisina y la himenina como antioxidantes y neuroprotectores, siendo todos estos compuestos inductores de Nrf2 y por tanto activadores de las defensas endógenas de las células, salvo la undecilprodigosina que se comportó como un antioxidante directo. Solo con estos datos, los compuestos ya eran de gran interés en la investigación terapéutica para enfermedades neurodegenerativas, pero además la anhidroexfoliamicina, las gracilinas y la tetrahydroaplisulfurina-1 demostraron reducir los niveles de tau fosforilada mediante la inhibición de las cinasas GSK3b y ERK *in vitro* que son dianas farmacológicas en la EA. Estos resultados fueron confirmados para la anhidroexfoliamicina y las gracilinas H y L en un modelo de ratón transgénico para el estudio de la EA. Asimismo se observaron disminuciones en los niveles del péptido  $\beta$ A, el cual es considerado el otro principal marcador de la EA junto con la proteína tau hiperfosforilada, y dicha disminución está favorecida por la capacidad de inhibición de la BACE1 por la anhidroexfoliamicina y la gracilina L.

Dado que la EA es una patología multifactorial en la que se produce una pérdida de la homeostasis celular, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo entre otros procesos celulares, se necesita una respuesta multifactorial (Tell and Hilgeroth 2013). En la presente Tesis se ha demostrado la eficacia de estos compuestos en la protección frente a daños producidos por estrés oxidativo preservando la función mitocondria, además se ha descrito su capacidad para inhibir algunas de las cinasas responsables de la fosforilación de tau y la enzima BACE1 fundamental en la formación del péptido  $\beta$ A. Por lo tanto, podemos hablar del gran potencial terapéutico de estos compuestos en la EA que actúan directamente sobre tres dianas importantes en el desarrollo de esta patología, dando una respuesta multifactorial.



# Conclusiones

1. Los compuestos derivados de *Streptomyces*, anhidroexfoliamicina y undecilprodigiosina, protegen los cultivos primarios de neuronas corticales del estrés oxidativo, reducen los niveles de las ROS y aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes; la anhidroexfoliamicina lo hace a través de la ruta Nrf2-ARE, y la undecilprodigiosina actúa como un antioxidante directo.
2. Los compuestos derivados de *Spongionella* son neuroprotectores, reducen los niveles de las ROS y aumentan la actividad enzimática antioxidante; las gracilinas A, H, L y la tetrahidroaplisulfurina-1 tienen una protección antioxidante más completa debido a la inducción del factor de transcripción Nrf2. Estos compuestos frenan los procesos de apoptosis mediante la inhibición de la caspasa-3.
3. La himenialdisina y la himenina protegen a las neuronas corticales del estrés oxidativo, reducen los niveles de las ROS y aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes mediante la activación de la vía Nrf2-ARE; la himenialdisina es más potente en los procesos de peroxidación lipídica.
4. La undecilprodigiosina no es beneficiosa en los modelos celulares, Be(2)-M17 y SH-SY5Y-TMHT441, aunque inhibe levemente la BACE1 en experimentos *in vitro*.
5. La anhidroexfoliamicina proporciona una protección completa contra la patología de Alzheimer a través de la inhibición de la BACE1 y la modulación de las cinasas GSK3b y JNK, lo cual reduce la fosforilación de tau en el modelo celular SHY5Y-TMHT441.
6. En ratones 3xTg-AD, la anhidroexfoliamicina reduce los niveles de  $\beta$ A insoluble e inhibe las cinasas GSK3b y ERK y disminuye los niveles de la proteína tau hiperfosforilada; el estudio cognitivo de los animales no indica mejoras en su capacidad de aprendizaje y memoria.
7. Las gracilinas A, H y L y la tetrahidroaplisulfurina-1 inhiben la cinasa ERK y reducen la hiperfosforilación de tau en modelo celular SH-SY5Y-TMHT441, pero no disminuye el péptido  $\beta$ A en el modelo Be(2)-M17; la gracilina L inhibe la BACE1.

8. Las gracilinas H y L inhiben la cinasa ERK en ratones 3xTg-AD y disminuyen los niveles de tau fosforilada; también reducen los niveles de  $\beta A_{1-42}$  en las fracciones solubles cerebros y todo ello se refleja en el comportamiento de los animales que muestran una mejora en su capacidad de aprendizaje y memoria.





# Bibliografía

- Abbott, A. (2011). "Dementia: A problem for our age." Nature **475**(7355): S2-S4.
- Aguzzi, A. and T. O'Connor (2010). "Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives." Nat Rev Drug Discov **9**(3): 237-248.
- Alonso, A. and J. Rubiolo (2015). Therapeutics of marine toxins. Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry. L. M. Botana and A. Alfonso. Lugo.
- Anand, R., K. D. Gill, et al. (2014). "Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future." Neuropharmacology **76 Pt A**: 27-50.
- Andersen, J. K. (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" Nat Med **10 Suppl**: S18-25.
- Apostolova, L. G. and J. L. Cummings (2008). "Neuropsychiatric manifestations in mild cognitive impairment: a systematic review of the literature." Dement Geriatr Cogn Disord **25**(2): 115-126.
- Aquilano, K., S. Baldelli, et al. (2014). "Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant." Front Pharmacol **5**: 196.
- Bansal, M. and N. Kaushal (2014). Oxidative Stress Mechanisms and their Modulation, Springer India.
- Basli, A., S. Soulet, et al. (2012). "Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection." Oxid Med Cell Longev **2012**: 805762.
- Bekris, L. M., C. E. Yu, et al. (2010). "Genetics of Alzheimer disease." J Geriatr Psychiatry Neurol **23**(4): 213-227.
- Birben, E., U. M. Sahiner, et al. (2012). "Oxidative stress and antioxidant defense." World Allergy Organ J **5**(1): 9-19.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2007). "Marine natural products." Nat Prod Rep **24**(1): 31-86.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2008). "Marine natural products." Nat Prod Rep **25**(1): 35-94.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2009). "Marine natural products." Nat Prod Rep **26**(2): 170-244.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2012). "Marine natural products." Nat Prod Rep **29**(2): 144-222.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2013). "Marine natural products." Nat Prod Rep **30**(2): 237-323.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2014). "Marine natural products." Nat Prod Rep **31**(2): 160-258.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2003). "Marine natural products." Nat Prod Rep **20**(1): 1-48.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2004). "Marine natural products." Nat Prod Rep **21**(1): 1-49.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2005). "Marine natural products." Nat Prod Rep **22**(1): 15-61.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2006). "Marine natural products." Nat Prod Rep **23**(1): 26-78.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2010). "Marine natural products." Nat Prod Rep **27**(2): 165-237.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2011). "Marine natural products." Nat Prod Rep **28**(2): 196-268.
- Borza, L. R. (2014). "A review on the cause-effect relationship between oxidative stress and toxic proteins in the pathogenesis of neurodegenerative diseases." Rev Med Chir Soc Med Nat lasi **118**(1): 19-27.
- Bryan, H. K., A. Olayanju, et al. (2013). "The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation." Biochem Pharmacol **85**(6): 705-717.
- Cagle, P. T. and T. C. Allen (2012). "Lung cancer genotype-based therapy and predictive biomarkers: present and future." Arch Pathol Lab Med **136**(12): 1482-1491.
- Cantú González, R. N., L. Palomo Ligas, et al. (2013). Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapéuticas.
- Cardenas, A. M., A. O. Ardiles, et al. (2012). "Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's disease and Down syndrome." Arch Med Res **43**(8): 645-654.
- Cencioni, C., F. Spallotta, et al. (2013). "Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases." Int J Mol Sci **14**(9): 17643-17663.
- Circu, M. L. and T. Y. Aw (2010). "Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis." Free Radic Biol Med **48**(6): 749-762.

- Colombo, A., A. Bastone, et al. (2009). "JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease." *Neurobiol Dis* **33**(3): 518-525.
- Cui, J., M. Zhang, et al. (2007). "JNK pathway: diseases and therapeutic potential." *Acta Pharmacol Sin* **28**(5): 601-608.
- Chen, Y.-R. (2013). Mitochondrial Dysfunction. *Molecular Basis of Oxidative Stress*, John Wiley & Sons, Inc.: 123-136.
- D'Orazio, N., M. A. Gammone, et al. (2012). "Marine bioactives: pharmacological properties and potential applications against inflammatory diseases." *Mar Drugs* **10**(4): 812-833.
- Davies, K. J. (2000). "Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems." *IUBMB Life* **50**(4-5): 279-289.
- De Strooper, B., R. Vassar, et al. (2010). "The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease." *Nat Rev Neurol* **6**(2): 99-107.
- Dehvari, N., O. Isacson, et al. (2008). "Presenilin regulates extracellular regulated kinase (Erk) activity by a protein kinase C alpha dependent mechanism." *Neurosci Lett* **436**(1): 77-80.
- Dickson, D. W. and R. O. Weller (2012). *Neurodegeneracion / Neurodegeneration: Patologia molecular de la demencia y los trastornos del movimiento / Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*, Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Duarte, C. M. (2010). *Océano: el secreto del planeta Tierra*, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas.
- Eckert, G. P., K. Renner, et al. (2012). "Mitochondrial dysfunction--a pharmacological target in Alzheimer's disease." *Mol Neurobiol* **46**(1): 136-150.
- Eftekharzadeh, B., J. Hamedi, et al. (2010). "Inhibition of oxidative stress-induced amyloid beta formation in NT2 neurons by culture filtrate of a strain of *Streptomyces antibioticus*." *Appl Microbiol Biotechnol* **86**(6): 1805-1811.
- Elejalde Guerra, J. I. (2001). "[Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment]." *An Med Interna* **18**(6): 326-335.
- Facecchia, K., L. A. Fochesato, et al. (2011). "Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies." *J Toxicol* **2011**: 683728.
- Feng, Y. and X. Wang (2012). "Antioxidant therapies for Alzheimer's disease." *Oxid Med Cell Longev* **2012**: 472932.
- Finkel, T. (2003). "Oxidant signals and oxidative stress." *Curr Opin Cell Biol* **15**(2): 247-254.
- Gan, L. and J. A. Johnson (2014). "Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases." *Biochim Biophys Acta* **1842**(8): 1208-1218.
- Gandhi, S. and A. Y. Abramov (2012). "Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration." *Oxid Med Cell Longev* **2012**: 428010.
- Glaser, K. B. and A. M. Mayer (2009). "A renaissance in marine pharmacology: from preclinical curiosity to clinical reality." *Biochem Pharmacol* **78**(5): 440-448.
- Goedert, M., R. A. Crowther, et al. (1998). "Tau mutations cause frontotemporal dementias." *Neuron* **21**(5): 955-958.
- Goodfellow, M. and H. P. Fiedler (2010). "A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics." *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**(2): 119-142.
- Goto, M., M. Masegi, et al. (1998). "K1115 A, a new anthraquinone derivative that inhibits the binding of activator protein-1 (AP-1) to its recognition sites. I. Biological activities." *J Antibiot (Tokyo)* **51**(6): 539-544.
- Grimm, R. H., Jr. and J. M. Flack (2011). "Alpha 1 adrenoreceptor antagonists." *J Clin Hypertens (Greenwich)* **13**(9): 654-657.
- Hernandez, F., J. J. Lucas, et al. (2013). "GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **33** Suppl 1: S141-144.
- Hong, K., A. H. Gao, et al. (2009). "Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China." *Mar Drugs* **7**(1): 24-44.



- Hong, S., S. H. Kim, et al. (2003). "In vitro anti-inflammatory and pro-aggregative effects of a lipid compound, petrocortyne A, from marine sponges." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **368**(6): 448-456.
- Hooper, C., R. Killick, et al. (2008). "The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease." J Neurochem **104**(6): 1433-1439.
- Huh, J. E., J. H. Yim, et al. (2007). "Prodigiosin isolated from *Hahella chejuensis* suppresses lipopolysaccharide-induced NO production by inhibiting p38 MAPK, JNK and NF-kappaB activation in murine peritoneal macrophages." Int Immunopharmacol **7**(13): 1825-1833.
- Hybertson, B. M., B. Gao, et al. (2011). "Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation." Mol Aspects Med **32**(4-6): 234-246.
- Iqbal, K., S. F. Kazim, et al. (2014). "Shifting balance from neurodegeneration to regeneration of the brain: a novel therapeutic approach to Alzheimer's disease and related neurodegenerative conditions." Neural Regen Res **9**(16): 1518-1519.
- Jahn, H. (2013). "Memory loss in Alzheimer's disease." Dialogues Clin Neurosci **15**(4): 445-454.
- Jiang, F., W. Li, et al. (2013). "Antioxidant, antityrosinase and antitumor activity comparison: the potential utilization of fibrous root part of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f." PLoS One **8**(2): e58004.
- Jomova, K., D. Vondrakova, et al. (2010). "Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders." Mol Cell Biochem **345**(1-2): 91-104.
- Kalinovskaya, N. I., L. A. Romanenko, et al. (2011). "Marine isolate *Citricoccus* sp. KMM 3890 as a source of a cyclic siderophore nocardamine with antitumor activity." Microbiol Res **166**(8): 654-661.
- Keyzers, R. A., P. T. Northcote, et al. (2006). "Spongian diterpenoids from marine sponges." Nat Prod Rep **23**(2): 321-334.
- Kim, E. K. and E. J. Choi (2010). "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases." Biochim Biophys Acta **1802**(4): 396-405.
- Kirkman, H. N. and G. F. Gaetani (2007). "Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries." Trends Biochem Sci **32**(1): 44-50.
- Kremer, A., J. V. Louis, et al. (2011). "GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction." Front Mol Neurosci **4**: 17.
- Kumar, H., I. S. Kim, et al. (2014). "Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases." Nat Prod Rep **31**(1): 109-139.
- Kwak, M. K., K. Itoh, et al. (2002). "Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter." Mol Cell Biol **22**(9): 2883-2892.
- Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L. and C. Fernández-Mejía (2013). Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions.
- Lee, S., C. Jung, et al. (2009). "Exonic point mutations of human tau enhance its toxicity and cause characteristic changes in neuronal morphology, tau distribution and tau phosphorylation in the lamprey cellular model of tauopathy." J Alzheimers Dis **16**(1): 99-111.
- Li, J., W. O, et al. (2013). "Oxidative stress and neurodegenerative disorders." Int J Mol Sci **14**(12): 24438-24475.
- Loffler, T., S. Flunkert, et al. (2012). "Stable mutated tau441 transfected SH-SY5Y cells as screening tool for Alzheimer's disease drug candidates." J Mol Neurosci **47**(1): 192-203.
- Lysek, N., R. Kinscherf, et al. (2003). "L-5-Hydroxytryptophan: antioxidant and anti-apoptotic principle of the intertidal sponge *Hymeniacidon heliophila*." Z Naturforsch C **58**(7-8): 568-572.
- Macias, M. P., A. M. Gonzales, et al. (2014). "A cellular model of amyloid precursor protein processing and amyloid-beta peptide production." J Neurosci Methods **223**: 114-122.

- Magder, S. (2006). "Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?" Crit Care **10**(1): 208.
- Mangialasche, F., A. Solomon, et al. (2010). "Alzheimer's disease: clinical trials and drug development." Lancet Neurol **9**(7): 702-716.
- Manzano, S., J. L. González, et al. (2009). "Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer." Neurología **24**(4): 255-262.
- Martin, L., X. Latypova, et al. (2013). "Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease." Ageing Res Rev **12**(1): 289-309.
- Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature **430**(7000): 631-639.
- Mayer, A. M. and K. R. Gustafson (2003). "Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds." Int J Cancer **105**(3): 291-299.
- Mayer, A. M. and K. R. Gustafson (2004). "Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds." Eur J Cancer **40**(18): 2676-2704.
- Mayer, A. M. and K. R. Gustafson (2006). "Marine pharmacology in 2003-2004: anti-tumour and cytotoxic compounds." Eur J Cancer **42**(14): 2241-2270.
- Mayer, A. M. and K. R. Gustafson (2008). "Marine pharmacology in 2005-2006: antitumour and cytotoxic compounds." Eur J Cancer **44**(16): 2357-2387.
- Mayer, A. M. and M. T. Hamann (2002). "Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **132**(3): 315-339.
- Mayer, A. M. and M. T. Hamann (2004). "Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action." Mar Biotechnol (NY) **6**(1): 37-52.
- Mayer, A. M. and M. T. Hamann (2005). "Marine pharmacology in 2001--2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **140**(3-4): 265-286.
- Mayer, A. M. and V. K. Lehmann (2001). "Marine pharmacology in 1999: antitumor and cytotoxic compounds." Anticancer Res **21**(4A): 2489-2500.
- Mayer, A. M., A. D. Rodriguez, et al. (2011). "Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **153**(2): 191-222.
- Mayer, A. M., A. D. Rodriguez, et al. (2007). "Marine pharmacology in 2003-4: marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **145**(4): 553-581.
- Mayer, A. M., A. D. Rodriguez, et al. (2009). "Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities;

- affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action." *Biochim Biophys Acta* **1790**(5): 283-308.
- Mayer, A. M., A. D. Rodriguez, et al. (2013). "Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action." *Mar Drugs* **11**(7): 2510-2573.
- Mehbub, M., J. Lei, et al. (2014). "Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives." *Marine Drugs* **12**(8): 4539-4577.
- Meijer, L., A. M. Thunnissen, et al. (2000). "Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 $\beta$  and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent." *Chem Biol* **7**(1): 51-63.
- Melo, A., L. Monteiro, et al. (2011). "Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives." *Oxid Med Cell Longev* **2011**: 467180.
- Mollica, A., M. Locatelli, et al. (2012). "Synthesis and bioactivity of secondary metabolites from marine sponges containing dibrominated indolic systems." *Molecules* **17**(5): 6083-6099.
- Montaner, B. and R. Perez-Tomas (2003). "The prodigiosins: a new family of anticancer drugs." *Curr Cancer Drug Targets* **3**(1): 57-65.
- Moore, B. S., J. A. Kalaitzis, et al. (2005). "Exploiting marine actinomycete biosynthetic pathways for drug discovery." *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**(1): 49-57.
- Mugoni, V. and M. M. Santoro (2013). *Manipulating Redox Signaling to Block Tumor Angiogenesis*.
- Munoz, L. and A. J. Ammit (2010). "Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease." *Neuropharmacology* **58**(3): 561-568.
- Murray, P. M., S. Moane, et al. (2013). "Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin." *N Biotechnol* **30**(6): 839-850.
- Nacharaju, P., J. Lewis, et al. (1999). "Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations." *FEBS Lett* **447**(2-3): 195-199.
- Naruse, N., M. Goto, et al. (1998). "K1115 A, a new anthraquinone that inhibits the binding of activator protein-1 (AP-1) to its recognition sites. II. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and structure determination." *J Antibiot (Tokyo)* **51**(6): 545-552.
- Nirmal, N., G. O. Praba, et al. (2008). "Modeling studies on phospholipase A2-inhibitor complexes." *Indian J Biochem Biophys* **45**(4): 256-262.
- Oddo, S., A. Caccamo, et al. (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction." *Neuron* **39**(3): 409-421.
- Ola, M. S., M. Nawaz, et al. (2011). "Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis." *Mol Cell Biochem* **351**(1-2): 41-58.
- Olivares, Y. (2011). "Los misterios que alberga el lugar más árido del mundo." 2014, from <http://www.hablandodeciencia.com/articulos/2011/12/06/los-misterios-que-alberga-el-lugar-mas-arido-del-mundo/>.
- Pamplona, R. and D. Costantini (2011). "Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**(4): R843-863.
- Pandey, R., R. Chander, et al. (2007). "Prodigiosins: a novel family of immunosuppressants with anti-cancer activity." *Indian J Biochem Biophys* **44**(5): 295-302.
- Panza, F., V. Frisardi, et al. (2010). "REVIEW: gamma-Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: The current state." *CNS Neurosci Ther* **16**(5): 272-284.
- Pasciu, V., A. M. Posadino, et al. (2010). "Akt downregulation by flavin oxidase-induced ROS generation mediates dose-dependent endothelial cell damage elicited by natural antioxidants." *Toxicol Sci* **114**(1): 101-112.

- Pei, J. J., H. Braak, et al. (2002). "Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease." *Brain Res Mol Brain Res* **109**(1-2): 45-55.
- Persson, T., B. O. Popescu, et al. (2014). "Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail?" *Oxid Med Cell Longev* **2014**: 427318.
- Poljsak, B. and I. Milisav (2013). *Aging, Oxidative Stress and Antioxidants*.
- Poljsak, B., D. Suput, et al. (2013). "Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants." *Oxid Med Cell Longev* **2013**: 956792.
- Potterat, O., H. Zahner, et al. (1993). "Metabolic products of microorganisms. 264. Exfoliamycin and related metabolites, new naphthoquinone antibiotics from *Streptomyces exfoliatus*." *J Antibiot (Tokyo)* **46**(2): 346-349.
- Puzzo, D., L. Lee, et al. (2014). "Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines." *Biochem Pharmacol* **88**(4): 450-467.
- Rane, R., N. Sahu, et al. (2014). "Marine bromopyrrole alkaloids: synthesis and diverse medicinal applications." *Curr Top Med Chem* **14**(2): 253-273.
- Rateb, M. E., W. E. Houssen, et al. (2011). "Chaxamycins A-D, bioactive ansamycins from a hyper-arid desert *Streptomyces* sp." *J Nat Prod* **74**(6): 1491-1499.
- Rateb, M. E., W. E. Houssen, et al. (2009). "Bioactive diterpene derivatives from the marine sponge *Spongionella* sp." *J Nat Prod* **72**(8): 1471-1476.
- Rocha-Santos, T. and A. C. Duarte (2014). Chapter 1 - Introduction to the Analysis of Bioactive Compounds in Marine Samples. *Comprehensive Analytical Chemistry*. R.-S. Teresa and C. D. Armando, Elsevier. **Volume 65**: 1-13.
- Roshak, A., J. R. Jackson, et al. (1997). "Inhibition of NFkappaB-mediated interleukin-1beta-stimulated prostaglandin E2 formation by the marine natural product hymenialdisine." *J Pharmacol Exp Ther* **283**(2): 955-961.
- Sagar, S., M. Kaur, et al. (2010). "Antiviral lead compounds from marine sponges." *Mar Drugs* **8**(10): 2619-2638.
- Savelieff, M. G., S. Lee, et al. (2013). "Untangling amyloid-beta, tau, and metals in Alzheimer's disease." *ACS Chem Biol* **8**(5): 856-865.
- Scandalios, J. G. (2005). "Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses." *Braz J Med Biol Res* **38**(7): 995-1014.
- Sclip, A., A. Tozzi, et al. (2014). "c-Jun N-terminal kinase has a key role in Alzheimer disease synaptic dysfunction in vivo." *Cell Death Dis* **5**: e1019.
- Schneider, L. S., F. Mangialasche, et al. (2014). "Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014." *J Intern Med* **275**(3): 251-283.
- Seto-Salvia, N. and J. Clarimon (2010). "[Genetics of Alzheimer's disease]." *Rev Neurol* **50**(6): 360-364.
- Sharma, V., T. A. Lansdell, et al. (2004). "Inhibition of cytokine production by hymenialdisine derivatives." *J Med Chem* **47**(14): 3700-3703.
- Shimoni, E., M. Ampel, et al. (1998). "Antioxidant properties of desferrioxamine E, a new hydroxamate antioxidant." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **75**(10): 1453-1455.
- Singh, S., A. S. Kushwah, et al. (2012). "Current therapeutic strategy in Alzheimer's disease." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **16**(12): 1651-1664.
- Stankovic, N., V. Radulovic, et al. (2012). "*Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties." *Appl Microbiol Biotechnol* **96**(5): 1217-1231.
- Sultana, R., M. Perluigi, et al. (2013). "Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain." *Free Radic Biol Med* **62**: 157-169.

- Tamagno, E., M. Guglielmo, et al. (2009). "JNK and ERK1/2 pathways have a dual opposite effect on the expression of BACE1." *Neurobiol Aging* **30**(10): 1563-1573.
- Tasdemir, D., R. Mallon, et al. (2002). "Aldisine alkaloids from the Philippine sponge *Stylissa massa* are potent inhibitors of mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK-1)." *J Med Chem* **45**(2): 529-532.
- Tell, V. and A. Hilgeroth (2013). "Recent developments of protein kinase inhibitors as potential AD therapeutics." *Front Cell Neurosci* **7**: 189.
- Thomas, T. R., D. P. Kavlekar, et al. (2010). "Marine drugs from sponge-microbe association--a review." *Mar Drugs* **8**(4): 1417-1468.
- Triana-Vidal, L. E. and S. M. Carvajal-Varona (2013). "Protective Effect of Galantamine Against Oxidative Damage Using Human Lymphocytes: A Novel In Vitro Model." *Archives of Medical Research* **44**(2): 85-92.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Physiol* **552**(Pt 2): 335-344.
- Ureña, T., A. Dalfó, et al. (2011). PUNTOS DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA EN HIPERTENSIÓN ARTERIAL, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(1): 44-84.
- Van Soest, R. W., N. Boury-Esnault, et al. (2014). "World Porifera database." Retrieved [13-11-2014, from <http://www.marinespecies.org/porifera>.
- Van Soest, R. W., N. Boury-Esnault, et al. (2012). "Global diversity of sponges (Porifera)." *PLoS One* **7**(4): e35105.
- Wang, X. and E. K. Michaelis (2010). "Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain." *Front Aging Neurosci* **2**: 12.
- Wang, X., W. Wang, et al. (2014). "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* **1842**(8): 1240-1247.
- Wilt, T. J. and J. N'Dow (2008). "Benign prostatic hyperplasia. Part 2--management." *BMJ* **336**(7637): 206-210.
- Williams, R. J. and J. P. Spencer (2012). "Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease." *Free Radic Biol Med* **52**(1): 35-45.
- Wischik, C. M., C. R. Harrington, et al. (2014). "Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease." *Biochem Pharmacol* **88**(4): 529-539.
- Wu, I. C., C. A. Hsiung, et al. (2014). Chapter 1 - Oxidative Stress and Frailty: A Closer Look at the Origin of a Human Aging Phenotype. *Aging*. V. R. Preedy. San Diego, Academic Press: 3-14.
- Xu Yz, Y., K. Yakushijin, et al. (1997). "Synthesis of C(11)N(5) Marine Sponge Alkaloids: (+/-)-Hymenin, Stevensine, Hymenialdisine, and Debromohymenialdisine." *J Org Chem* **62**(3): 456-464.
- Yan, R. and R. Vassar (2014). "Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy." *Lancet Neurol* **13**(3): 319-329.
- Zhang, H., Y. Wang, et al. (2008). "Bacterial hosts for natural product production." *Mol Pharm* **5**(2): 212-225.
- Zhao, G., C. Yao-Yue, et al. (2012). "Luteolin from Purple Perilla mitigates ROS insult particularly in primary neurons." *Neurobiol Aging* **33**(1): 176-186.
- Zorov, D. B., M. Juhaszova, et al. (2009). "Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore." *Cardiovasc Res* **83**(2): 213-225.