

# ESTUDIO DE NITRONAS COMO INHIBIDORES DE APOPTOSIS EN CÉLULAS NEURONALES

Tesina de grado

**Saira Cancela**

Orientadora: Dra. Alicia Merlino

Co-orientadora: Dra. Paola Hernández

**Noviembre 2015**



## Contenidos

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>4</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>7</b>
<b>I. Introducción y antecedentes .....</b>	<b>8</b>
<i>1. Enfermedad de Alzheimer (EA) .....</i>	<i>9</i>
1.1 Relevancia del tema.....	9
1.2 Hipótesis clásicas .....	10
1.3 Fármacos utilizados en la actualidad .....	13
<i>2. Nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de EA.....</i>	<i>14</i>
2.1 Rol de la caspasa-3 en el inicio y progresión de EA .....	14
2.2 Caspasas: Función, estructura y actividad .....	16
2.3 Mecanismo de reconocimiento y unión del sustrato .....	18
2.4 Sustrato, análogo de sustrato e inhibidores de caspasas.....	20
<i>3. Nitronas como potenciales fármacos para el tratamiento de EA .....</i>	<i>21</i>
3.1 Estructura química y propiedades farmacológicas.....	21
<i>4. Antecedentes del grupo de investigación.....</i>	<i>24</i>
4.1 Ensayos experimentales y modelado computacional .....	24
<b>II. Objetivo.....</b>	<b>26</b>
<i>Objetivo general.....</i>	<i>27</i>
<i>Objetivos específicos .....</i>	<i>27</i>

<b>III. Materiales y métodos .....</b>	<b>28</b>
1. <i>Ensayos de citotoxicidad por MTT-formazán en la línea celular HT22 ..</i>	29
2. <i>Estudios de inhibición apoptótica y determinación de caspasa-3 activa inducida por Camptotecina en la línea celular HT22.....</i>	29
2.1 Determinación de apoptosis mediante tinción con anexina V-FITC / IP ..	29
2.2 Cuantificación de caspasa-3 activa mediante detección con anticuerpo anti-caspasa-3-FITC.....	30
3. <i>Estudios computacionales.....</i>	30
3.1 Optimización de las estructuras de las nitronas .....	30
3.2 Docking molecular ligando-proteína.....	31
3.3 Simulaciones de dinámica molecular.....	31
<b>IV. Resultados y discusión.....</b>	<b>32</b>
1. <i>Evaluación de citotoxicidad mediante ensayos con MTT .....</i>	33
2. <i>Puesta a punto para la detección de apoptosis por anexina V-FITC / IP .....</i>	34
3. <i>Ensayos de detección de apoptosis en células HT22 por anexina V-FITC / IP .....</i>	37
4. <i>Ensayos de detección de caspasa-3 activa en células HT22 .....</i>	39
5. <i>Dinámica Molecular .....</i>	41
<b>V. Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>49</b>
<b>VI. Referencias .....</b>	<b>51</b>

## *Agradecimientos*

En primer lugar quiero agradecer a mis padres que siempre me apoyaron y me alentaron a que estudiara lo que me hiciera feliz, y hoy gracias a ellos me estoy recibiendo.

También quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron de alguna forma a que este trabajo fuera exitoso.

A mis tutoras, Alice y Paola, por incentivar-me, darme para adelante, ser pacientes, por todas las enseñanzas, discusiones, sugerencias, ideas y por sobre todas las cosas por ser tan buenas personas.

A mis queridos compañeros del LQTC: Florcita, Klein, Lucy, Steph, Fede, Jenner por la disposición y la buena onda.

A Laura Coitiño y Willner Martínez por permitirme realizar mi trabajo de tesina en sus correspondientes laboratorios.

A Gustavo Mourglia por haber colaborado con los ensayos de apoptosis y haber estado siempre predispuesto a ayudar.

A Williams Porcal por haberme cedido sus preciadas nitronas.

A Fer por ser esa persona incondicional que está siempre a pesar de mis locuras y mis rayes.

A mis amigas de siempre, Mai, Sofi, Luli, Flo, Vero, Eli por hacerme reír y gozar de las buenas cosas de la vida.

A mis hermanas por el cariño.

Y a todos aquellos que no nombre pero que forman parte de mi vida y que de alguna manera u otra me hacen ser la persona que soy hoy.

¡Muchísimas gracias a todos por tanto!

*La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código INI\_X\_2013\_1\_101148.*

## Resumen

La enfermedad del Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo de gran incidencia a nivel mundial. Si bien las causas de esta enfermedad son objeto de controversia, se ha propuesto que el aumento en la actividad caspasa-3 en las etapas iniciales de la enfermedad está vinculado al desarrollo de alteraciones en la transmisión sináptica. Estudios recientes en modelos murinos de EA describen una interesante correlación entre la activación local de la enzima caspasa-3 a nivel de espinas dendríticas y la aparición de los primeros signos de pérdida de memoria. Asimismo, se ha observado que la inhibición de caspasa-3 es capaz de restaurar la transmisión sináptica en ratones con síntomas iniciales de EA. La participación de caspasa-3 en las etapas iniciales de EA así como los resultados positivos obtenidos tras su inhibición convierten a esta enzima en un interesante blanco terapéutico para el tratamiento o prevención de esta enfermedad.

Por otro lado, se sabe que el estrés oxidativo a nivel del sistema nervioso central juega un papel importante en patologías neurodegenerativas. Se ha descrito con anterioridad que las nitronas tienen una elevada capacidad antioxidante frente a radicales hidroxilo, superóxido y óxido nítrico, atraviesan la barrera hematoencefálica y presentan propiedades neuroprotectoras, así como también la capacidad de inhibir la cascada apoptótica dependiente de la mitocondria. Todo esto las vuelve un interesante grupo funcional para incluir en potenciales fármacos frente a EA.

Es por estos motivos que en el presente trabajo se ha determinado la capacidad de un grupo de nitronas no citotóxicas de inhibir la apoptosis inducida por Camptotecina mediante anexina V-FITC y anticuerpo anti-caspasa-3-activa-FITC en la línea celular neuronal derivada de hipocampo de ratón HT22 mediante la detección por citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran que los compuestos evaluados inhiben la apoptosis en las células de manera significativa y al menos seis de éstos lo hacen mediante un mecanismo que implica la reducción de la enzima caspasa-3 activa en las células. Por otro lado, estudios teóricos de *docking* y dinámica molecular han permitido analizar a nivel atómico detallado el modo de unión de dichas nitronas frente a caspasa-3 activa, mostrando que las mismas se unen en una región próxima al sitio activo interactuando con residuos que son esenciales para la catálisis y en algunos casos no se encuentran conservados en otras caspasas provocando cambios conformacionales a nivel del sitio catalítico. Actualmente se están probando estos compuestos mediante ensayos de inhibición enzimática de caspasa-3 *in vitro*, los resultados preliminares hasta el momento estarían indicando que las nitronas son capaces de unirse a la caspasa-3 e inhibirla, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos hasta el momento.

Como perspectiva a futuro nos planteamos profundizar en el estudio del mecanismo mediante el cual las nitronas son capaces de inhibir la caspasa-3 a través de un enfoque multidisciplinario que involucra ensayos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*.

## Abreviaturas

<b>A<math>\beta</math></b>	Péptido beta-amiloide
<b>AMPA</b>	Receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide
<b>AV</b>	Anexina V
<b>BCL</b>	Baicaleina
<b>CPT</b>	Camptotecina
<b>DFT</b>	<i>Density Functional Theory</i>
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Minimal Essential Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EDTA</b>	Ácido etilen diamino tetra-acético
<b>IEF-PCM</b>	<i>Integral Equation Formalism - Polarizable Continuum Model</i>
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>MD</b>	<i>Molecular Dynamics</i>
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol
<b>NFTs</b>	Neurofibrillary tangles
<b>NMDA</b>	Receptores de N-metil-D-aspartato
<b>RMSD</b>	<i>Root-mean square deviation</i>
<b>RMSF</b>	<i>Root-mean square fluctuation</i>
<b>RMN</b>	<i>Resonancia Magnética Nuclear</i>
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>STP</b>	Estaurosporina

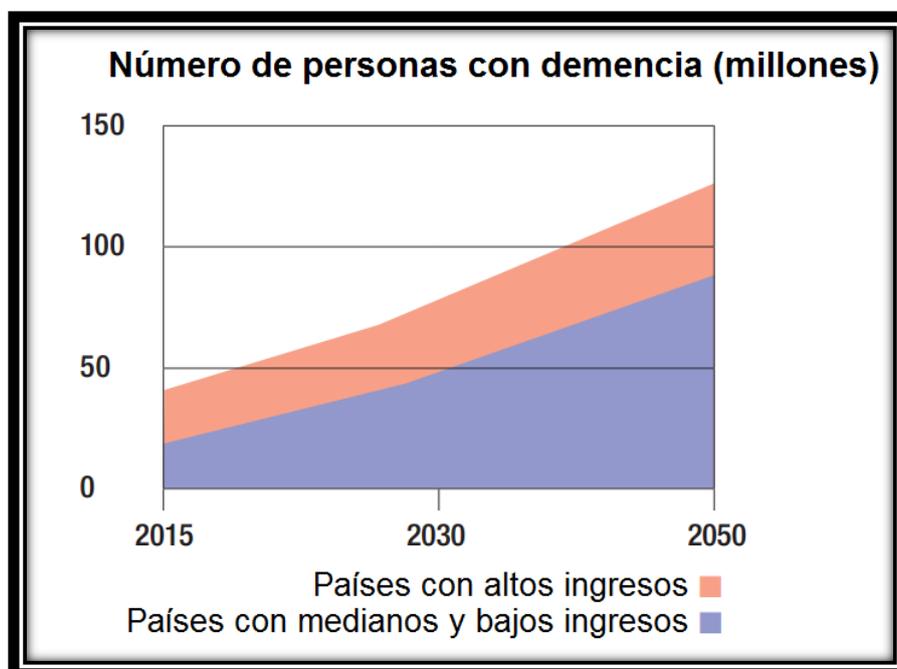
## **I. Introducción y antecedentes**

## 1. Enfermedad de Alzheimer (EA)

### 1.1 Relevancia del tema

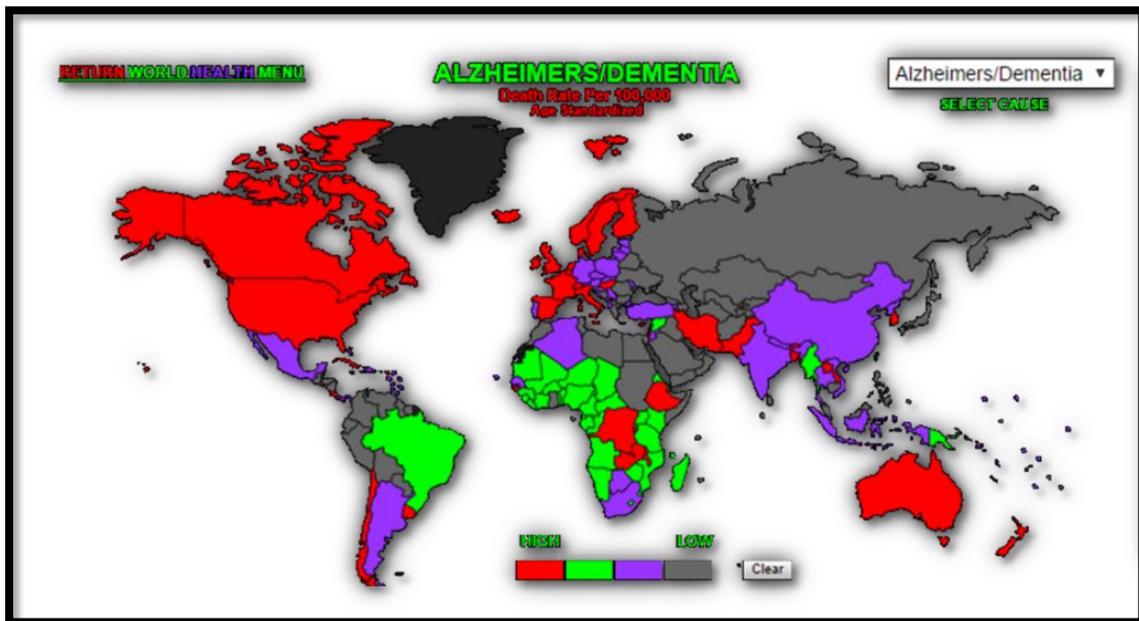
La enfermedad del Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo con una gran incidencia a nivel mundial caracterizado por la pérdida progresiva de memoria y funciones cognitivas llegando finalmente a la demencia [1]. Esto sucede debido a que inicialmente las neuronas en ciertas regiones del cerebro encargadas de generar la memoria comienzan a ser disfuncionales, dificultándose la correcta propagación de las señales cerebrales y concluyendo finalmente en la muerte de las células nerviosas [2]. Al comienzo de la enfermedad es difícil recordar nueva información y cuando el daño avanza en el cerebro, se empiezan a notar cambios de ánimo y comportamiento así como también desorientación. En etapas avanzadas de la enfermedad se observan dificultades incluso para hablar, tragar y caminar [3].

Hoy en día a nivel mundial aproximadamente 46.8 millones de personas padecen de esta enfermedad. Se estima que para el año 2030 el número de personas afectadas se incrementará a 74.7 millones y a 131.5 millones para el año 2050. Los países con ingresos medios y bajos son los que presentan mayor prevalencia, incidencia y costo de tratamiento de esta enfermedad. Se estima que en la actualidad el 58% de las personas afectadas residen en estos países y que para el 2050 se extenderá al 68% (Figura 1). Por año en el mundo hay más de 9.9 millones de casos nuevos de demencia, lo que implica un caso nuevo cada 3.2 segundos. Los costos globales de esta patología que implican cuidado médico, social, de enfermería y residencial aumentó de US\$ 604 billones en el 2010 a US\$ 818 billones en el 2015, lo que equivale a un incremento del 34.5% [4].



**Figura 1.** Aumento estimado de personas afectadas por EA en los próximos años, discriminando entre países con altos y bajos recursos (en rosado y celeste respectivamente). Tomado de ref. [4].

Según datos del sitio web *World Life Expectancy*, Uruguay se encuentra en el duodécimo lugar en el ranking de mortalidad causada por EA a nivel mundial, indicando que de cada 100.000 personas 17.5 mueren anualmente a causa de esta enfermedad en nuestro país [5] (Figura 2).



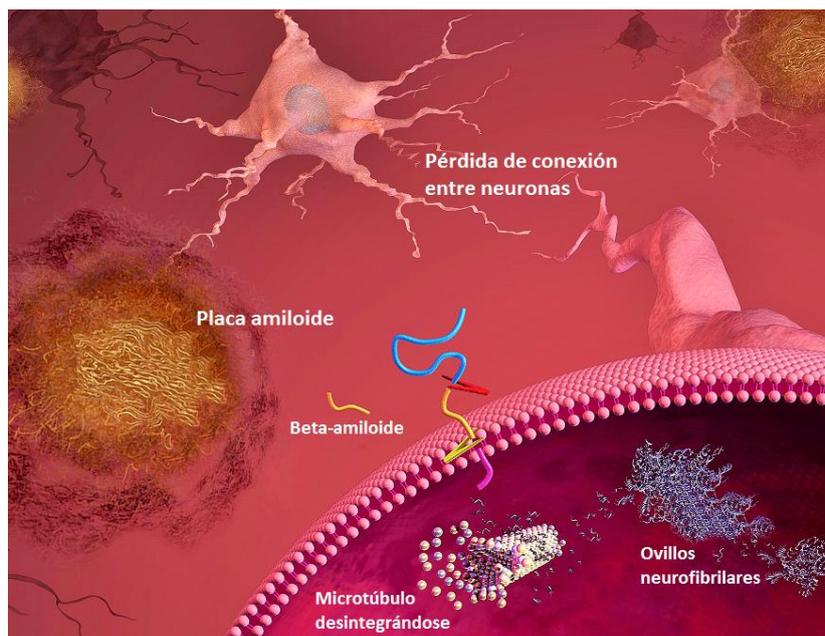
**Figura 2.** Mapa que clasifica a todos los países del mundo por su tasa de mortalidad debido a la enfermedad de Alzheimer. Tomado de ref. [5].

## 1.2 Hipótesis clásicas

Hasta el momento no se sabe exactamente cuáles son las causas de esta enfermedad, sin embargo se conocen estructuras patológicas características como las placas seniles o amiloides, que se relacionan con la acumulación de agregados del péptido  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) y los ovillos neurofibrilares (NFTs, del inglés *neurofibrillary tangles*) que surgen de la hiperfosforilación de la proteína Tau asociada a los microtúbulos en las neuronas. Estos patrones característicos se observan en zonas específicas del cerebro como corteza, hipocampo y algunas regiones subcorticales. Como consecuencia de esto, se observa una marcada pérdida de sinapsis así como también un aumento en la muerte de células nerviosas y por ende un menor número de neuronas funcionales [6,7] (Figura 3).

A lo largo de los años se han manejado diversas hipótesis que, si bien han brindado un marco de referencia para las investigaciones sobre esta enfermedad, no han logrado dar cuenta del origen de la misma. La **hipótesis colinérgica** se basa en el déficit neocortical de la enzima responsable de producir acetilcolina (ACh) llamada colina acetil transferasa (ChAT). Esta hipótesis sostiene que la degeneración de neuronas colinérgicas y la pérdida de la neurotransmisión colinérgica asociada contribuyen significativamente al deterioro cognitivo observado en la enfermedad de Alzheimer [8-11]. Según la **hipótesis amiloide** de la EA, la sobreproducción de  $A\beta$ , fragmento aminoacídico de 37-43 aminoácidos, es la consecuencia de la interrupción de los procesos homeostáticos que regulan la escisión proteolítica de la proteína precursora amiloide (APP) [12]. La proteína APP es una proteína transmembrana tipo I codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 21, se conforma por un segmento extracelular amino terminal largo y un

segmento intracelular carboxilo terminal corto pudiendo presentar varias isoformas. Se expresa en varias células del organismo incluidas las neuronas, células musculares lisas de la pared vascular y plaquetas. De manera constitutiva el clivaje sucesivo de APP por  $\alpha$ -secretasas no genera el péptido A $\beta$ . Este mecanismo se conoce como vía no amiloidogénica. Sin embargo, en condiciones patológicas la proteína precursora es degradada consecutivamente por las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasas lo cual resulta en la producción y acumulación de los péptidos A $\beta$ 40 o A $\beta$ 42 los cuales forman agregados insolubles altamente neurotóxicos. A este proceso se lo conoce como vía amiloidogénica [12-15].

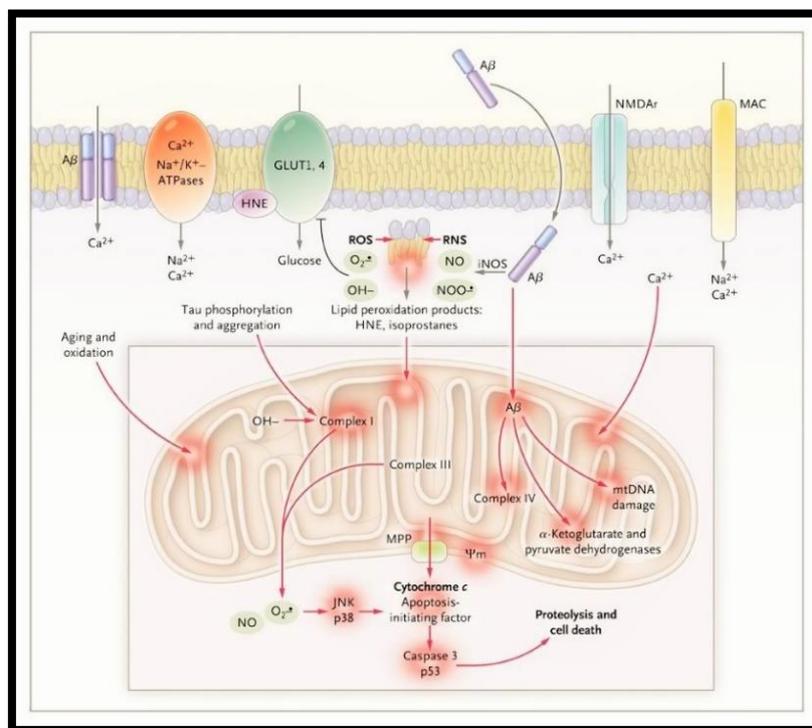


**Figura 3.** Imagen que muestra de forma esquemática las estructuras patológicas características de EA. Adaptado de ref. [16].

Existe también la **hipótesis glutamérgica** que sostiene que la reducción de terminales nerviosas conteniendo glutamato puede incrementar la actividad del calcio en la célula causando neurotoxicidad [15 - 19]. El calcio modula varios procesos neuronales entre los que se destacan la plasticidad neuronal y la muerte celular programada (apoptosis). La apoptosis involucra cambios en el citoplasma, el retículo endoplasmático (RE), la mitocondria y el núcleo. Típicamente aumenta la permeabilidad de la membrana de la mitocondria y del RE liberándose al citoplasma citocromo c de la mitocondria y calcio del RE. El aumento en la muerte celular observado en EA involucra A $\beta$ , activación de los receptores de glutamato, aumento del estrés oxidativo, daño en el ADN y aumento en los niveles de calcio intracelular. Se sabe que por medio del estrés oxidativo A $\beta$  perturba la regulación del calcio en las células mediante el deterioro de las bombas de calcio de membrana y aumento de la entrada de calcio a través de canales voltaje-dependientes y receptores ionotrópicos de glutamato conduciendo a la excitotoxicidad [20-22]. Otros hallazgos sugieren que A $\beta$  puede promover la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la formación de canales en membranas o por la activación de receptores de superficie celular acoplados a la entrada de calcio (Figura 4) [23,24]. Por otra parte, el glutamato puede actuar en los receptores NMDA de las neuronas y resultar en la desregulación de procesos dependientes de calcio

incluyendo el aprendizaje y la pérdida de memoria [15,17]. Se ha observado que la activación de NMDA estimula el procesamiento de APP para generar A $\beta$  [18]. De este modo, un exceso de glutamato conduce a la sobre-estimulación de estos receptores que puede culminar en una producción excesiva de péptido A $\beta$  [19].

Por otro lado, en pacientes con EA familiar se han observado mutaciones en las presenilinas, proteínas de membrana encargadas de modular el balance de calcio en las células. Si a esto le sumamos el procesamiento amiloidogénico del APP descrito anteriormente obtenemos la desestabilización de la homeostasis del Ca $^{2+}$  en el retículo endoplasmático de astrocitos, oligodendrocitos y microglía que pueden desencadenar procesos inflamatorios locales [25,26]. Esto se correlaciona con la microglía activada y los astrocitos reactivos que se localizan en las placas fibrilares de cerebros de pacientes con EA [27].



**Figura 4.** Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en enfermedades neurodegenerativas. Tomado de ref. [14].

Al mismo tiempo, en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer hay un aumento en el **estrés oxidativo** y un metabolismo energético alterado. La disfunción mitocondrial conduce a un número deletéreo de consecuencias para las neuronas, incluyendo alteraciones en la concentración de calcio, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la activación de la sintasa de óxido nítrico y la activación de la transición de permeabilidad mitocondrial fenómeno en el cual se produce un cambio abrupto en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna en respuesta a calcio, estrés oxidativo y depleción de ATP, entre otros factores [28].

Los cerebros de personas con EA presentan proteínas, lípidos y ADN con elevado daño oxidativo. Esto se debe a que las especies reactivas de oxígeno inducen glicoxidaciones y peroxidaciones lipídicas generando una variedad de compuestos electrofílicos capaces de reaccionar con

proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que pueden formar el "crosslinking" de proteínas y daño al ADN.

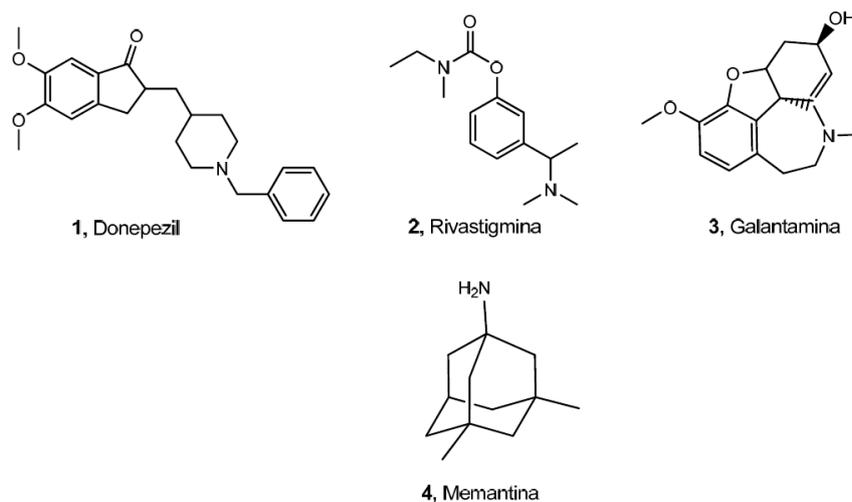
Además, los productos de estas reacciones, son capaces de interactuar con receptores a múltiples ligandos que activan señales de transducción induciendo la formación de citoquinas pro-inflamatorias y que son en parte, responsables del comienzo y la progresión de neuropatías y diabetes [29].

Este ambiente oxidativo se encuentra sobre todo en zonas ricas en placas amiloides y ovillos neurofibrilares sugiriendo que el mismo juega un rol importante en el daño neuronal mediado por el péptido amiloide y los ovillos neurofibrilares [30].

Se sabe que en el proceso de agregación, A $\beta$  interactúa con cationes metálicos específicos como Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup>. Esto induce la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio extracelular promoviendo la peroxidación lipídica en membranas con la generación de 4-hidroxinonenal, un aldehído muy reactivo y neurotóxico que modifica covalentemente proteínas tales como ATPasas, transportadores de glucosa y glutamato y proteínas G en las células, alterando su función [31-35].

### 1.3 Fármacos utilizados en la actualidad

Los fármacos desarrollados hasta la fecha en base a las hipótesis que se manejan hoy en día sólo aminoran los síntomas de EA de manera transitoria y presentan diversos efectos secundarios. Entre estos, se destacan inhibidores de colinesterasa como son Tacrina, Donepezil, Galantamina y Rivastigmina (Figura 5) cuyo uso genera una mejora cognitiva pero tienen la desventaja de tener varios efectos adversos. Entre ellos se destacan vómitos, náuseas, diarrea, dispepsia, calambres musculares, fatiga e irritación en la piel [11]. Tacrina fue retirada del mercado en 2012 debido a su hepatotoxicidad [36]. También se han descrito antagonistas del receptor NMDA, el más conocido es Memantina (Figura 5), el cual inhibe la activación patológica del receptor NMDA mediada por oligómeros A $\beta$  solubles [37].



**Figura 5.** Estructura química de los fármacos utilizados para el tratamiento de los síntomas asociados a EA.

Una opción alternativa para una terapia frente a EA fue propuesta recientemente en base a anticuerpos anti-A $\beta$ . Sin embargo, los mismos no fueron capaces de superar los ensayos clínicos de fase III ya que se observó que son poco eficientes en cuanto a la mejora cognitiva en pacientes con Alzheimer en etapas intermedias [38].

Dado que ninguno de estos tratamientos ha sido capaz de detener o revertir la enfermedad resulta necesario continuar con la investigación y desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a blancos terapéuticos alternativos para el tratamiento o prevención de esta enfermedad.

## 2. Nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de EA

### 2.1 Rol de la caspasa-3 en el inicio y progresión de EA

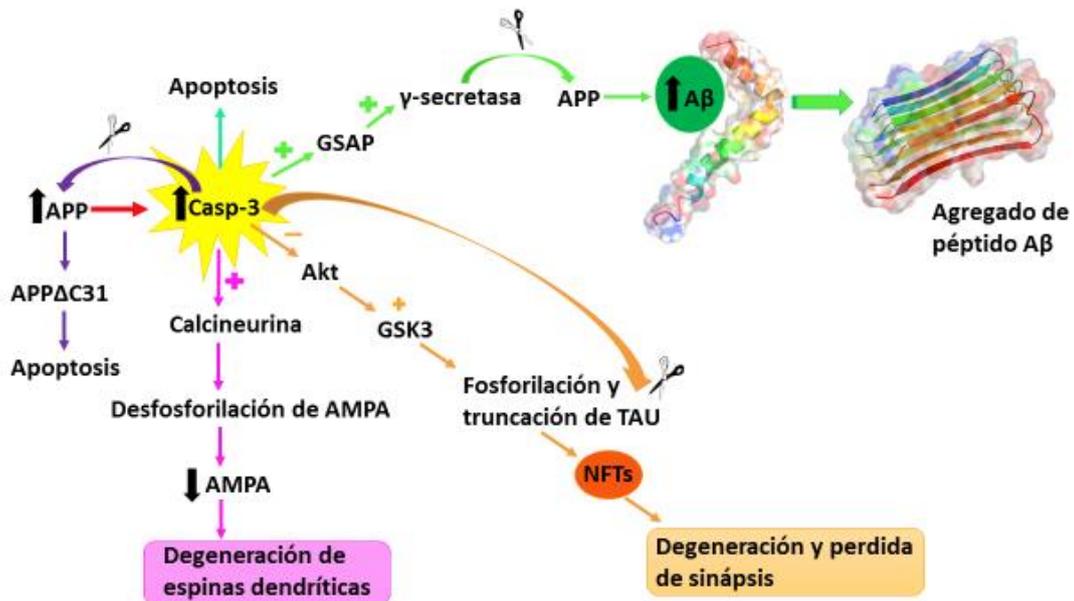
En estos últimos años se ha incrementado la búsqueda de nuevos blancos enzimáticos cuya inhibición podría resultar efectiva para una terapia frente a EA, como ser  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas, caspasas y glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) [39]. En particular caspasa-3 se ha identificado como un blanco molecular común a varios desordenes neurodegenerativos como EA, enfermedad del Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) [40,41].

Recientemente se ha encontrado que caspasa-3 entre otras caspasas promueve la neuroinflamación mediante la activación de la microglía, la cual produce factores pro-inflamatorios que pueden ser neurotóxicos. Por esta razón, se ha observado que tratamientos con agentes anti-inflamatorios pueden reducir la neurodegeneración [42].

Por otro lado, en estos últimos años se ha venido observando que APP, además de ser clivada proteolíticamente por medio de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas, es también sustrato de caspasa-3 conteniendo tres sitios de clivaje en la secuencia proteica: dos en el dominio extracelular y uno en el extremo intracelular C-terminal [43]. Muchos estudios han demostrado que el clivaje de APP mediado por caspasa-3 altera su procesamiento proteolítico normal favoreciendo la vía amiloidogénica [44,45]. Estudios posteriores sostienen que el aumento del péptido A $\beta$  observado después de la activación de caspasa-3 es independiente del clivado del APP por esta enzima [46]. Sin embargo, se demostró que el péptido A $\beta$  induce a la caspasa-3 a clivar el APP en la posición Asp664 de la región C-terminal del mismo liberando el fragmento C-terminal (C31) potencialmente citotóxico. Recientemente se encontró una dependencia entre C31 y la inducción de apoptosis mediante A $\beta$  lo que sugiere que existe una conexión entre la citotoxicidad del A $\beta$  y el fragmento C31 [47]. Un trabajo actual que compara distintas características fenotípicas del Alzheimer en un modelo de ratones transgénicos con EA frente al mismo modelo careciendo del sitio de clivado Asp664 en APP para la caspasa-3, demuestra que a pesar de no ver diferencias en la producción de A $\beta$  y la formación de las placas seniles, la mutación Asp-Ala664 impidió la pérdida sináptica, el aumento anormal en el número de astrocitos debido a la destrucción de las neuronas próximas, la neurogénesis y el comportamiento anormal propio de la enfermedad [48]. Por otro lado, un artículo de este año en el cual se describen experimentos genéticos, farmacológicos y de mutagénesis usando ratones transgénicos y muestras de tejido de cerebro de pacientes humanos *post-mortem*,

mostró que el aumento del péptido A $\beta$  está dado por la activación vía caspasa-3 de la proteína activadora de  $\gamma$ -secretasa conocida como GSAP responsable de generar los péptidos A $\beta$ 41 y A $\beta$ 42 encontrados en las placas amiloides. Asimismo, también se observó que la inhibición de caspasa-3 disminuye significativamente la fosforilación de la proteína Tau en modelos murinos transgénicos [49]. Esto se correlaciona con el hecho que caspasa-3 se encuentra implicada también en la truncación de Tau ya que la primera cliva a la proteína Akt1 supresora de la quinasa GSK-3 que fosforila a Tau, [50,51] lo que favorece la formación de ovillos neurofibrilares que contribuyen a la degeneración sináptica [49,52,53].

Interesantemente, un artículo reciente que utiliza modelos de ratones transgénicos con EA proporciona evidencias de que hay un aumento en la actividad caspasa-3 en las etapas iniciales de esta enfermedad, y que esto está vinculado al desarrollo de alteraciones en la transmisión sináptica proporcionándole funciones no apoptóticas dentro de la célula. El modelo propuesto para la pérdida sináptica mediada por el péptido A $\beta$  sostiene que la acumulación de A $\beta$  en las dendritas conlleva al estrés en la mitocondria, la cual libera citocromo-c promoviendo la formación del apoptosoma y finalmente la activación de caspasa-3. Esta activa la calcineurina, que desfosforila a los receptores AMPA con la consecuente remoción de los mismos de la superficie de la dendrita causando degeneración de las espinas dendríticas [49,54]. Como consecuencia de todos estos procesos se producen alteraciones en la transmisión sináptica y plasticidad del sistema nervioso [54]. (Figura 6)



**Figura 6.** Esquema representativo de las funciones que cumple la caspasa-3 en el desarrollo y progreso de EA.

Lo anterior destaca una correlación entre la activación local de la enzima caspasa-3 a nivel de espinas dendríticas y la aparición de los primeros signos de pérdida de memoria. Asimismo, se observó que la inhibición de caspasa-3 es capaz de restaurar la transmisión sináptica en ratones con síntomas iniciales de EA [54].

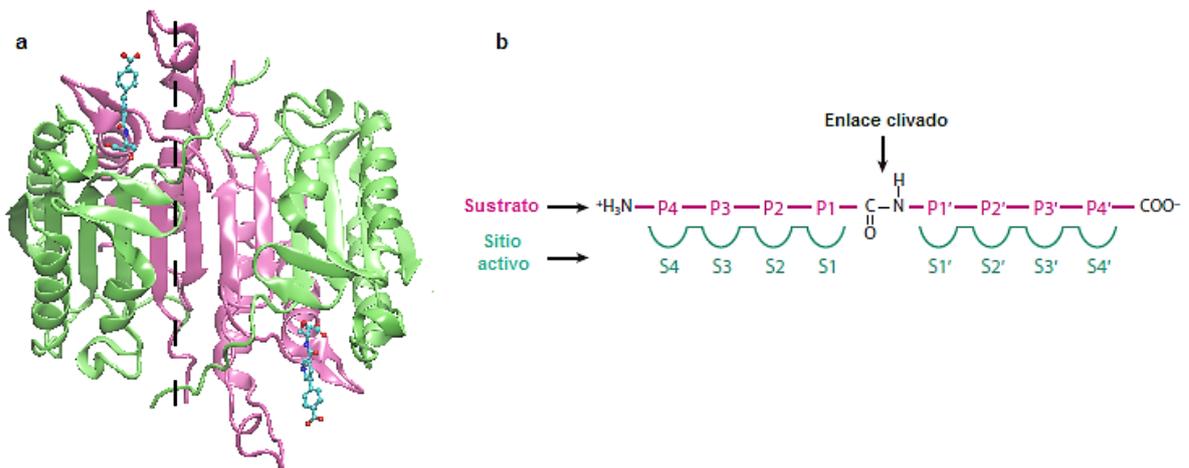
En conjunto, estos hallazgos experimentales sugieren por primera vez que el rol de esta proteasa no es solamente ser un mediador de la muerte celular programada sino que estaría participando de forma activa en la degeneración de la sinapsis neuronal y disfunciones cognitivas durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer [54,55]. La sobreexpresión y activa participación de caspasa-3 en las etapas iniciales de EA así como los resultados positivos obtenidos tras su inhibición estarían sugiriendo que esta enzima podría ser uno de los blancos moleculares responsable del inicio de la enfermedad lo que nos lleva a pensar en la posibilidad de que sea el disparador de EA. Todo esto la convierte en un interesante blanco terapéutico para la prevención o el tratamiento de esta enfermedad.

## 2.2 Caspasas: Función, estructura y actividad

Caspasa-3 forma parte de una familia de cisteín proteasas específicas de aspartato (13 miembros descritos en humanos). Estas proteasas son multifuncionales, poliespecíficas, están altamente reguladas y catalizan diversas reacciones. Una única caspasa puede reconocer y clivar cientos sustratos diferentes manteniendo su especificidad y evitando la expansión de la actividad proteolítica. El número de proteínas que se conoce que son clivadas por caspasas es cercano a 1000, lo que equivale aproximadamente al 5% del proteoma [56]. Al igual que la mayoría de las proteasas, las caspasas se sintetizan como zimógenos y se vuelven activas cuando son clivadas de manera específica [57]. Las mismas son esenciales para la iniciación y ejecución de la muerte celular programada y para el procesamiento y maduración de citoquinas inflamatorias. Estas se clasifican en iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y efectoras (caspasas 3, 6 y 7) de la apoptosis. Las iniciadoras son las primeras en activarse, estas son transductoras de señales que conducen a la muerte de la célula y presentan una alta especificidad de sustrato que les permite reconocer a las caspasas efectoras y activarlas. Las células apoptóticas presentan cambios en la morfología como fragmentación de ADN, pérdida del potencial de membrana de la mitocondria y vacuolización del citoplasma, cambios que están mediados por el clivaje de sustratos de caspasas. En mamíferos existen dos principales vías de activación de la cascada apoptótica: la vía extrínseca en la cual se activa la caspasa-8 vía receptores transmembrana de TNF (factor de necrosis tumoral) de tipo I y la vía intrínseca que puede ser desencadenada por daño en el ADN o estrés celular [58]. Esto promueve la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria con la consecuente liberación de la proteína citocromo-c al citosol que promueve la formación del apoptosoma mediante la activación de Apaf1 y el reclutamiento de caspasa-9, complejo proteico que finalmente recluta y cliva a la procaspasa-3 activándola a caspasa-3 [49]. Por otro lado, se cree que la caspasa-3 cumple determinados roles no apoptóticos en procesos neurodegenerativos. La misma se encuentra implicada en el clivaje de proteínas específicas vinculadas a PD, HD, EA, generando fragmentos tóxicos que contribuyen de alguna manera al desarrollo patogénico de estas enfermedades [59-64].

El zimógeno de caspasa consiste en una subunidad larga y otra corta además de un prodominio N-terminal. Las caspasas iniciadoras tienen un prodominio más largo que las efectoras el cual contiene el dominio de reclutamiento de caspasa (CARDs, del inglés *caspase recruiting domain*). Cuando las caspasas efectoras son clivadas se separa la subunidad grande de la chica y el prodominio es removido. A diferencia de las efectoras, las caspasas iniciadoras no requieren del procesamiento proteolítico para consolidar su forma activa.

Todas las caspasas en su forma activa son heterotetrámeros formadas por dímeros conteniendo dos subunidades pequeñas (p12) y dos subunidades grandes (p17) (Figura 7a). Presentan dos sitios activos ubicados en la interfaz entre subunidades, los cuales consisten de una díada catalítica de Cys-His y un bolsillo extenso conformado por cuatro *loops* (L1-L4) en donde se encuentran los aminoácidos pertenecientes a los sitios S1-S4 capaces de acomodar los residuos en posición P1-P4 del sustrato en una posición extendida [31] (Figura 7b). Si bien tradicionalmente los sitios se han tratado como idénticos en nuestro grupo de investigación hemos encontrado que los mismos tienen un comportamiento bien diferente cuando están interaccionando con ligandos, tal es así que un mismo ligando que se une en ambos sitios activos altera la posición de los aminoácidos de alrededor y la conformación de los *loops* en donde se encuentran esos residuos de manera bien distinta [65]. La caspasa-3 y -7 tienen una identidad de secuencia alta (53% fíjate que puse el número de memoria), conservando residuos importantes incluyendo a la díada catalítica y aminoácidos pertenecientes a los sitios S1-S4 [66,67].



**Figura 7.** (a) Heterotetrámero de caspasa-3. Las subunidades grandes se muestran en verde y las pequeñas en lila. El inhibidor irreversible derivado del ácido nicotínico unido al sitio activo se muestra en bolas y varillas (código PDB: 1RHM). La interfase del dímero se indica con una línea punteada. (b) Representación esquemática de la notación utilizada en general para los sitios activos de proteasas. Adaptado de ref. [31]

En caspasa-3 los cuatro *loops* implicados en la catálisis de uno de los heterodímeros están conformados por: L1 (52-66), L2 (163-175), L3 (198-213) y L4 (247-263). L2 y L4 interaccionan con el *loop* L2' (176'-192') del otro heterodímero lo que estabiliza la conformación activa [68,69].

Se ha descrito que los *loops* juegan un rol importante en la activación de las caspasas. En la pro-caspasa L2 y L2' están covalentemente unidos en el mismo heterodímero, en el proceso de maduración se separan los dos *loops* mediante el clivado entre residuos de Asp y Ser. Este proceso separa los *loops* L2-L2' de la pro-enzima, lo que conlleva a un re-arreglo conformacional importante de los cuatro *loops* [70].

## 2.3 Mecanismo de reconocimiento y unión al sustrato

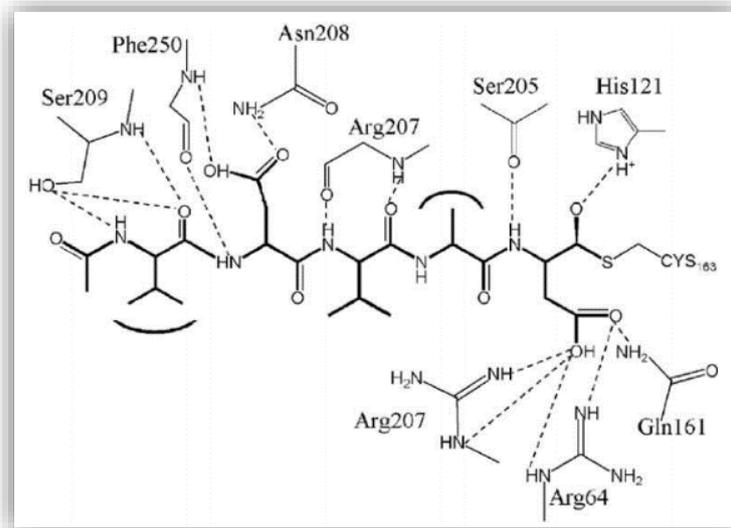
Las caspasas se dividen en tres grupos dependiendo de su similitud en la secuencia y el aminoácido de preferencia en P4 [71]. Las caspasas-1, -4 y -5 implicadas en el proceso de inflamación prefieren Trp o Leu en la posición P4, las caspasas efectoras -3, -6 y -7 prefieren un residuo polar en dicha posición más específicamente Asp, mientras que las caspasas iniciadoras -8, -9, -10 y prefieren Leu o Val en P4, es decir un residuo con características hidrofóbicas. El requerimiento de un residuo de Asp en posición P1 es absoluto e igual para todas dado que el sitio 1 es altamente específico. En P1' se ubica un aminoácido pequeño tal como Ala, Gly o Ser [72,73] en ocasiones la Ser se puede encontrar fosforilada [74-77]. La especificidad en posiciones P2 y P3 es variada, en general en P2 se prefieren aminoácidos hidrofóbicos y en P3 aminoácidos hidrofílicos [78].

Un hallazgo de hace unos años demostró que el reconocimiento molecular del sustrato es diferente entre las distintas caspasas. Esto es debido a la presencia de un sitio 5 (S5) descrito en caspasas -2, -3 y -7 que confiere a estas enzimas distinta afinidad por un mismo sustrato. Caspasa-2 no tiene preferencia de residuo en P5. El S5 en caspasa-3 es hidrofóbico a diferencia de caspasa-7, y por lo tanto residuos hidrofóbicos en esa posición favorecen la catálisis en caspasa-3 y no en caspasa-7. El S5 en caspasa-3 está compuesto por dos residuos aromáticos mientras que en caspasa-7 lo conforman dos residuos polares: Gln y Asp. Esto es interesante a tener en cuenta a la hora de diseñar inhibidores selectivos de caspasa-3 o -7 [56,78].

Con respecto a la secuencia de clivaje de los sustratos de caspasa -3 y -7 se ha visto en células Jurkat apoptóticas que el motivo de sitio de escisión canónica DEVD se encuentra en menos de 1% de los sitios de escisión de caspasa observados y el motivo más general DXXD sólo se encuentra en 22% de los sitios de escisión identificados. Lo anterior indica que la estructura primaria no es suficiente para el reconocimiento del sustrato, y que se estaría necesitando de un reconocimiento tridimensional por parte de las caspasas [73]. La mayoría de los cortes proteolíticos se dan en la zona de los *loops* [73,74] esto podría indicar que las caspasas requieren de un re-arreglo en su estructura para poder clivar al sustrato. Esto se correlaciona con ensayos experimentales que confirman que la barrera de energía para el despliegue local de los *loops* a estructuras extendidas es menor que para las demás regiones de la proteína [79,80]. Se piensa en la posibilidad de que las caspasas presenten un exosito el cual se define como un sitio de unión al sustrato lejano al sitio activo en la proteína [81]. Este puede contribuir significativamente en la energía de unión al sustrato. Lo que se relaciona con que las caspasas clivan más eficientemente proteínas de secuencia larga [82-84].

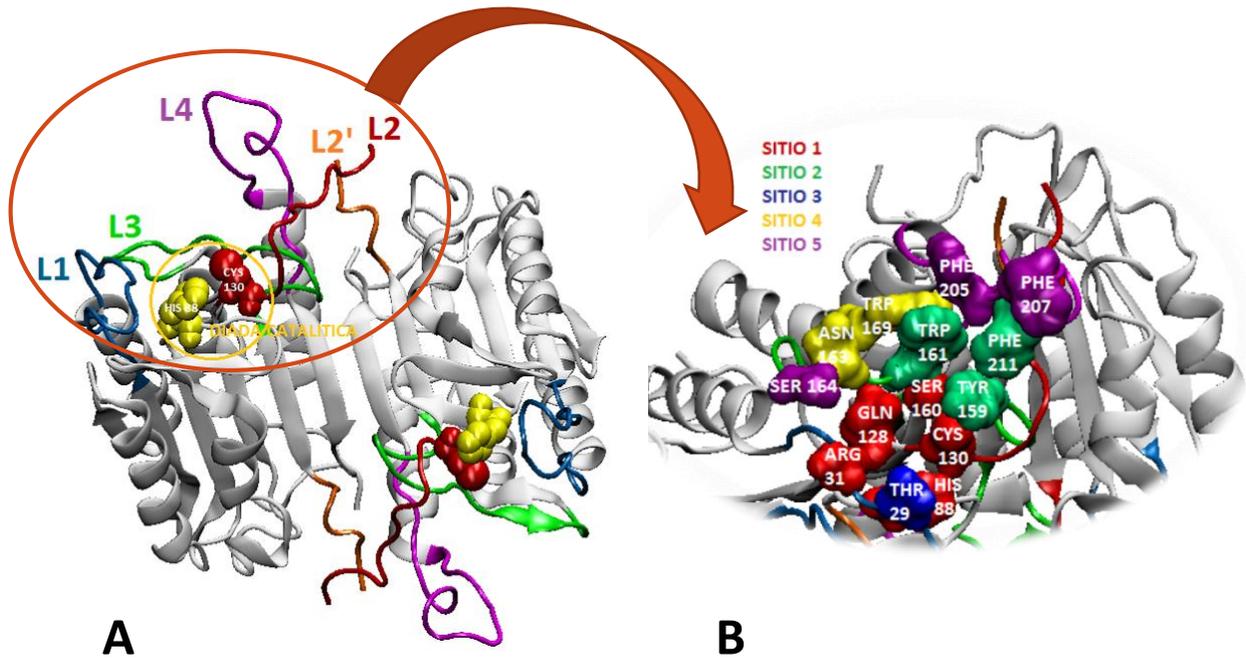
En el artículo donde establecen la importancia de S5 en el reconocimiento del sustrato en caspasa-3 generan un sustrato de secuencia Ac-VDVAD-pNA y lo comparan con Ac-DVAD-pNA observando que la eficiencia en la catálisis por parte de la caspasa-3 es mayor para el sustrato Ac-VDVAD-pNA que contiene una Val en P5, confirmando así la importancia del residuo hidrofóbico en P5 para la actividad catalítica [78]. El modo en el que interacciona Ac-VDVAD-pNA con la caspasa-3 se detalla a continuación: la cadena lateral del residuo de aspartato en P1 interacciona con Arg64 y Arg207 y forma enlace de hidrógeno con Gln161 del sitio 1.

Además, el nitrógeno amídico del esqueleto peptídico de aspartato interacciona con el oxígeno carbonílico del esqueleto peptídico de Ser205. En la posición P2, la cadena lateral hidrofóbica del residuo de Val interacciona con la Tyr204, Tyr206 y Phe256. En P3 el residuo de glutamato establece interacciones electrostáticas con Arg207 y a su vez este glutamato establece un enlace de hidrógeno mediado por agua con Thr62. El aspartato en posición P4 forma enlace de hidrógeno con Asn208 y Phe250. En P5 el nitrógeno amídico del esqueleto peptídico de valina interacciona con el hidroxilo de la Ser209, y el oxígeno carbonílico interacciona con el grupo hidroxilo de la cadena lateral y la amida de la cadena principal de la Ser209. Estos tres enlaces de hidrógeno estabilizan y posicionan a la cadena lateral en un bolsillo hidrofóbico formado por Phe250- Phe252 que conforman el S5 ubicado en el *loop* 4 [78] (Figura 8). Éste forma un surco de unión al sustrato conjunto con los *loops* 1, 2 y 3, el cual es capaz de acomodar una variedad de sustratos mediante un cambio conformacional en esta región de la enzima inducido por el propio *loop* 4.



**Figura 8.** Interacciones de la caspasa-3 con el inhibidor análogo de sustrato VDVA. El inhibidor está unido covalentemente a la Cys163 catalítica. Las líneas punteadas indican enlaces de hidrógeno y puentes salinos. Las curvas indican interacciones de van der Waals. Tomado de ref. [78].

Se sabe que tanto el *loop* 1 como el 4 son flexibles en condiciones fisiológicas y que esta flexibilidad contribuye a la unión con el sustrato [85-87]. El sitio 2 participa de forma importante en el reconocimiento del sustrato y la regulación de la actividad de la enzima [78] (Figura 9).



**Figura 9.** (A) Estructura de la caspasa-3. Se destaca la diada catalítica (en amarillo y rojo) y los distintos *loops* que conforman el bolsillo de unión al sustrato (L1-L4) y L2' del otro heterodímero en colores. (B) Aminoácidos de los sitios implicados en la catálisis pertenecientes a los distintos *loops* (cada color corresponde a un sitio en particular).

## 2.4 Sustrato, análogo de sustrato e inhibidores de caspasas

El uso de inhibidores de caspasa ha mostrado ser efectivo en modelos animales para el tratamiento de distintas enfermedades donde un aumento descontrolado en la actividad de una determinada caspasa conduce a condiciones patológicas. Algunos ejemplos incluyen: enfermedades renales y hepáticas asociadas a una apoptosis exacerbada [88,89], isquemia [90], enfermedades neurodegenerativas como Parkinson [91] y Enfermedad de Huntington [92], artritis reumatoide [93], osteoartritis [94] y asma [95]. Cabe destacar que la mayoría de estos estudios fueron realizados utilizando inhibidores peptídicos irreversibles de caspasas. Si bien los inhibidores irreversibles resultan, en general, más potentes que los inhibidores reversibles, los mismos presentan baja selectividad pudiendo en algunos casos inhibir otras proteasas celulares [96]. Debido al rol fundamental que juegan estas proteasas en el desarrollo normal de la célula el uso de inhibidores no selectivos podría ocasionar distintos efectos adversos *in vivo*. Un ejemplo de este tipo de inhibidores es el inhibidor peptídico Z-VAD-FMK (benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona) el cual demostró ser efectivo en un modelo de ratones transgénicos para la apoptosis pero resultó no ser selectivo para caspasa-3 y tener problemas de biodisponibilidad [97]. Posteriormente, se desarrolló el inhibidor Q-VD-OPh (quinolina-Val-Asp-(OMe)-[2,6-difluorofenoxi] metilcetona que presenta un valor de  $IC_{50}$  del orden  $\mu M$  demostró ser más potente y estable siendo más permeable a las células y menos tóxico en comparación con Z-VED-FMK, sin embargo este seguía siendo no selectivo [98,99]. Por otra parte, los inhibidores peptídicos tienen el problema adicional de ser inestables en plasma aunque distintas

estrategias para mejorar este aspecto han sido descritas [100]. Es por estos motivos que en los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo en el desarrollo de inhibidores no peptídicos y reversibles de distintas caspasas [101], incluyendo caspasa-3 [40,102-110].

Para el desarrollo de nuevas moléculas con potencial farmacológico se han venido realizando estudios *in silico* utilizando bibliotecas de compuestos con el fin de estudiar el mecanismo de acción de estos frente a caspasa-3 [40,104,110]. Un ejemplo de esto fue un trabajo en donde mediante un *screening* utilizando técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y estudios computacionales identificaron estructuras líderes de compuestos inhibidores reversibles de caspasas con valores de  $IC_{50}$  del orden  $\mu M$  [104]. También hay un artículo reciente en donde analizan una biblioteca de compuestos derivados de 1,2-benzisotiazol-3-ona *N*-acil-sustituidos como inhibidores de caspasa-3 y -7 mediante ensayos de inhibición en células Jurkat y métodos computacionales en donde vieron que las moléculas se unían al sitio catalítico de las caspasas interaccionando con aminoácidos de los sitios que participan en la unión del sustrato [110]. Además, este año salió publicado un trabajo en donde mediante estudios *in silico* hallaron moléculas no peptídicas inhibitoras de caspasa-3 que mimetizan la acción inhibitoria de los inhibidores peptídicos [40].

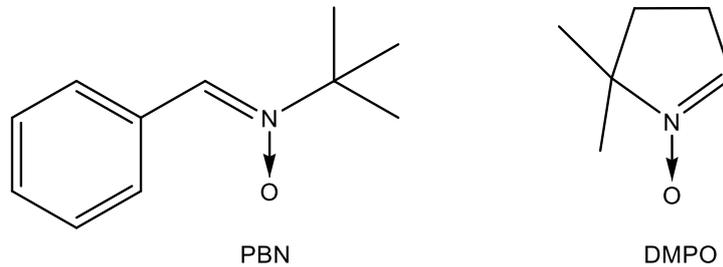
Si bien muchos de estos inhibidores muestran buena actividad *in vitro* frente a caspasa-3, en la mayoría de los casos no existen datos comparativos que den cuenta de su selectividad, o no hay información disponible sobre la citotoxicidad de los compuestos, o su actividad *in vivo*. Esto vuelve necesario encontrar inhibidores reversibles, selectivos y capaces de modular la actividad caspasa-3 en las células.

### 3. Nitronas como potenciales fármacos para el tratamiento de EA

#### 3.1 Estructura química y propiedades farmacológicas

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) son producidas de forma natural por el metabolismo del cuerpo humano [111,112]. Estas especies actúan como mediadores en varios procesos fisiológicos y en enfermedades neurodegenerativas [113-115]. Los mecanismos de oxidación en el cuerpo humano generan radicales del tipo hidroxilo ( $\cdot OH$ ), anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), óxido nítrico ( $\cdot ON$ ), peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) [116]. Las mismas son capaces de causar daño oxidativo en las células modificando lípidos, proteínas y ácidos nucleicos siendo el sistema nervioso central muy sensible a este tipo de daño debido a su elevado contenido de ácidos grasos fácilmente peroxidables, su elevado consumo de oxígeno y su bajo contenido de defensas antioxidantes [95,117]. Es por estos motivos que en los últimos años se ha trabajado intensamente en la búsqueda de moléculas capaces de contrarrestar el daño oxidativo observado en enfermedades neurodegenerativas [115-122]. Dentro de este grupo se destacan las nitronas con un excelente perfil farmacológico. Las mismas presentan propiedades neuroprotectoras sobre todo en procesos inflamatorios que parecen relacionarse con la supresión de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducida (iNOS), la acumulación de citoquinas y el proceso de apoptosis. Además, tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, lo cual es de suma importancia a la hora de asegurarnos de que el fármaco alcance su blanco terapéutico [115-117].

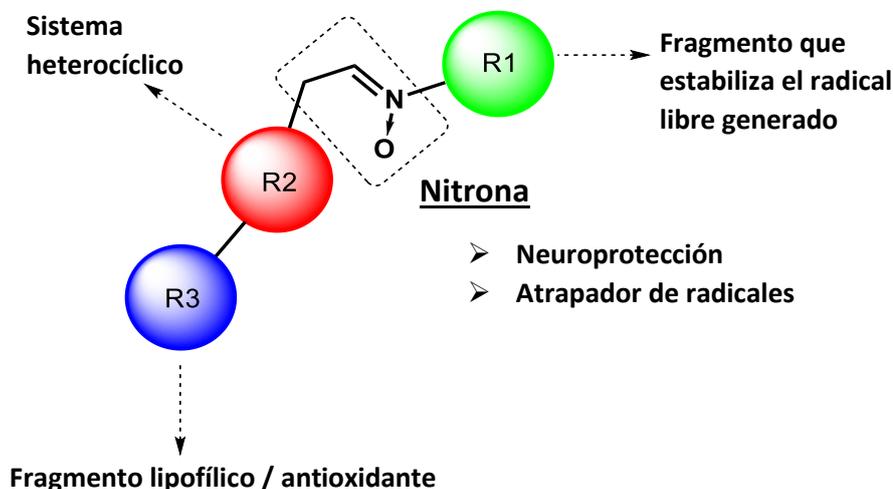
En la bibliografía las nitronas más utilizadas como agentes atrapadores de radicales libres son nitronas comerciales como ser el  $\alpha$ -fenil-*N-tert*-butilnitrona (PBN) y el *N*-óxido de 5,5-dimetil-pirrolina (DMPO) (Figura 10).



**Figura 10.** Estructura química de nitronas atrapadoras de radicales. A la izquierda nitrona lineal,  $\alpha$ -fenil-*N-tert*-butilnitrona (PBN). A la derecha nitrona cíclica, *N*-óxido de 5,5-dimetil-pirrolina (DMPO).

Interesantemente se ha visto que las nitronas PBN y DMPO son capaces de inhibir la apoptosis y la actividad caspasa-3 inducida por  $H_2O_2$  en células endoteliales de origen bovino (BAEC) [123]. El estrés oxidativo conduce al mal funcionamiento de la mitocondria y consiguiente liberación de citocromo-c, que es responsable de la activación de la enzima principal ejecutora en la apoptosis, la casapasa-3. Sin embargo, se encontró que muestras pre-tratadas con una concentración 50  $\mu M$  de PBN y posterior tratamiento con  $H_2O_2$  reducía la cantidad de células apoptóticas en aproximadamente un 90%. Con respecto a la actividad caspasa-3 la actividad se redujo en un 60% bajo las mismas condiciones. Los autores de este trabajo sugieren que las nitronas brindan protección a las células endoteliales frente al estrés oxidativo a través de la modulación de enzimas antioxidantes de fase II y posteriormente inhibiendo la cascada apoptótica dependiente de la mitocondria [123]. Cabe destacar que el mecanismo de acción por el cual estas moléculas son capaces de reducir la actividad de la enzima caspasa-3 permanece aún desconocido.

Otras moléculas presentando una estructura química con motivos comunes que se detallan en el Esquema 1 han sido sintetizadas y estudiadas como atrapadores de radicales libres [115-117]. Las mismas contienen la funcionalidad nitrona y distintos sustituyentes (Esquema 2) presentando una capacidad neuroprotectora mejorada respecto a PBN.



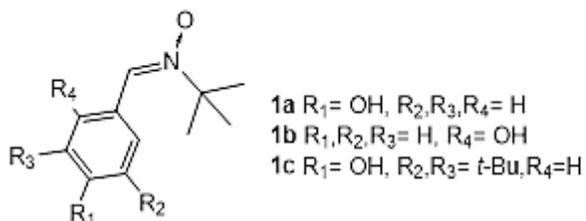
**Esquema 1.** Estructura común de heteroaril-nitronas. Adaptado de ref. [117].

En este tipo de moléculas el grupo *N*-óxido es el que les confiere la capacidad de atrapar radicales libres mientras que el sustituyente en R1, que en la mayoría de los compuestos es *tert*-butilo (siendo en algún caso ciclohexano o fenetilo) cumple el rol de estabilizar el radical generado. El sustituyente en R2 es un sistema heterocíclico que puede ser furano, furoxano, benzofuroxano o tiadiazol. Moléculas que contienen este tipo de heterociclos presentan actividad anti-microbiana, anti-parásita, inmunosupresora, anti-cancerígena, anti-inflamatoria vasodilatadora y evitan la agregación plaquetaria entre otras mediante la inhibición de biomoléculas implicadas en procesos fisiológicos [124,125]. Por último el sustituyente en R3 es una estructura lipofílica con propiedades antioxidantes en algunos casos como en los derivados fenólicos, que no presentan un sustituyente en R2 y en R3 tienen un benceno sustituido en distintas posiciones del anillo con grupos *tert*-butilo y/o hidroxilo. El PBN presenta la misma estructura que los derivados fenólicos con la diferencia de que este tiene en R3 un benceno no sustituido (ver Figura 10).

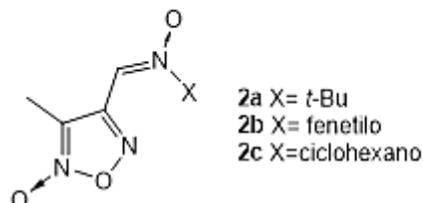
En un trabajo publicado en el 2012 el grupo de hidroxifenil nitronas (**1a-1c**) mostradas en el Esquema 2 fue evaluado en un modelo de células de neuroblastoma con el fin de determinar su capacidad antioxidante y neuroprotectora y en cultivos primarios de células neuronales como agentes anti-inflamatorios. Los resultados indicaron que el compuesto **1a** es el que tiene mayor capacidad antioxidante y el PBN presentó la menor capacidad antioxidante. Adicionalmente se observó que los compuestos **1a-1c** fueron capaces de evitar la nitración proteica y el agregado de la proteína alfa-sinucleína además de presentar una actividad anti-inflamatoria significativa y buena capacidad neuroprotectora [116].

Un estudio previo reveló que la nitrona **4c** (ver Esquema 2) tiene una excelente capacidad de atrapar radicales libres y buenos efectos neuroprotectores sin presentar citotoxicidad [115,117].

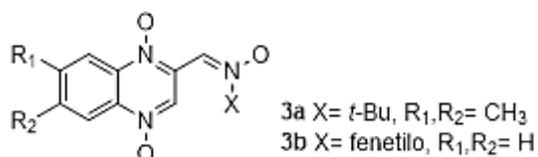
**Serie 1: Derivados fenólicos**



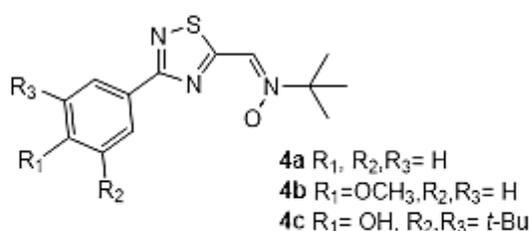
**Serie 2: Derivados de furoxano**



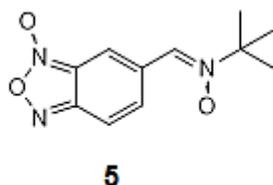
**Serie 3: Derivados de quinoxalina**



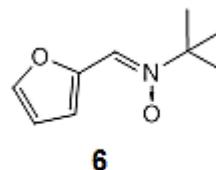
**Serie 4: Derivados de tiadiazol**



**Serie 5: Derivados de benzofuroxano**



**Serie 6: Derivados de furano**



**Esquema 2.** Estructura química de las  $\alpha$ -aril y heteroaril *N*-alquil o *N*-bencil-nitronas en estudio.

Algo interesante a resaltar es que la síntesis de estos compuestos es relativamente sencilla y los reactivos que se utilizan son de uso común. Lo cual no es un detalle menor a la hora de diseñar un fármaco.

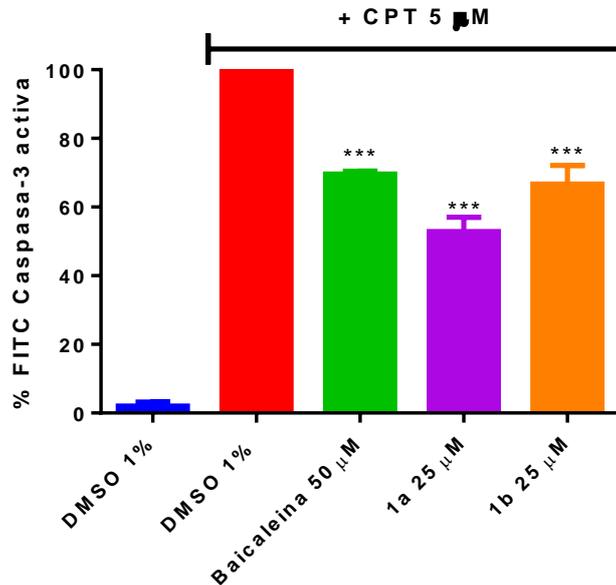
Todo esto, las hace especialmente útiles como candidatas a fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y aquellas relacionadas con el sistema nervioso central.

## 4. Antecedentes del grupo de investigación

### 4.1 Ensayos experimentales y modelado computacional

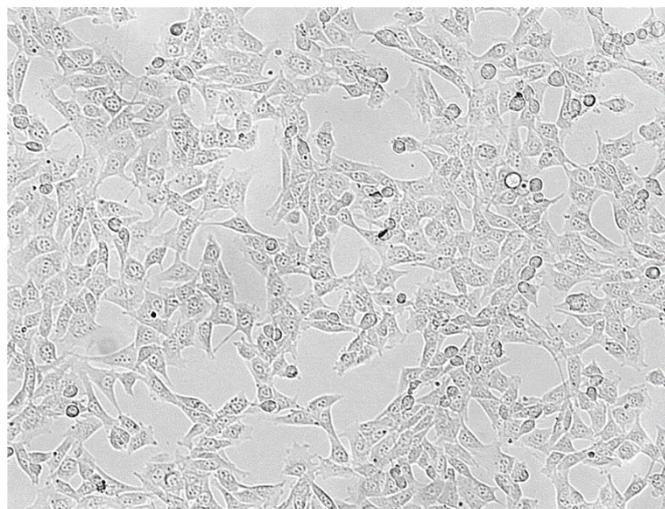
En nuestro equipo de investigación hemos estado trabajando en la investigación de los determinantes estructurales más relevantes para la inhibición selectiva de la enzima caspasa-3. Para esto se han realizado cálculos de *docking* y dinámica molecular de inhibidores existentes [126]. Estos resultados han derivado en el diseño racional de nuevas entidades químicas a ser sintetizada y ensayadas en el marco del trabajo de Tesis de Maestría de la Lic. Lucía Minini. Por otra parte, en colaboración con el Dr. Williams Porcal del Departamento de Química Orgánica-Facultad de Química se han ensayado hidroxifenil nitronas (compuestos **1a** y **1b**, Esquema 2)

capaces de inhibir la inducción de apoptosis mediada por caspasa-3 en células neuronales HT22 (Figura 11).



**Figura 11.** Capacidad de hidroxifenil nitronas de reducir la caspasa-3 activa inducida por camptotecina en la línea celular HT22.

La línea celular HT22 (Figura 12) es una sub-línea derivada de células HT4 que fueron originalmente immortalizadas de un cultivo primario de neuronas derivadas de hipocampo de ratón [127]. Las células HT22 no poseen receptores ionotrópicos de glutamato activos y no están sujetas a excitotoxicidad. Estas células proveen un modelo *in vitro* para estudiar condiciones que conllevan a la producción endógena de ROS como ser citotoxicidad a niveles elevados de glutamato y más recientemente se ha visto que las mismas presentan propiedades colinérgicas funcionales [128]. Es por estos motivos que son útiles para el estudio de enfermedades neurodegenerativas como la EA y la EP.



**Figura 12.** Línea celular derivada de hipocampo de ratón HT22.

## **II. Objetivo**

## Objetivo general

En base a los antecedentes mencionados en el presente proyecto se pretende ampliar el estudio en células neuronales HT22 a nuevas nitronas amablemente cedidas por el Dr. Williams Porcal (Esquema 2), así como también estudiar mediante métodos de docking y dinámica molecular el modo de unión a nivel atómico detallado de dichas nitronas frente a caspasa-3 activa.

Este trabajo tiene como objetivo principal ayudar a la búsqueda y el desarrollo de futuros fármacos para detener, prevenir y/o revertir la Enfermedad de Alzheimer mediante la modulación de la actividad de caspasa-3 en las células nerviosas. Para esto se llevarán a cabo ensayos *in vitro* e *in silico* que involucran distintas áreas del conocimiento siendo este un proyecto multidisciplinario en donde se evaluará el potencial farmacológico de una serie de (Z)- $\alpha$ -aril y heteroaril *N*-alquil-nitronas con la finalidad de encontrar las más efectivas para el objetivo propuesto.

## Objetivos específicos

1. Ensayos de citotoxicidad por MTT en la línea celular HT22.
2. Estudios de inhibición de apoptosis mediante anexina-V / IP en la línea celular HT22.
3. Estudio de inhibición de apoptosis mediante caspasa-3 activa en la línea celular HT22.
4. Modelado computacional de las nitronas a evaluar y obtención de los complejos ligando-proteína mediante *docking* molecular ligando-proteína.
5. Simulaciones de Dinámica molecular de caspasa-3 y de los complejos caspasa-3-nitronas obtenidos por *docking*.

### **III. Materiales y métodos**

Se numeran las actividades de acuerdo a los objetivos específicos detallados anteriormente.

### *1. Ensayos de citotoxicidad por MTT en la línea celular HT22*

Se realizaron ensayos de citotoxicidad por MTT-formazán [129] en la línea celular HT22 derivada de hipocampo de ratón de los compuestos con el fin de definir la máxima concentración no tóxica para realizar los ensayos posteriores.

Se partió de un cultivo de células HT22 en fase exponencial crecidas en medio de cultivo DMEM (Cat. No: 10569-010, Gibco), 10% SFB (Cat. No: A15-102, PAA), 1% de penicilina-estreptomycin (Cat. No: 15140-122, Gibco). Las células se levantaron con una solución de Tripsina-EDTA (Cat. No: 25300-054, Gibco) y luego del recuento celular, se realizó el sembrando de 100  $\mu$ L de una suspensión celular ( $5 \times 10^4$  células/mL) en una placa de 96 pocillos. y se incubó durante 24 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se adicionaron las nitronas disueltas en DMSO (< 1%) a distintas concentraciones (6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200  $\mu$ M) por triplicado. Como controles se incluyeron: células con medio de cultivo completo y medio de cultivo completo con 1% de DMSO. A continuación, la placa se incubó durante 24 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se adicionó 10  $\mu$ L de una solución de MTT (5 mg/mL) (Cat. No: M2128, Sigma Aldrich) en PBS estéril y se incubó durante 4 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. La solución de medio de cultivo-MTT se removió y se adicionó a una mezcla DMSO:isopropanol 1:1 para disolver los cristales de formazán. Por último se analizó el % de viabilidad mediante la medida de la absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro (Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Scientific) utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{absorbancia muestra} / \text{absorbancia control}) * 100$$

Cada compuesto se evaluó en tres ensayos independientes y los resultados se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00.

### *2. Estudios de inhibición apoptótica y determinación de caspasa-3 activa inducida por Camptotecina en la línea celular HT22*

Se sembraron las células HT22 ( $1.2 \times 10^5$  células/mL) en una placa de 12 pocillos en medio de cultivo DMEM, 10% SFB, 1% de penicilina-estreptomycin y se incubó durante 24 horas 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se pre-incubaron con las nitronas a una concentración 25  $\mu$ M (determinada a través del estudio de citotoxicidad) durante 2 horas. Como control positivo se utilizó Baicaleina (Cat. No: 465119, Sigma-Aldrich) [130] y como control negativo medio de cultivo con DMSO 1%. Posteriormente se realizó la inducción pro-apoptótica con Camptotecina (5  $\mu$ M) (Cat. No: C9911, Sigma) [131] y se incubó durante 15 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *2.1 Determinación de apoptosis mediante tinción con anexina V-FITC / IP*

Para llevar a cabo este ensayo las células HT22 ( $1-4 \times 10^5$ ) se levantaron de la placa con una solución de Tripsina-EDTA, se lavaron con PBS y se resuspendieron en buffer anexina (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, pH 7.4). Luego se adicionaron 2  $\mu$ L de AV-FITC [132] (Cat. No: 556419, BD Pharmingen). Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente protegido de la

luz. Las células se lavaron y resuspendieron con buffer anexina y previo a realizar la adquisición y el análisis se les agregó 2  $\mu\text{L}$  de IP a cada una de las muestras.

## 2.2 Cuantificación de caspasa-3 activa mediante detección con anticuerpo anti-caspasa-3-FITC

Para este ensayo se utilizó el kit de apoptosis FITC Active Caspase-3 (Cat. No: 550480, BD Pharmingen) que contiene un anticuerpo anti-caspasa-3 activa conjugado a FITC, una solución de fijación y permeabilización y otra solución de lavado. Las muestras fueron procesadas de acuerdo al protocolo del producto. De manera que se recolectaron las células y el medio de cultivo en tubos eppendorf y se realizaron varios lavados con PBS manteniendo los tubos en frío. Posteriormente, se adicionó la solución de fijación y permeabilización e incubó 20 minutos en frío. Las células se lavaron con la solución de lavado y se resuspendieron en la misma solución. Se adicionó 10  $\mu\text{L}$  del anticuerpo (FITC Rabbit Anti-Active Caspase-3) e incubó 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz (excepto a un control sin tinción). Las muestras se resuspendieron en la solución de lavado y se realizó la adquisición y el análisis.

En ambos ensayos la adquisición y el análisis de las muestras fue realizado en citómetro de flujo FACS Calibur con un láser de excitación de 488 nm colectando 10.000 eventos por muestra. Los parámetros de tamaño y granularidad celular se detectaron mediante el Forward Scatter y el Side Scatter (FS vs SS). Se analizaron los porcentajes de células apoptóticas. Para la comparación de los resultados, el porcentaje de células FITC positivas es normalizado contra el porcentaje de células FITC obtenidas con el control Camptotecina. El porcentaje de reducción apoptótica de las muestras en comparación con la Camptotecina se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ reducción apoptosis} = ((\text{PROMEDIO CPT} - \text{MUESTRA}) / (\text{PROMEDIO CPT} - \text{PROMEDIO DMSO})) * 100$$

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el test one-way Anova, seguido del test de multicomparaciones de Dunnet utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00.

## 3. Estudios computacionales

### 3.1 Optimización de las estructuras de las nitronas

A partir de los resultados experimentales se seleccionaron aquellas nitronas con mayor capacidad inhibitoria para estudiar el mecanismo de acción a nivel atómico detallado. En primer lugar las estructuras de las nitronas fueron optimizadas en solución utilizando el modelo continuo IEF-PCM [133] y métodos cuánticos a nivel DFT (*Density Functional Theory*), empleando el funcional híbrido  $\omega\text{B97XD}$  [134] y el conjunto de base 6-31+G\*\* [135]. Con el fin de comprobar la naturaleza de los puntos estacionarios hallados en el punto anterior se realizaron cálculos *single-point* de frecuencia al mismo nivel de cálculo, para determinar los modos normales de vibración y corroborar que todos los valores propios del Hessiano exacto fueran positivos. Los cálculos se llevaron a cabo con el paquete Gaussian 09 [136].

### 3.2 Docking molecular ligando-proteína

La predicción del modo de interacción de las nitronas con caspasa-3 se realizó mediante *docking* molecular. Para ello se empleó la estructura cristalográfica de caspasa-3 humana (código PDB: 1RHM) y la estructura tridimensional de las nitronas modeladas dejando flexible a las mismas y manteniendo rígida la proteína. Se utilizó una grilla centrada en la proteína de 126x126x126 Å con un espaciado de 0.5 Å a fin de cubrir toda la superficie proteica. Las conformaciones con una diferencia menor a 2.0 Å se agruparon en el mismo *cluster*. Para obtener los complejos ligando-proteína en cada caso se seleccionó la conformación con menor energía de unión correspondiente al *cluster* más poblado. Los cálculos se llevaron a cabo con el programa *Autodock 4.2* realizándose 50 corridas utilizando el algoritmo Genético Lamarckiano [137]. Con esto se obtuvieron los posibles lugares de unión de las nitronas a la enzima así como la energía libre de unión.

### 3.3 Simulaciones de dinámica molecular

Tomando como punto de partida los complejos obtenidos por docking y la caspasa-3 no ligada se realizaron minimizaciones y simulaciones de dinámica molecular clásica de 50 ns usando el programa Amber 12 [138]. Se utilizaron los campos de fuerza *ff03.r1* [139] y *gaff* para la proteína y el ligando, respectivamente. Para simular condiciones similares a las fisiológicas se agregaron contra iones para neutralizar la carga de la proteína y los complejos fueron solvatados en una caja octaédrica truncada de aguas TIP3P [140] extendiéndose 12 Å desde los bordes de la proteína en todas las direcciones. La minimización se realizó en dos pasos, primero se relajaron los contra-iones y las moléculas de agua utilizando 500 pasos de *steepest descent* y 1500 de gradiente conjugado. En segundo lugar se minimizó todo el sistema mediante 500 pasos de *steepest descent* y 1000 de gradiente conjugado. Para la dinámica molecular se realizó el calentamiento de 0 a 300 K durante 100 ps utilizando un *ensemble* NPT. Posteriormente, se corrieron simulaciones de dinámica productiva sin restricciones a presión y temperatura constantes durante 50 ns en un *ensemble* NVT utilizando el termostato de Langevin [141] y el baróstato de Berendsen [142] a presión y volumen constantes por 100 ps. Para restringir las distancias de enlace que involucran hidrógenos se empleó el algoritmo SHAKE [143]. Para el tratamiento de las interacciones electrostáticas no enlazantes se empleó un *cutoff* de 10 Å. Se utilizó un tamaño de paso de 2.0 fs. El análisis de los resultados se realizó mediante el módulo *cpptraj* incluido en el paquete *AmberTools 14*. Para la visualización de las trayectorias y la generación de imágenes se utilizó el programa VMD [144].

## **IV. Resultados y discusión**

## 1. Evaluación de citotoxicidad mediante ensayos con MTT

Inicialmente se comenzó el trabajo experimental evaluando la citotoxicidad de las nitronas mediante ensayos de citotoxicidad por MTT. Este ensayo requiere células viables metabólicamente activas que sean capaces de convertir el bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en el producto coloreado formazán a través de la reacción con NADH u otras moléculas reductoras. La cantidad de formazán generada, es directamente proporcional al número de células viables y puede ser medida en un espectrofotómetro mediante la lectura de la absorbancia a 570 nm. Cuando las células mueren, estas pierden la capacidad de convertir el MTT en formazán y por lo tanto la formación de color sirve como un marcador de las células viables.

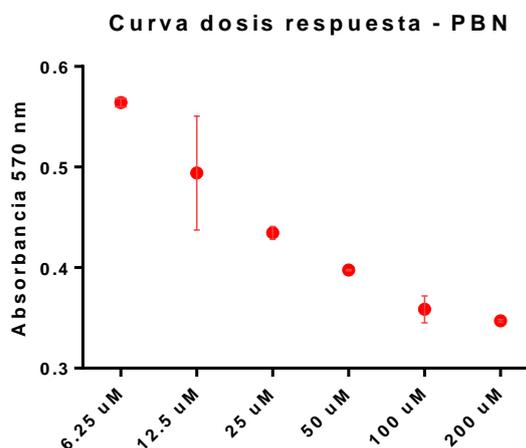
En este ensayo se evaluaron varios grupos de nitronas provenientes de distintos derivados con una variedad de sustituyentes. Entre ellos se encuentran el PBN y sus derivados fenólicos, derivados de furoxano, furano, benzofuroxano, tiadiazol y quinoxalina, siendo en total un número de 15 nitronas a evaluar.

Este ensayo se realizó a concentraciones crecientes de los distintos derivados nitrona con el fin de determinar la concentración de trabajo para los siguientes experimentos a realizar.

Los resultados obtenidos se muestran resumidos a continuación:

**Tabla 1.** Porcentaje de células viables de muestras incubadas con concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$  de las nitronas.

COMPUESTO	% VIABILIDAD	
	25 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$
PBN	91.5	77.3
1a	100.0	84.1
1b	100.0	93.8
1c	100.0	55.7
2a	100.0	66.2
2b	100.0	82.8
2c	100.0	54.2
3a	100.0	100.0
3b	100.0	57.9
4a	100.0	98.4
4b	100.0	93.4
4c	100.0	100.0
4d	100.0	100.0
5	100.0	59.7
6	100.0	100.0



**Gráfico 1.** Curva de dosis – respuesta del compuesto PBN en la línea celular HT22. Resultados expresados como el promedio  $\pm$  SD.

Los valores de la Tabla 1 nos indican que ninguno de los compuestos es citotóxico a una concentración 25  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, a una concentración 200  $\mu\text{M}$  varios de ellos aparentan tener

una citotoxicidad de leve a moderada ya que en algunos casos disminuyen el porcentaje de células viables a la mitad. A modo de ejemplo se muestra la curva dosis-respuesta para el PBN (Gráfico 1). Observando el gráfico podemos apreciar la curva dosis-respuesta del PBN en el que la absorbancia de la muestra y por ende el porcentaje de células viables va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de PBN en la muestra.

A partir de estos resultados se decidió trabajar en los siguientes ensayos experimentales a una concentración 25  $\mu\text{M}$  de nitronas.

## *2. Puesta a punto para la detección de apoptosis por anexina V-FITC / IP*

Con el fin de optimizar las condiciones para el ensayo de detección de células apoptóticas se procedió a utilizar diferentes inductores de apoptosis, concentraciones de Camptotecina (CPT) y tiempos de incubación. Como inductores de apoptosis se probó Estaurosporina (STP), un potente inhibidor de quinasas y activador de caspasas [145] y CPT, inhibidor de Topoisomerasa I que se sabe que induce daño en el ADN y apoptosis vía p53 y ciclinas dependientes de quinasas [146]. También se ensayaron condiciones de hambre de las células, es decir, se las privo de alimento por diferentes periodos de tiempo utilizando medio de cultivo DMEM sin suero o PBS solo. Como control positivo para los ensayos con STP y CPT se utilizó la Baicaleina (BCL) un flavonoide citoprotector, anti-inflamatorio, atrapador de radicales y anti-oxidante [130].

Tanto la STP como la BCL se utilizaron disueltas en DMSO. Es por esto que el control negativo para los ensayos con STP y CPT fue medio completo DMEM más DMSO  $\leq 1\%$  a distintos tiempos de incubación. En cambio, para los ensayos de hambre el control negativo fue medio DMEM completo únicamente.

El marcado de las células se realizó mediante el uso de anexina V-FITC y ioduro de propidio (IP). El IP es ampliamente utilizado en conjunto con la anexina V para determinar si las células son viables, se encuentran en apoptosis temprana, tardía o si están en proceso de necrosis a través de diferencias en la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática.

El análisis de apoptosis mediante tinción con anexina V-FITC (AV) consiste en que las células que ingresan en apoptosis exponen tempranamente en la cara externa de la membrana plasmática el fosfolípido fosfatidilserina (PS) que, en condiciones normales, se encuentra en la cara interna de la misma. La AV es una proteína que se une a fosfolípidos en presencia del ión  $\text{Ca}^{2+}$  presentando una elevada afinidad por la PS. Al usarse habitualmente acoplada a FITC, sirve como una prueba sensible para el análisis mediante citometría de flujo de aquellas poblaciones celulares que han iniciado el proceso de apoptosis. Por otro lado, la capacidad de IP para entrar en una célula depende de la permeabilidad de la membrana; IP no entra en células viables o apoptóticas tempranas debido a la presencia de una membrana plasmática intacta. En las células apoptóticas tardías y necróticas, la integridad de la membrana plasmática y nuclear disminuye lo que permite pasar al IP a través de las membranas, intercalarse en los ácidos nucleicos, y luego en el análisis por citometría lo detectamos en la pantalla de color rojo fluorescente.

Los resultados de esta puesta a punto del método se muestran a continuación:

**Tabla 2.** Detección de apoptosis inducida por STP y CPT variando las condiciones de trabajo en la línea celular HT22 marcada con anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP).

Fenotipo // Condición	Viables IP - // AV -	Necrosis IP + // AV-	Apoptosis tardía IP + // AV +	Apoptosis Temprana IP - // AV +	Apoptosis total	Promedio apoptosis
DMSO 1% 15 hs	93,7	3,9	1,6	0,8	2,4	
STP (0.5µM) 15 hs	73,6	7,3	18,1	1	19,1	
CPT (5µM) 15 hs	74,2	8,3	11,9	5,6	17,5	17,6
	74,9	7,5	11,7	5,9	17,6	
CPT (5µM) 4 hs	85,5	7,7	3,6	3,2	6,8	9,1
	87,2	1,5	2,6	8,7	11,3	
CPT (10µM) 12 hs	79,5	3,5	13,3	3,8	17,1	16,5
	79,2	5	11,3	4,6	15,9	
CPT (10µM) 6 hs	85,9	2,8	7	4,4	11,4	14,9
	66,7	14,8	13,2	5,2	18,4	
CPT (15µM) 6 hs	79	3,2	14,1	3,6	17,7	19,2
	75,7	3,8	15,4	5,2	20,6	
CPT (30µM) 6 hs	74,4	20,9	2,4	2,3	4,7	5,3
	80,8	13,4	2,8	3	5,8	
CPT (30µM) 4 hs	90,2	1,5	2,1	6,2	8,3	7
	68,6	27,4	2,9	1,1	4	
	84,3	7	4,9	3,9	8,8	
CPT (50µM) 6 hs	76,5	17,3	3,7	2,6	6,3	5,8
	60	34,8	3,5	1,8	5,3	
CPT (100µM) 6 hs	69,7	20,9	6,6	2,8	9,4	7,8
	84,1	9,7	4,3	1,9	6,2	

Si bien se observa que tanto el uso de CPT y STP como la privación de alimento son efectivos para la inducción de apoptosis en las células.

Comparando los valores de apoptosis promedio para el caso de DMEM sin suero ya sea 24 o 12 hs de incubación, STP y CPT 5 µM, 15 horas vemos que los valores son prácticamente iguales (Tabla 2). Observando los distintos ensayos con CPT se puede concluir que el aumento de la concentración de CPT no afecta de forma significativa los valores de apoptosis, de hecho hay un mayor porcentaje de células apoptóticas a concentraciones bajas y tiempos largos de incubación que visceversa.

**Tabla 3.** Detección de apoptosis por hambre variando las condiciones de trabajo en la línea celular HT22 marcada con anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP).

Fenotipo // Condición	Viables IP - // AV -	Necrosis IP + // AV -	Apoptosis tardía IP + // AV +	Apoptosis Temprana IP - // AV +	Apoptosis total	Promedio apoptosis
<b>DMEM completo 24 hs</b>	81	11	4,1	3,9	<b>8</b>	<b>7,5</b>
	90,6	2,4	1,8	5,2	<b>7</b>	
<b>DMEM s/suero 24 hs</b>	72,3	8,7	14,8	4,2	<b>19</b>	<b>18,6</b>
	75,9	5,9	12,4	5,8	<b>18,2</b>	
<b>DMEM s/suero 12 hs</b>	82,6	2,3	10,5	4,6	<b>15,1</b>	<b>17</b>
	77,6	3,6	14,1	4,7	<b>18,8</b>	
<b>PBS 2 hs (s/lavado)</b>	93	2,4	2,2	2,4	<b>4,6</b>	<b>7,8</b>
	84,2	4,7	7,2	3,8	<b>11</b>	
<b>PBS 4 hs (s/lavado)</b>	87,6	2,3	4,7	5,4	<b>10,1</b>	<b>9,7</b>
	85	5,7	5,1	4,2	<b>9,3</b>	
<b>PBS 4 hs</b>	87,7	1,4	3,1	7,8	<b>10,9</b>	<b>8,8</b>
	86,3	5,2	7,5	1	<b>8,5</b>	
	85,2	8	5,8	1,1	<b>6,9</b>	
<b>PBS 5 hs</b>	81,4	8,3	7,4	2,9	<b>10,3</b>	<b>9,4</b>
	84,9	8,4	4,5	2,2	<b>6,7</b>	
	82,7	6,2	7,1	4	<b>11,1</b>	
<b>PBS 6 hs</b>	18	40	41	1	<b>42</b>	<b>51,5</b>
	23,4	15,8	57,7	3,2	<b>60,9</b>	
<b>PBS 6 hs</b>	86,3	2,5	7,3	3,8	<b>11,1</b>	<b>23</b>
	59,7	5,5	15,4	19,4	<b>34,8</b>	

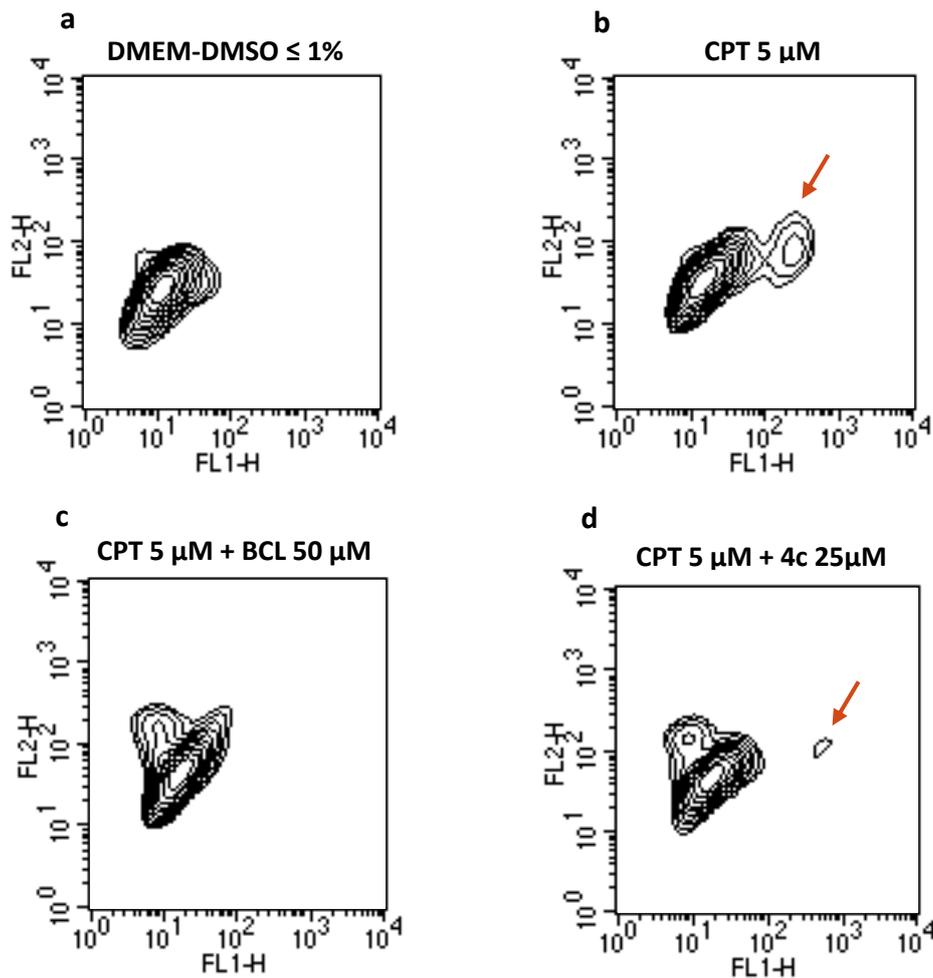
A priori podríamos afirmar que la condición PBS 6 hs (Tabla 3) resultó ser la más efectiva. Sin embargo, cuando se intentó reproducir estos valores no se lo logró. En cierta forma esto se ve reflejado en los dos ensayos independientes de inducción con PBS por incubación de 6 hs en donde uno de los ensayos dió el doble de apoptosis que el otro lo cual no es deseable que suceda. Por este motivo fue que se descartó la posibilidad de usar PBS para la inducción.

Es por estos motivos y debido a resultados previos de nuestro grupo donde se realizaron ensayos de detección de caspasa-3 utilizando CPT como inductor de apoptosis (resultados no publicados), se decidió trabajar con la condición CPT, 5  $\mu$ M, 15 horas, para nuestros ensayos con anexina V-FITC con el fin de determinar los valores de apoptosis en las muestras como una primera aproximación para posteriormente realizar los ensayos de detección de caspasa-3 activa bajo las mismas condiciones.

### 3. Ensayos de detección de apoptosis en células HT22 por anexina V-FITC / IP

En primer lugar, se realizó un *screening* general de las nitronas para determinar la capacidad de las mismas de inhibir la apoptosis inducida por CPT en la línea celular neuronal HT22 utilizando BCL como control positivo. Las muestras fueron marcadas con anexina-V-FITC / IP y analizadas mediante citometría de flujo.

A modo de ejemplo se muestran los gráficos obtenidos para el ensayo de apoptosis en el que se evaluó el compuesto **4c**.

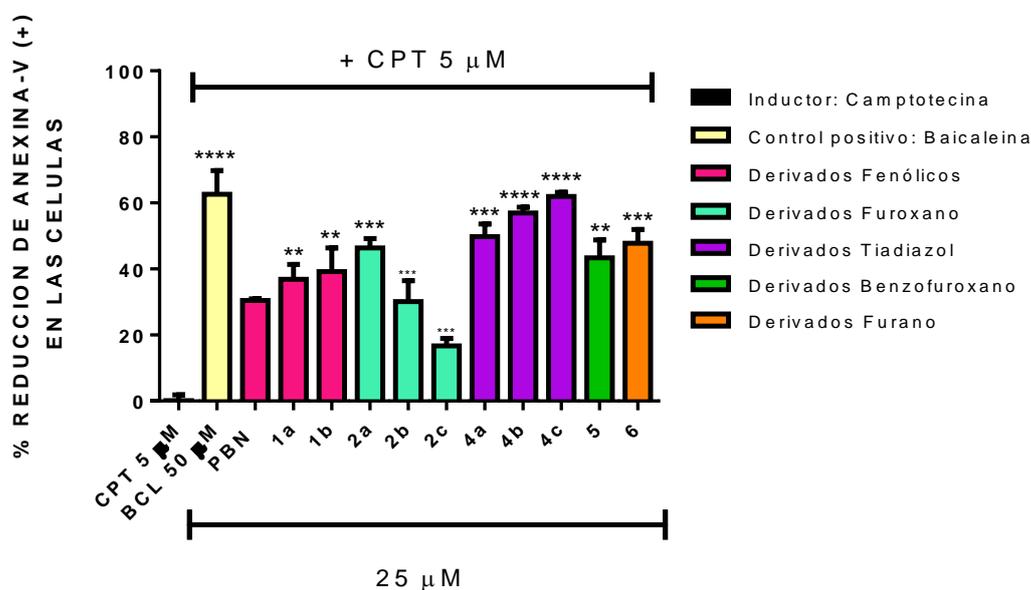


**Gráfico 2.** Fluorescencia de células marcadas con anexina V-FITC / IP. En 10<sup>2</sup> de FL2 vemos la marca con IP y en 10<sup>2</sup> de FL1 la de anexina V. Densidad de poblaciones de células viables, apoptóticas y necróticas para el control negativo (a), el inductor CPT (b), el control positivo con BCL (c) y el inductor más el compuesto **4c** (d).

Observando estos gráficos se pueden distinguir 3 poblaciones de células, las viables que representan a la mayoría, las necróticas marcadas con IP en la zona arriba a la izquierda y las apoptóticas marcadas con IP y anexina V marcada con una flecha arriba a la derecha en los gráficos.

Como se puede apreciar en el Gráfico 2, el pre-tratamiento con el compuesto **4c** reduce notoriamente el nivel de células en estado apoptótico (**d**) en comparación con las tratadas solamente con el inductor CPT (**b**).

Los resultados obtenidos para todas las muestras se especifican en el siguiente gráfico, observándose un perfil variado en cuanto a la actividad anti-apoptótica de estos compuestos.



**Gráfico 3. Efecto de nitronas en la inhibición de apoptosis inducida por Camptotecina (CPT) en la línea celular HT22 marcada con anexina V-FITC.** Resultados normalizados contra CPT y expresados como el promedio  $\pm$  SEM de un ensayo por triplicado, \* $p \leq 0.1$  \*\* $p \leq 0.01$  \*\*\* $p \leq 0.001$  \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  one-way Anova seguido por el test de multicomparaciones de Dunnet respecto a CPT.

Observando el Gráfico 2 se puede apreciar que los compuestos inhiben la apoptosis de manera estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que en general las nitronas son capaces de inhibir la apoptosis celular en menor o mayor medida.

Mediante el análisis de las distintas nitronas evaluadas se evidencia que los derivados fenólicos, de furano y benzofuroxano presentan un buen potencial de reducción apoptótica. Por otro lado, los derivados de furoxano inhiben la apoptosis de forma más débil. Sin lugar a dudas los derivados de tiadiazol resultaron ser los más efectivos presentando porcentajes de reducción de apoptosis similares a los del control (BCL).

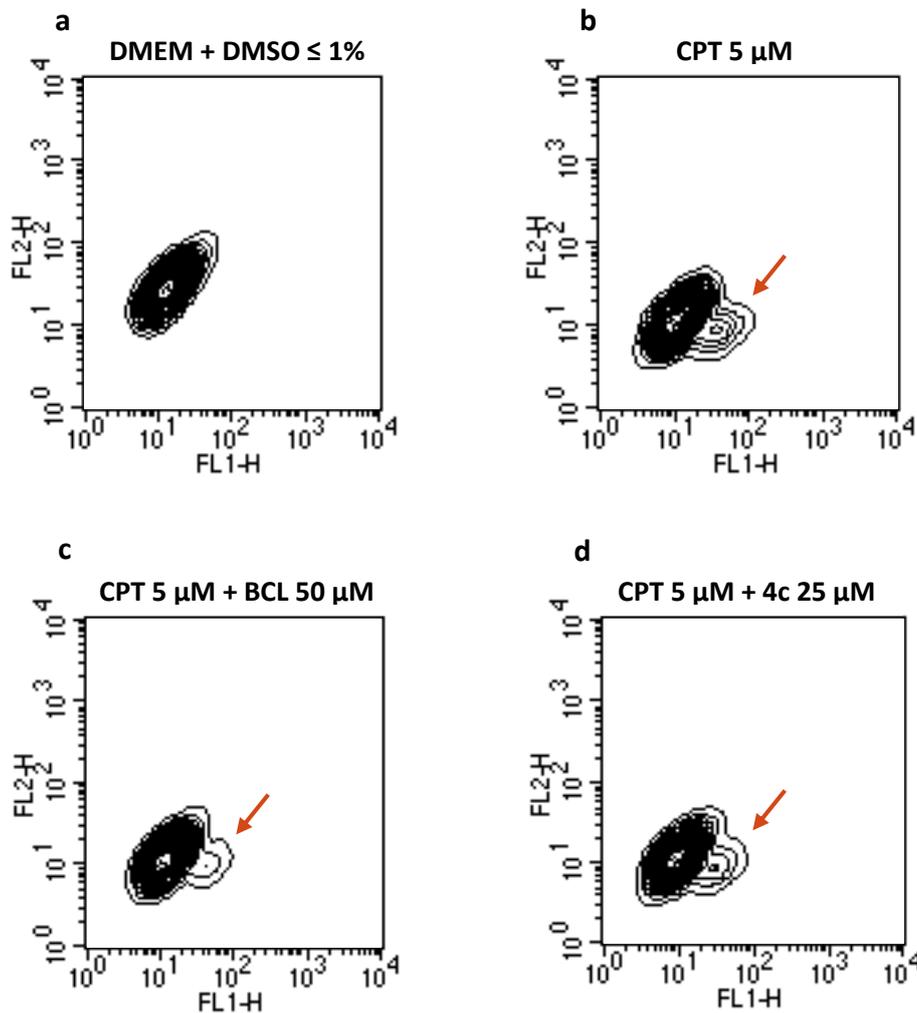
En cuanto a la estructura química de las nitronas (ver Esquemas **1** y **2**), los resultados sugieren que el heterociclo en R2 ayuda a incrementar la capacidad antiapoptótica de las nitronas pero no es determinante para la actividad. El sustituyente en R3 aparentemente tampoco lo es, ya que compuestos que no presentan R3 como las nitronas **5** y **6** son tanto o más efectivos que nitronas sustituidas en posición R3. Sin embargo, las nitronas derivadas de tiadiazol que son las que presentan la mejor actividad antiapoptótica, son dentro de las nitronas evaluadas los más voluminosos ya que presentan en R3 un fragmento lipofílico antioxidante (anillo de benceno con sustituyentes) que podría estar contribuyendo a la disminución de la apoptosis en las células.

Una característica a destacar que es común a los compuestos con mejor actividad es que tienen un grupo *tert*-butilo unido al *N*-óxido de la funcionalidad nitrona.

#### 4. Ensayos de detección de caspasa-3 activa en células HT22

A continuación del ensayo de detección de apoptosis por anexina, algunos de los compuestos que presentaron una mayor actividad anti-apoptótica fueron seleccionados para evaluar si su actividad podría estar relacionada con la capacidad de los mismos de disminuir la actividad caspasa-3 en la célula.

A modo de ejemplo se muestran los gráficos obtenidos para el ensayo de detección de caspasa-3 en el que se evaluó el compuesto **4c**.

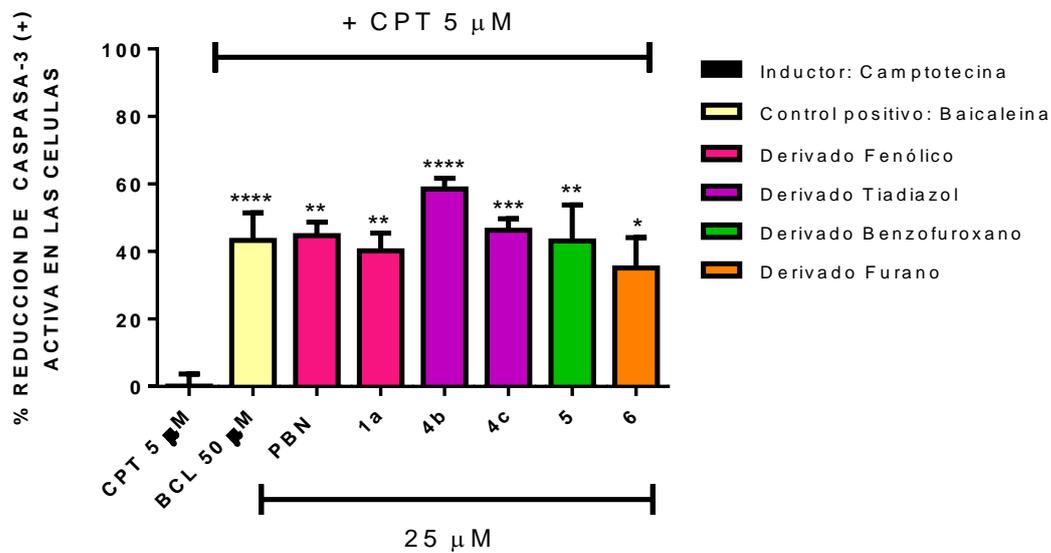


**Gráfico 4.** Fluorescencia de células marcadas con anticuerpo anti-caspasa-3 activa-FITC. En  $10^2$  de FL1 marca del anticuerpo conjugado a FITC. Densidad de poblaciones de células viables y apoptóticas con caspasa-3 activa. Se muestra el control negativo (a), el inductor CPT (b), el control positivo con BCL (c) y el inductor más el compuesto **4c** (d).

Observando estos gráficos se pueden distinguir dos poblaciones de células, las viables que representan a la mayoría y las apoptóticas que presentan caspasa-3 activa marcada por el anticuerpo.

La población de células que resultaron positivas para caspasa-3 activa es máxima en las células tratadas con CPT (b), disminuye ampliamente con el pre tratamiento con BCL (c) como con el compuesto 4c (d).

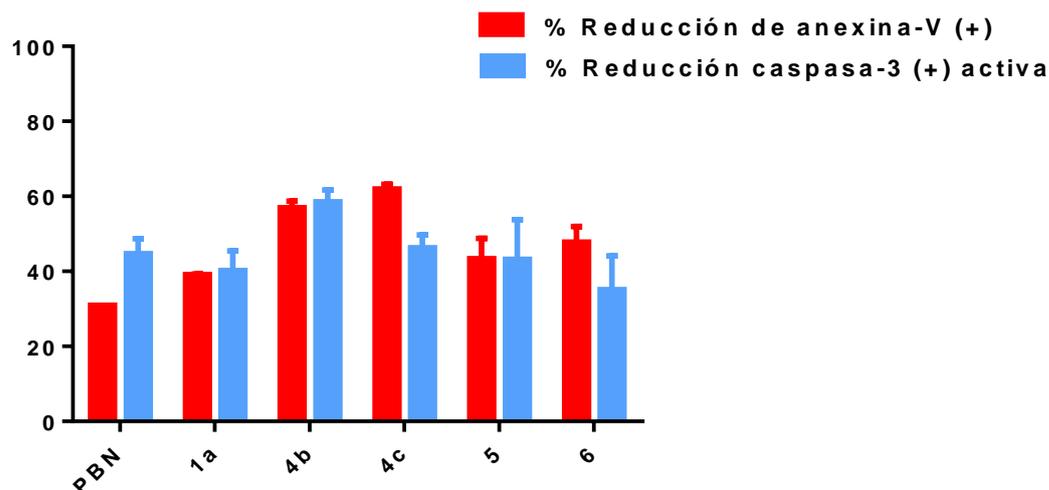
Los resultados obtenidos para todas las muestras se detallan en el siguiente gráfico, observándose un perfil variado en cuanto a la capacidad de estos compuestos de reducir la caspasa-3 activa en las células.



**Gráfico 5. Efecto de nitronas en los niveles de caspasa-3 activa inducida por Camptotecina y marcada con anticuerpo anti-caspasa-3-FITC en la línea celular HT22.** Resultados normalizados contra CPT y expresados como el promedio  $\pm$  SEM de un ensayo por triplicado, \* $p \leq 0.1$  \*\* $p \leq 0.01$  \*\*\* $p \leq 0.001$  \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  test one-way Anova seguido por el test de multicomparaciones de Dunnet respecto a CPT.

Los resultados obtenidos a partir de este gráfico demuestran que las nitronas seleccionadas efectivamente son capaces de reducir el porcentaje de caspasa-3 activa en las células, lo que estaría sugiriendo que las mismas son capaces de inhibir a la caspasa-3 o a la activación de la pro-caspasa-3 por algún mecanismo dentro de la célula.

En el siguiente gráfico se aprecia la correlación entre el porcentaje de reducción de apoptosis en los ensayos con anexina-V y el porcentaje de reducción de caspasa-3 activa en las células.



**Gráfico 6. Efecto de las nitronas en la inhibición de apoptosis y en los niveles de caspasa-3 activa inducidos por Camptotecina en la línea celular HT22.** Los resultados fueron normalizados contra CPT y están expresados como el promedio  $\pm$  SEM de un ensayo por triplicado.

Observando el gráfico podemos concluir que los compuestos que fueron evaluados en ambos ensayos muestran una excelente correlación entre la inhibición de apoptosis y el porcentaje de reducción de caspasa-3 activa. Estos resultados confirman que estas nitronas estarían inhibiendo la apoptosis mediante un mecanismo que involucra la disminución de caspasa-3 activa en las células. Para que esto ocurra podrían pasar dos cosas, la primer posible hipótesis que manejamos se basa en pensar que las nitronas podrían estar inhibiendo a la pro-caspasa-3 ya sea uniéndose a ella o mediante algún otro mecanismo en la célula y de esta manera impidan su activación. La segunda hipótesis se basa en que las nitronas sean capaces de interactuar con caspasa-3 activa alterando su conformación y así poder impedir que la misma sea reconocida por el anticuerpo.

También podría pensarse que se debe a la capacidad de atrapar radicales libres de estos compuestos, lo que estaría impidiendo la activación de la cascada apoptótica en la mitocondria y la subsecuente activación de la caspasa-3. Es posible que en la célula se lleven a cabo más de uno de estos mecanismos propuestos.

## 5. Dinámica molecular

En base a los resultados obtenidos se decidió realizar estudios computacionales de tres compuestos (**1a**, **1b** y **4c**) con buen perfil anti-apoptótico y un buen efecto en la reducción de caspasa-3 activa a fin de poder evaluar la segunda hipótesis, dado que disponemos de la estructura cristalográfica de caspasa-3 mientras que la estructura del zimógeno no está disponible en forma completa en el Protein Data Bank. Para esto se optimizaron las estructuras de las nitronas, se realizaron estudios de *docking* con el propósito de evaluar los posibles sitios de interacción de las nitronas con la caspasa-3 y a los complejos obtenidos por *docking* se les realizó dinámica molecular (MD) para analizar más en detalle el modo de unión de las nitronas a la caspasa-3.

Estos estudios permitieron refinar los complejos ligando-proteína utilizando condiciones que se asemejan más a las fisiológicas. Además, se obtuvo información sobre la manera en que el ligando afecta la dinámica general de la proteína pudiendo predecir el mecanismo de inhibición y requerimientos estructurales necesarios a fin de mejorar la actividad de los compuestos.

Una vez realizado el estudio de *docking* se analizaron los distintos *clusters* obtenidos observándose que la mayoría de ellos ubican a las nitronas en la región de uno de los dos sitios activos de manera indistinta por lo que se decidió seleccionar dos *clusters* representativos por complejo, es decir los que tuvieran mayor número de conformaciones del ligando en un mismo sitio de la proteína y la menor energía de unión del ligando a la proteína (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resultados de variación en la energía libre de unión y conformaciones de los *clusters* seleccionados.

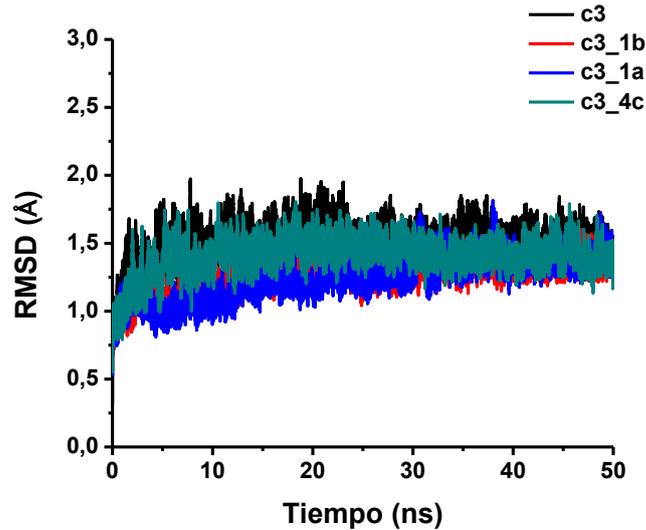
<i>Compuesto</i>	<i>Cluster</i>	<i>Nº conf.</i>	$\Delta G$ unión (Kcal/mol)	% inh. <i>apoptosis</i>	% red. <i>caspasa-3</i>
<b>1a</b>	2	5	-5.10	37	40
	5	7	-5.13		
<b>1b</b>	1	6	-5.60	39	-
	9	5	-4.40		
<b>4c</b>	2	7	-7.14	62	46
	6	6	-6.03		

Estos resultados nos muestran que no hay una diferencia notoria entre el número de conformaciones y la energía libre de unión para uno y otro de los sitios de cada una de las nitronas. Sin embargo, se puede apreciar que el compuesto **4c** es el que menor energía libre de unión presenta lo que se condice con que sea el más efectivo en la inhibición de apoptosis y reducción de caspasa-3 activa. En base a estos resultados, como punto de partida para realizar simulaciones de dinámica molecular (50 ns) se utilizaron complejos conteniendo dos moléculas de nitrona unidas en la región de ambos sitios activos.

A fin de comparar los efectos causados en la enzima por la unión del ligando se realizaron simulaciones en la mismas condiciones para la apo-enzima.

Una vez finalizadas las dinámicas de los complejos y de la apo-enzima se procedió a realizar un análisis de *cluster*, en donde se agrupan

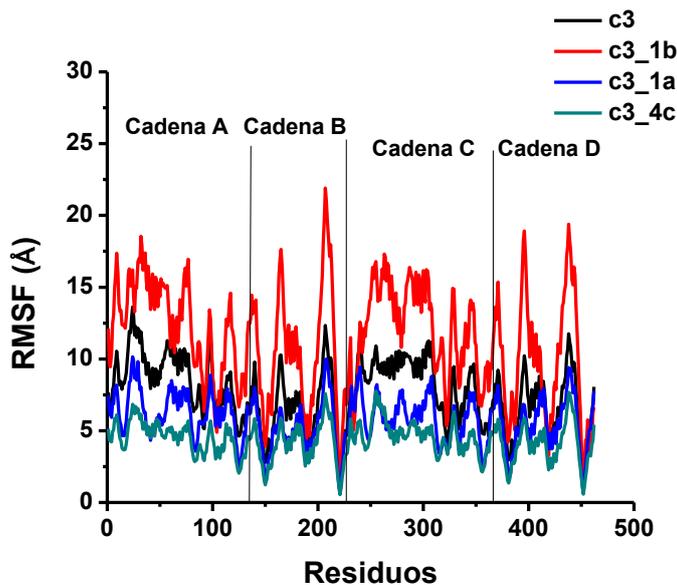
Con el propósito de asegurarnos que la dinámica había convergido a ese tiempo de simulación y evaluar la estabilidad de los complejos se realizó el RMSD (del Inglés *root-mean-square deviation*) de cada uno de ellos (Gráfico 7).



**Gráfico 7.** RMSD de los Cα de la caspasa-3 sola y de la caspasa-3 unida a la nitrona 1a, 1b y 4c a lo largo de 50 ns de simulación de dinámica molecular.

Como se puede apreciar observando el gráfico el movimiento de los Cα del esqueleto aminoacídico a lo largo de la simulación es mínimo, por lo que podemos decir que a partir de los 5-10 ns de simulación la dinámica está convergida y la caspasa-3 y los complejos se encuentran estabilizados.

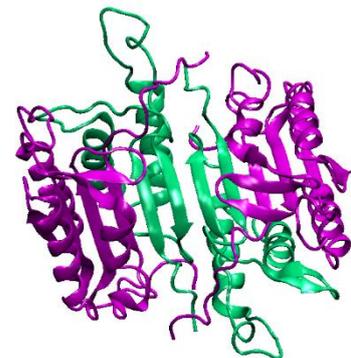
Una forma de estudiar la fluctuación de cada residuo en la proteína y los complejos a lo largo de la simulación es haciendo un gráfico de RMSF (del Inglés *root-mean-square fluctuation*) en donde vemos cómo cambia la posición de cada residuo de la proteína con respecto a una estructura de referencia en nuestro caso una estructura representativa obtenida a partir de un análisis de *cluster* de la trayectoria (Tabla 5), es decir la estructura que predomina a lo largo de la dinámica (Gráfico 8).



**Gráfico 8.** RMSF de los Cα de la caspasa-3 (c3) sola y de la caspasa-3 unida a la nitrona 1a, 1b y 4c.

**Tabla 5.** Porcentajes de los clusters más representativos para cada uno de los complejos y la apo-enzima.

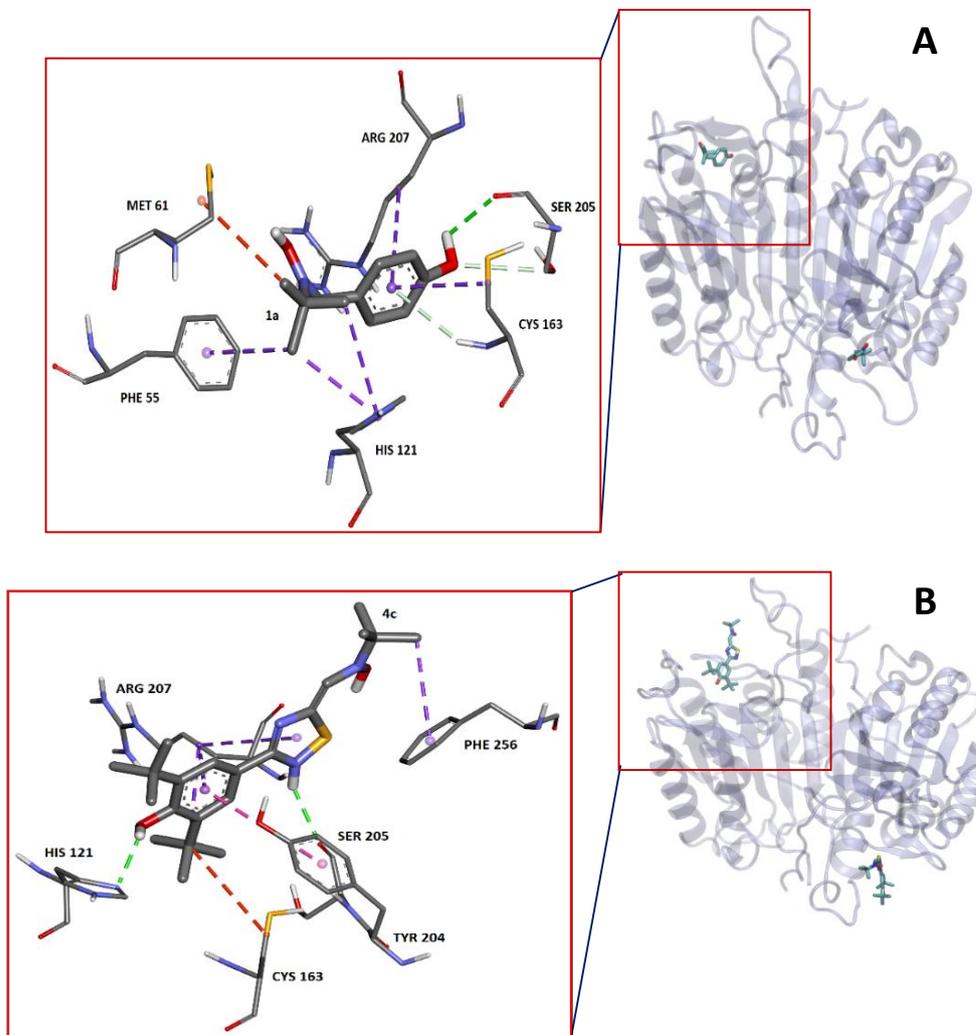
Caspasa-3	60%
Caspasa-3-1a	65%
Caspasa-3-1b	48%
Caspasa-3-4c	62%



**Figura 13.** Estructura caspasa-3. Cadenas A y C en violeta, cadenas B y D en verde.

Como podemos ver en el Gráfico 8 el hecho de que la caspasa-3 esté unida a nitronas en la región de los sitios activos hace que esta no se comporte de la misma forma en solución, ya que vemos que la fluctuación de los residuos cambia de manera apreciable cuando está sola y cuando está ligada. De forma general podemos decir que las cadenas **A** y **C** son las que se ven más afectadas por las nitronas (ver Figura 13) esto es coherente ya que los aminoácidos que interactúan con las nitronas en la zona del sitio activo forman parte de estas cadenas. Sin embargo, no todas las nitronas afectan de la misma forma la posición de los aminoácidos en la proteína ya que se observa que cuando la caspasa-3 está ligada a la nitrona **1b** es más móvil que la proteína sola y cuando se encuentra ligada a la nitrona **4c** o **1a** se vuelve más rígida lo que le quita flexibilidad algo que es fundamental en la zona de los *loops* para que pueda producirse la catálisis enzimática.

A continuación se muestran imágenes de los complejos caspasa-3-**1a** y caspasa-3-**4c** y un diagrama 3D de las interacciones de los ligandos con la proteína.

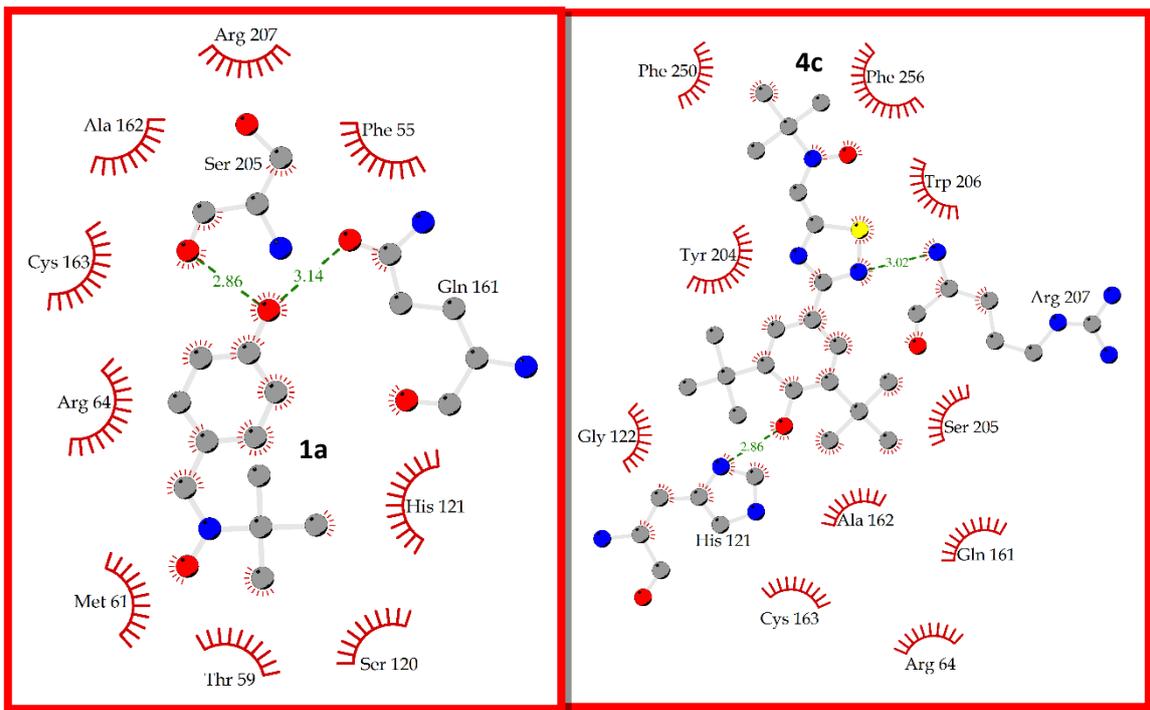


**Figura 14.** Estructura representativa de los complejos caspasa-3-**1a** (A) y caspasa-3-**4c** (B) a lo largo de la simulación. A la derecha estructura completa de la proteína unida a dos ligandos, a la izquierda diagrama 3D de las interacciones del ligando con la proteína en uno de los sitios de unión. En línea punteada interacciones del ligando con la proteína, en violeta Pi-Alquil, en lila Pi-sigma, en magenta Pi-Pi, en naranja alquil-alquil, en verde y blanco enlaces de hidrógeno.

En la Figura 14 se observa que la caspasa-3 une dos moléculas de nitrona en regiones cercanas al sitio catalítico, y que los *loops* implicados en la catálisis estarían formando una cavidad adecuada para que la nitrona se una mediante interacciones débiles de tipo hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno que permiten que la misma se mantenga unida a lo largo de toda la simulación.

En el diagrama 3D (Figura 12A y B, izquierda) se aprecian las interacciones débiles que estabilizan la unión de la nitrona a caspasa-3. En estas se ve implicada la díada catalítica (Cys163 e His121) y aminoácidos de los sitios involucrados en la catálisis. Cabe destacar que la nitrona **4c** (Figura 12A) forma mayor número de interacciones con caspasa-3. Si observamos los enlaces de hidrógeno (EDH) vemos que la nitrona **1a** forma dos EDH mientras que la nitrona **4c** forma tres. Esto es importante para la fuerza y estabilidad de la interacción.

Debido a que en el diagrama 3D se muestran los aminoácidos que se encuentran más cercanos a la nitrona en la proteína con el fin de que la imagen no quedara sobrecargada, se procedió a realizar un diagrama 2D de las interacciones en donde se aprecia la participación de un mayor número de residuos aminoacídicos (Figura 15).



**Figura 15.** Diagrama 2D de las interacciones de la nitrona **1a** y **4c** con la caspasa-3. En esta están implicados los aminoácidos de la región del sitio catalítico entre otros. La línea punteada en verde son enlaces de hidrógeno, y el número la distancia en Å a la que están los átomos que forman el enlace.

Debido a que ambas nitronas se unen en sitios muy similares dentro de la proteína varios de los aminoácidos que se ve que interactúan son comunes a ambos sitios. Sin embargo, la nitrona **4c** que mediante ensayos experimentales resultó ser una de las más efectivas en la inhibición de la apoptosis y la reducción de caspasa-3 activa, interactúa con un número mayor de

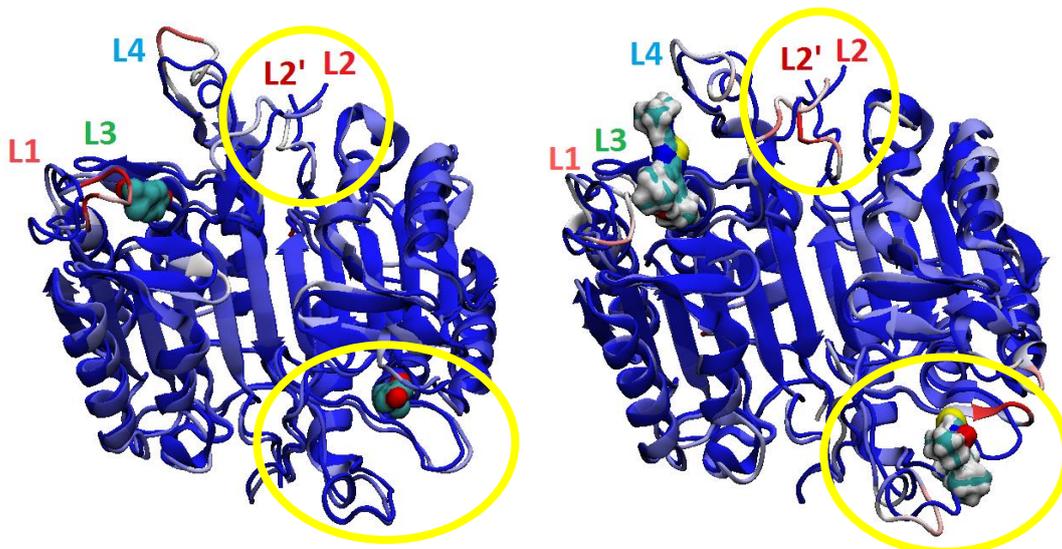
aminoácidos pertenecientes a los sitios implicados en la catálisis si la comparamos con la nitrona **1a** que presentó una actividad un poco menor (Tabla 6).

**Tabla 6.** Aminoácidos de los sitios que participan en la interacción con la nitrona **1a** y **4c**.

	1a	4c
<b>Sitio 1</b>		Arg 64
		His 121
		Gln 161
		Cys 163
		Ser 205
<b>Sitio 2</b>		Tyr 204
		Trp 206
		Phe 256
<b>Sitio 5</b>		Phe 250

Como se ve en la Tabla 6 la nitrona **4c** genera interacciones con tres aminoácidos pertenecientes al sitio 2 y con una de las fenilalaninas que se encuentran en el *loop* 4 formando el sitio 5, a diferencia de la nitrona **1a** que solo interacciona con aminoácidos del sitio 1. Estos resultados se correlacionan con los experimentales ya que esta diferencia seguramente este afectando la afinidad de unión de la nitrona **4c** a la caspasa-3 volviendo más fuerte la interacción y por ende más efectiva la inhibición.

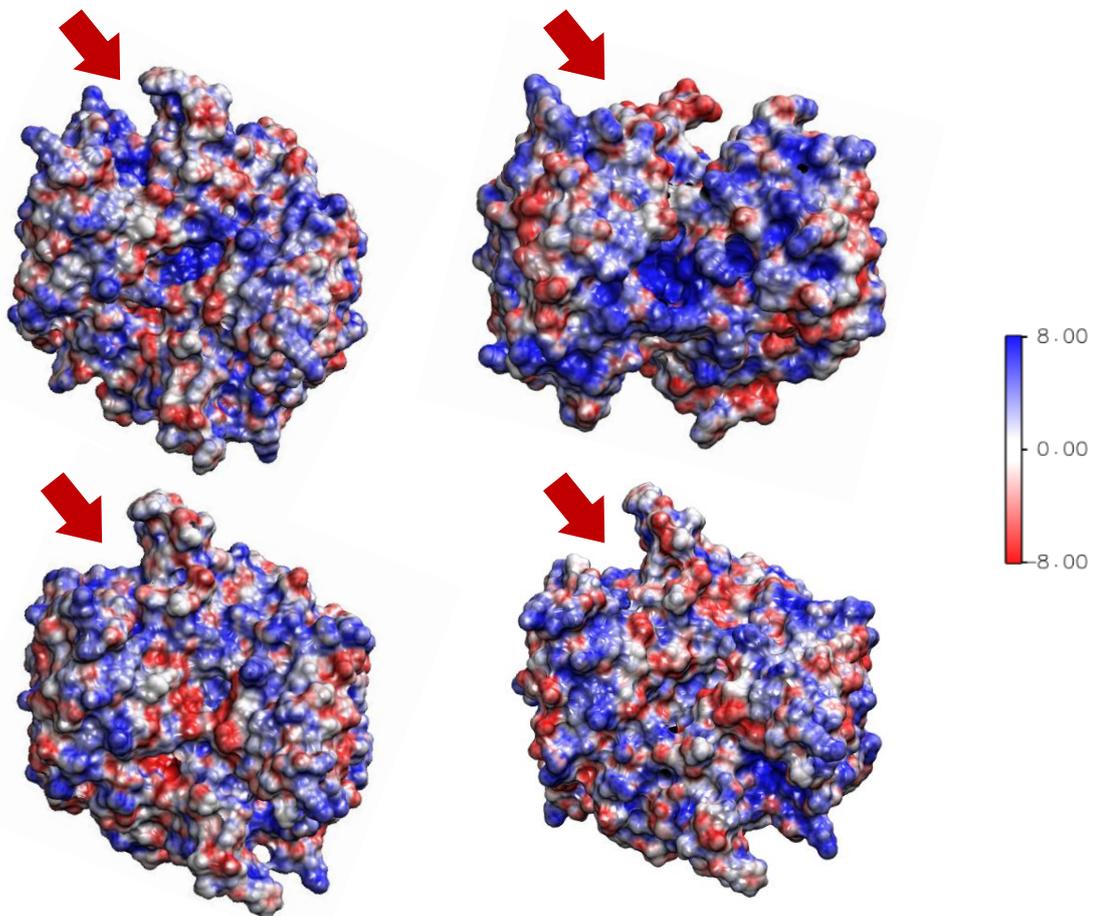
Para poder determinar si la proteína cambia su conformación cuando se encuentra unida a nitronas se llevó a cabo el solapamiento de estructuras representativas de la caspasa-3 sola con la caspasa-3 unida a la nitrona **1a** y **4c** (Figura 16).



**Figura 16.** Solapamiento de estructuras representativas de la caspasa-3 sola con la caspasa-3 unida a la nitrona **1a** (izquierda) y **4c** (derecha). En la escala de colores el blanco y el rojo indican que tan diferente es la estructura del complejo caspasa-3-nitrona con respecto a la caspasa-3 sin ligando en azul. Cuanto más cercano al rojo más mayor es la diferencia conformacional entre ambas estructuras.

En la Figura 14 se aprecia como los *loops* cambian su conformación cuando la nitrona está unida. Esto es muy relevante ya que los mismos son esenciales para el reconocimiento y correcto posicionamiento del sustrato, lo que sugiere que probablemente una vez que la nitrona se une a la caspasa el sustrato ya no pueda ser reconocido y clivado correctamente. Algo interesante a destacar es que las nitronas afectan de manera diferencial a los dos sitios catalíticos, y como se observa en esta imagen el compuesto **4c** tiene un impacto mayor en ambos sitios, de hecho tanto el *loop 2* como el *loop 2'* que son críticos para mantener la conformación activa [86] se ven claramente distorsionados.

Con el propósito de ver el efecto de las nitronas en el potencial electrostático y en la superficie de caspasa-3 se realizó el potencial electrostático mapeado sobre la superficie de la caspasa-3 y de los complejos (Figura 17).



**Figura 17.** Potencial electrostático mapeado sobre la superficie de caspasa-3 sin ligando (izquierda, arriba), pro-caspasa-3 (derecha, arriba), caspasa-3-**1a** (izquierda, abajo) y caspasa-3-**4c** (derecha, abajo). La escala desde el azul al rojo muestra el rango de potencial electrostático de 8.00 a -8.00 kT/e.

En la Figura 17 se puede apreciar claramente la diferencia conformacional en los *loops* cuando la enzima está sola y cuando está ligada. Se observa cómo se abre el surco formado por los *loops* en la zona del sitio catalítico cuando las nitronas están unidas a la caspasa-3 volviéndose la

conformación más parecida a la de la procaspasa-3. Esta apertura del bolsillo estaría impidiendo el correcto posicionamiento del sustrato en su sitio de unión, y por este motivo la misma se volvería inactiva. Además, se observan cambios importantes en el potencial electrostático de la enzima, la interface de la caspasa-3 es mayoritariamente positiva y cuando las nitronas están unidas esta se vuelve bastante más positiva. Además, varias zonas de la proteína se vuelven neutras cuando las nitronas están ligadas. Esto seguramente interfiera en el correcto reconocimiento molecular del sustrato. En cuanto a lo que se observa en la forma de la proteína y conformación de los *loops* cuando esta no ligada y cuando está ligada se podía decir que se vuelve más parecida a la procaspasa-3, sobretodo en el caso del complejo caspasa-3-4c.

Estos resultados podrían estar explicando los resultados experimentales donde se observa una disminución de caspasa-3 activa ya que el anticuerpo sería incapaz de reconocer esta nueva conformación de la enzima. Si bien los tiempos cortos de simulación realizados no permitirían en principio ver cambios conformacionales muy grandes, los resultados teóricos preliminares apuntan a que la caspasa-3 unida a nitrona cambia su conformación en la zona de los *loops* asemejándose más a la del zimógeno. Por esta razón como perspectivas a futuro se pretende extender las simulaciones para ver si efectivamente la caspasa-3 unida a las nitronas adquiere una conformación similar a la de pro-caspasa-3.

## **V. Conclusiones y perspectivas**

A partir de los resultados experimentales se logró determinar que las nitronas carecen de toxicidad y efectivamente inhiben la apoptosis mediante la reducción de los niveles de células anexina-V positivas y de caspasa-3 activa en la línea celular HT22.

A su vez, por medio de simulaciones de dinámica molecular se pudieron caracterizar los complejos, observándose cambios conformacionales en caspasa-3 inducidos por las nitronas, que podrían estar explicando el efecto anti-apoptótico mediado por las nitronas, ya que estas provocan cambios conformacionales a nivel del sitio catalítico como consecuencia de su interacción con residuos de los sitios implicados en la catálisis.

Actualmente se están llevando a cabo ensayos de inhibición enzimática *in vitro* con el fin de elucidar si la disminución de caspasa-3 activa en las células se da mediante un mecanismo que implica la interacción directa de las nitronas con la misma. Hasta ahora se han obtenido resultados prometedores en donde vemos que tanto el compuesto **4c** como el **1a** inhiben considerablemente la actividad de la caspasa-3.

Estos resultados se correlacionan con los teóricos que sugieren que los cambios conformacionales inducidos por las nitronas en caspasa-3 podrían explicar tanto la reducción de caspasa-3 activa observada, así como también el reconocimiento molecular para su inhibición.

El hecho de que las nitronas no presenten citotoxicidad, sean atrapadores de radicales libres, tengan la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, presenten actividad anti-apoptótica y sean potentes inhibidores de caspasa-3. Las vuelve óptimas para convertirse en potenciales fármacos de una terapia alternativa para el tratamiento de EA.

Próximamente, pretende profundizar en el estudio del mecanismo de acción de estas moléculas, de manera que en principio se realizará un estudio de dosis-respuesta de las nitronas que mostraron tener una mayor capacidad reductora de los niveles de caspasa-3 activa en células HT22 con el fin de determinar la  $IC_{50}$  (concentración necesaria de cada compuesto para inhibir el 50% de la apoptosis).

En cuanto a los estudios teóricos, se tomarán como punto de partida los complejos caspasa-3-nitrona obtenidos por simulaciones de dinámica molecular plana y se realizarán simulaciones de dinámica molecular acelerada. Este protocolo aumenta el muestreo conformacional del sistema lo cual permite realizar simulaciones más largas en una escala de tiempo accesible pudiendo así observar en detalle los cambios conformacionales que experimenta caspasa-3 debido a la unión de las nitronas. Esto permitirá predecir el mecanismo de inhibición a nivel atómico detallado y determinar los requerimientos estructurales necesarios a fin de mejorar la actividad de los compuestos.

Para complementar los ensayos de citotoxicidad, de las nitronas se llevará a cabo el Test de Ames con el propósito de determinar si las nitronas poseen mutagenicidad y finalmente se pondrá a punto un modelo de rata que simule EA.

## **VI. Referencias**

- [1] G. Tesco, Y. Ho Koh, R. E. Tanzi. Caspase Activation Increases  $\beta$ -Amyloid Generation Independently of Caspase Cleavage of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein (APP). *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 46074–46080.
- [2] 2015 Alzheimer’s Disease Facts and Figures. Alzheimer’s association
- [3] [www.alz.org](http://www.alz.org) consultada el día 23 de octubre, 2015.
- [4] The World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends.
- [5] <http://www.worldlifeexpectancy.com/cause-of-death/alzheimers-dementia/by-country/> consultada el día 1 de setiembre, 2015.
- [6] S. Hamulakova, L. Janovec, M. Hrabínova, P. Kristian, K. Kuca, M. Banasova, J. Imrich. Synthesis, design and biological evaluation of novel highly potent tacrine congeners for the treatment of Alzheimer’s disease. *Eur. J. Med. Chem.* 55 (2012) 23-31.
- [7] WH. Zheng, S. Bastianetto, F. Mennicken, W. Ma, S. Karamyloid. L-peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* 115 (2002) 201-211.
- [8] LA. Craig, NS. Hong, RJ. McDonald. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer’s disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35 (2011) 1397–1409.
- [9] AV. Terry, JJ. Buccafusco. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer’s Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306 (2003) 821-827
- [10] R. Schliebs, T. Arendt. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer’s disease. *J. Neural. Transm.* 113 (2006) 1625-44.
- [11] BM. McGleenon, KB. Dynan, AP. Passmore. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer’s disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 48 (1999) 471–480.
- [12] VJ. De-Paula, M. Radanovic, BS. Diniz, OV. Forlenza. Alzheimer’s disease. *Sub-cell Biochem.* 65 (2012) 329-52.
- [13] T. Fiorelli, L. Kirouac, J. Padmanabhan. Altered Processing of Amyloid Precursor Protein in Cells Undergoing Apoptosis. *Plos One.* 8 (2013) 1-12.
- [14] HW. Querfurth, FM. LaFerla. Mechanisms of Disease Alzheimer’s Disease. *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 329-44.
- [15] Y. An, C. Zhang, S. He, C. Yao, L. Zhang, Q. Zhang. Main hypotheses, concepts and theories in the study of Alzheimer’s disease. *Life Sci. J.* 5 (2008) 1-5.
- [16] [www.nia.nih.gov/alzheimers/scientific-images](http://www.nia.nih.gov/alzheimers/scientific-images) consultada el día 3 de setiembre, 2015.
- [17] DA. Butterfield, ChB. Pocernich. The Glutamatergic System and Alzheimer’s Disease Therapeutic Implications. *CNS Drugs* 17 (2003) 641-652
- [18] W. Gordon-Krajcer, E. Salinska, JW. Lazarewicz. N-methyl-d aspartate receptor-mediated processing of beta-amyloid precursor protein in rat hippocampal slices: in vitro-superfusion study. *Folia Neuropathol.* 40 (2002) 13-7
- [19] DA. Butterfield, CM. Lauderback. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer’s disease brain: potential causes and consequences involving amyloid-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 1050-60
- [20] I. Bezprozvanny, MP. Mattson. Neuronal Calcium Mishandling and the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease. *Trends Neurosci.* 31 (2008) 454–463.
- [21] A. Spät, G. Szanda, G. Csordás, G. Hajnóczky. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling. *Cell Calcium.* 44 (2008) 51-63.

- [22] MP. Mattson, B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg, RE. Rydel. Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci.* 12 (1992) 376-89.
- [23] Y. Le, W. Gong, HL. Tiffany, A. Tumanov, S. Nedospasov, W. Shen, NM. Dunlop, JL. Gao, PM. Murphy, JJ. Oppenheim, JM. Wang. Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J Neurosci.* 21 (2001) 1-5.
- [24] MP. Mattson, SL. Chan. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 34 (2003) 385-97.
- [25] MA. Leissring, Y. Akbari, CM. Fanger, MD. Cahalan, MP. Mattson, FM. LaFerla. Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J. Cell. Biol.* 149 (2000) 793-8.
- [26] O. Nelson, H. Tu, T. Lei, M. Bentahir, B. Strooper, I. Bezprozvanny. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca<sup>2+</sup> leak function of presenilin 1. *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1230-9.
- [27] T. Wyss-Coray, L. Mucke. Inflammation in neurodegenerative disease — a double-edged sword. *Neuron.* 35 (2002) 419- 32.
- [28] M. D'Amelio, M. Sheng, F. Cecconi. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends in Neurosci.* 35 (2012) 700-709.
- [29] VP. Reddy, X. Zhu, G. Perry, MA. Smith. Oxidative stress in Diabetes and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 16 (2009) 763-774.
- [30] DA. Butterfield, J. Drake, C. Pocernich, A. Castegna. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.* 7 (2001) 548-54.
- [31] Crawford, ED.; Wells, JA. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 80 (2011) 1055-1087.
- [32] J. Dong, CS. Atwood, VE. Anderson, SL. Siedlak, MA. Smith, G. Perry, PR. Carey. Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry-US.* 42 (2003) 2768–2773.
- [33] AI. Bush, RE. Tanzi. Therapeutics for Alzheimer's Disease Based on the Metal Hypothesis. *Neurotherapeutics.* 5 (2008) 421–432.
- [34] MP. Mattson. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev.* 77 (1997) 1081-132.
- [35] MP. Mattson. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430 (2004) 631–639.
- [36] PT. Francis, AM. Palmer, M. Snape, GK. Wilcock. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosur. Ps.* 66 (1999) 137–147.
- [37] CG. Parsons, A. Stöffler, W. Danysz. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system—too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology.* 53 (2007) 699-723.
- [38] S. Reardon. Alzheimer antibody drugs show questionable potential. *Nature reviews.* 14 (2015) 591,592.
- [39] T. Silva, J. Reis, J. Teixeira, F. Borges. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. *Ageing Research Reviews* 15 (2014) 116-145.
- [40] S. Khan, K. Ahmad, MA. Alshammari, M. Adnan, MH. Baig, M. Lohani, P. Somvanshi, S. Haque. Implication of Caspase-3 as a Common Therapeutic Target for Multineurodegenerative Disorders and Its

Inhibition Using Nonpeptidyl Natural Compounds. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International* (2015) 1-9.

[41] I. Kanazawa. “How do neurons die in neurodegenerative diseases?” *Trends Mol. Med.* 7 (2001) 339–344.

[42] MA. Burguillos, T. Deierborg, J. Cano, P. Brundin, E. Kavanagh, E. Englund, A. Persson, JL. Venero, B. Joseph, N. Hajji, A. Garcia-Quintanilla. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature.* 472 (2011) 319-325.

[43] FG. Gervais, D. Xu, GS. Robertson, JP. Vaillancourt, Y. Zhu, J. Huang, A. LeBlanc, D. Smith, M. Rigby, MS. Shearman, EE. Clarke, H. Zheng, LH. Van Der Ploeg, SC. Ruffolo, NA. Thornberry, S. Xanthoudakis, RJ. Zamboni, S. Roy, DW. Nicholson. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer’s amyloid-b precursor protein and myloidogenic Ab peptide formation. *Cell* 97 (1999) 395–406.

[44] JP. Borg, Y. Yang, M. De Taddéo-Borg, B. Margolis, RS. Turner. The X11a protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Ab40 and Ab42 secretion. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14761–14766.

[45] C. Dumanchin-Njock, CA. Alves da Costa, L. Mercken, L. Pradier, F. Checler. The caspase-derived C-terminal fragment of  $\beta$ APP induces caspase-independent toxicity and triggers selective increase of  $A\beta_{42}$  in mammalian cells. *J. Neurochem.* 8 (2001) 1153–1161.

[46] G. Tesco, Y. Ho Koh, RE. Tanzi. Caspase Activation Increases  $\beta$ -Amyloid Generation Independently of Caspase Cleavage of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein (APP). *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 46074-46080.

[47] DC. Lu, S. Soriano, DE. Bredesen, EH. Koo. Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid b-protein toxicity. *J. Neurochem.* 87 (2003) 733–741.

[48] V. Galvan, OF. Gorostiza, S. Banwait, M. Ataie, AV. Logvinova, S. Sitaraman, E. Carlson, SA. Sagi, N. Chevallier, K. Jin, DA. Greenberg, DE. Bredesen. Reversal of Alzheimer’s-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *PNAS* 103 (2006) 7130–7135.

[49] M. D’Amelio, M. Sheng, F. Cecconi. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends Neurosci.* 35 (2012) 700-709.

[50] Z. Li, J. Jo, JM. Jia, SC. Lo, DJ. Whitcomb, S. Jiao, K. Cho, M. Sheng. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell.* 141 (2010) 859–871.

[51] A. de Calignon, LM. Fox, R. Pitstick, GA. Carlson, BJ. Bacskai, TL. Spires-Jones, BT. Hyman. Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464 (2010) 1201–1214.

[52] CA. Bradley, S. Peineau, C. Taghibiglou, CS. Nicolas, DJ. Whitcomb, ZA. Bortolotto, BK. Kaang, K. Cho, YT. Wang, GL. Collingridge. A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* 5 (2012) 1-11.

[53] J. Jo, DJ. Whitcomb, K. Moore Olsen, TL. Kerrigan, SC. Lo, G. Bru-Mercier, B. Dickinson, S. Scullion, M. Sheng, G. Collingridge, K. Cho.  $A\beta_{1-42}$  inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3 $\beta$ . *Nat. Neurosci.* 14 (2011) 545-547.

[54] M. D’Amelio, V. Cavallucci, S. Middei, C. Marchetti, S. Pacioni, A. Ferri, A. Diamantini, D. De Zio, P. Carrara, L. Battistini, S. Moreno, A. Bacci, M. Ammassari-Teule, H. Marie, F. Cecconi. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Nat. Neurosci.* 14 (2011) 69-79.

[55] N. Louneva, JW. Cohen, LY. Han, K. Talbot, RS. Wilson, DA. Bennett, JQ. Trojanowski, SE. Arnold. Caspase-3 is enriched in post-synaptic densities and increased in Alzheimer’s disease. *Am. J. Pathol.* 173 (2008) 1488–1495.

[56] C. Opazo, X. Huang, RA. Cherny, RD. Moir, AE. Roher, AR. White, R. Cappai, CL Masters, RE. Tanzi, NC. Inestrosa, AI. Bush. Metalloenzyme-like activity of Alzheimer’s disease  $\beta$ -amyloid: Cu-dependent catalytic

conversion of dopamine, cholesterol and biological reducing agents to neurotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 40302–40308.

[57] AR. Khan, MN. James. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* 7 (1998) 815–36.

[58] P. Fuentes-Prior, GS. Salvesen. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384 (2004) 201–232.

[59] V. Cavallucci, M. D’Amelio. Matter of life and death: the pharmacological approaches targeting apoptosis in brain diseases. *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 215–229.

[60] YP. Goldberg, et al. Cleavage of huntingtin by apopain, aproapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat. Genet.* 13 (1996) 442–449.

[61] CL. Wellington, et al. Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 9158–9167.

[62] C. Alves da Costa, F. Checler. Apoptosis in Parkinson’s disease: is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism? *Cell. Signal.* 23 (2011) 963–968.

[63] RE. Burke. Programmed cell death in Parkinson’s disease. *Handb. Clin. Neurol.* 83 (2007) 591–605.

[64] F. Strappazon, et al. Non-apoptotic roles for death-related molecules: When mitochondria chose cell fate. *Exp. Cell Res.* 318 (2012) 1309–1315.

[65] F. Ferraro, L. Minini, S. Cancela, A. Merlino. (2015) Resultados no publicados.

[66] P. Fuentes-Prior, GS. Salvesen. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384 (2004) 201–232.

[67] J. Agniswamy, B. Fang, IT. Weber. Conformational similarity in the activation of caspase-3 and -7 revealed by the unliganded and inhibited structures of caspase-7. *Apoptosis* 14 (2009) 1135–1144.

[68] J. Rotonda, DW. Nicholson, KM. Fazil, M. Gallant, Y. Gareau, M. Labelle, EP. Peterson, DM. Rasper, R. Ruel, JP. Vaillancourt. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 619–625.

[69] B. Feeney, C. Pop, P. Swartz, C. Mattos, AC. Clark. Role of loop bundle hydrogen bonds in the maturation and activity of (Pro)caspase-3. *Biochem.* 45 (2006) 13249–13263.

[70] HJ. Kang, Y. Lee, MS. Jeong, M. Kim, KH. Bae, SJ. Kim, SJ. Chung. Molecular insight into the role of the leucine residue on the L2 loop in the catalytic activity of caspases 3 and 7. *Biosci. Rep.* 32 (2012) 305–313.

[71] NA. Thornberry, TA. Rano, EP. Peterson, DM. Rasper, T. Timkey. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17907–17911.

[72] HR. Stennicke, M. Renatus, M. Meldal, GS. Salvesen. Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem. J.* 350 (2000) 563–568.

[73] S. Mahrus, JC. Trinidad, DT. Barkan, A. Sali, AL. Burlingame, JA. Wells. Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini. *Cell.* 134 (2008) 866–76

[74] JC. Timmer, W. Zhu, C. Pop, T. Regan, SJ. Snipas, AM. Eroshkin, SJ. Riedl, GS. Salvesen. Structural and kinetic determinants of protease substrates. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 1101–1108.

[75] J. Walter, A. Schindzielorz, J. Grunberg, C. Haass. Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (1999) 1391–96.

- [76] M. Barkett, D. Xue, HR. Horvitz, TD. Gilmore. Phosphorylation of IkappaB-alpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29419–22.
- [77] R. Schweigreiter, T. Stasyk, I. Contarini, S. Frauscher, T. Oertle et al. Phosphorylation-regulated cleavage of the reticulon protein Nogo-B by caspase-7 at a noncanonical recognition site. *Proteomics* 7 (2007) 4457–67.
- [78] B. Fang, PI. Boross, J. Tozser, IT. Weber. Structural and kinetic analysis of caspase-3 reveals role for S5 binding site in substrate recognition. *J.Mol.Biol.* 360 (2006) 654-666.
- [79] C. Park, S. Marqusee. Probing the high energy states in proteins by proteolysis. *J. Mol. Biol.* 343 (2004) 1467–76.
- [80] A. Kossiakoff. The application of neutron crystallography to the study of dynamic and hydration properties of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 1195–227.
- [81] JC. Timmer, GS. Salvesen. Caspase substrates. *Cell Death Differ.* 14 (2007) 66–72.
- [82] D. Demon, P. Van Damme, T. Vanden Berghe, A. Deceuninck, J. Van Durme, J. Verspurten, K. Helsens, E. Impens, M. Wejda, J. Schymkowitz, F. Rousseau, A. Madder, J. Vandekerckhove, W. Declercq, K. Gevaert, P. Vandenabeele. Proteome-wide substrate analysis indicates substrate exclusion as a mechanism to generate caspase-7 versus caspase-3 specificity. *Mol. Cell. Proteomics.* 8 (2009) 2700–14.
- [83] A. Krippner-Heidenreich, RV. Talanian, R. Sekul, R. Kraft, H. Thole, H. Ottleben, B. Lüscher. Targeting of the transcription factor Max during apoptosis: phosphorylation-regulated cleavage by caspase-5 at an unusual glutamic acid residue in position P1. *Biochem. J.* 358 (2001) 705–15.
- [84] M. Germain, EB. Affar, D. D’Amours, VM. Dixit, GS. Salvesen, GG. Poirier. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 28379–84.
- [85] B. Fang, G. Fu, J. Agniswamy, RW. Harrison, IT. Weber. Caspase-3 binds diverse P4 residues in peptides as revealed by crystallography and structural modelling. *Apoptosis* 14 (2009) 741–752.
- [86] B. Feeney, C. Pop, P. Swartz, C. Mattos, AC. Clark. Role of Loop Bundle Hydrogen Bonds in the Maturation and Activity of (Pro)caspase-3. *Biochem.* 45 (2006) 12349-13263.
- [87] S. Cancela, P. Hernández, G. Mourglia-Ettlin, W. Porcal, A. Merlino NITRONES AS APOPTOSIS INHIBITORS IN NEURONAL CELLS. 23rd IUBMB Congress and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, August 24th to 28th, 2015.
- [88] W. Tao, J. Kim, S. Faubel, JC. Wu, SA. Falk, RW. Schrier, CL. Edelstein. Caspase inhibition reduces tubular apoptosis and proliferation and slows disease progression in polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102 (2005) 6954-6959.
- [89] SD. Linton, T. Aja, RA. Armstrong, X. Bai, LS. Chen, N. Chen, B. Ching, P. Contreras, JL. Diaz, CD. Fisher, LC. Fritz, P. Gladstone, T. Groessl, X. Gu, J. Herrmann, BP. Hirakawa, NC. Hoglen, KG. Jahangiri, VJ. Kalish, DS. Karanewsky, L. Kodandapani, J. Krebs, J. McQuiston, SP. Meduna, K. Nalley, ED. Robinson, RO. Sayers, K. Sebring, AP. Spada, RJ. Ternansky, KJ. Tomaselli, BR. Ullman, KL. Valentino, S. Weeks, D. Winn, JC. Wu, P. Yeo, CZ. Zhang. First-in-class pan caspase inhibitor developed for the treatment of liver disease. *J. Med. Chem.* 48 (2005) 6779-6782.
- [90] TL. Deckwerth, LM. Adams, C. Wiessner, PR. Allegrini, M. Rudin, A. Sauter, B. Hengerer, RO. Sayers, G. Rovelli, T. Aja, R. May, K. Nalley, SD. Linton, DS. Karanewsky, JC. Wu, S. Roggo, A. Schmitz, PC. Contreras, KJ. Tomaselli. Long-term protection of brain tissue from cerebral ischemia by peripherally administered peptidomimetic caspase inhibitors. *Drug Develop. Res.* 52 (2001) 579-586.

- [91] L. Yang, S. Sugama, RP. Mischak, M. Kiaei, N. Bizat, E. Brouillet, TH. Joh, MF. Beal. A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP *in vivo*. *Neurobiol. Dis.* 17 (2004) 250-259.
- [92] S. Toulmond, K. Tang, Y. Bureau, H. Ashdown, A. Giroux, Y. Zhu, M. Boucher, B. Pikounis, S. Xanthoudakis, S. Roy, M. Rigby, R. Zamboni, GS. Robertson, GYK. Ng, DW. Nicholson, JPF. Flückiger. Neuroprotective effects of M826, a reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease. *British J. Pharmacol.* 141 (2004) 689-697.
- [93] CA. Dinarello. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4 (2004) 378-385.
- [94] D. Lee, SA. Long, JL. Adams, G. Chan, KS. Vaidya, TA. Francis, K. Kikly, JD. Winkler, CM. Sung, C. Debouck, S. Richardson, MA. Levy, WE. DeWolf, PM. Keller, T. Tomaszek, MS. Head, MD. Ryan, C. Haltiwanger, PH. Liang, CA. Janson, PJ. McDevitt, K. Johanson, NO. Concha, W. Chan, SS. Abdel-Meguid, AM. Badger, MW. Lark, DP. Nadeau, LJ. Suva, M. Gowen, ME. Nuttall. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspase-3 and -7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16007-16014.
- [95] A. Iwata, K. Nishio, RK. Winn, EY. Chi, WR. Henderson, J. Harlan. A Broad-Spectrum Caspase Inhibitor Attenuates Allergic Airway Inflammation in Murine Asthma Model. *J. Immunol.* 170 (2003) 3386-3391.
- [96] J. Rozman-Pungercar, N. Kopitar-Jerala, M. Bogyo, D. Turk, O. Vasiljeva, I. Stefe, P. Vandenabeele, D. Bromme, V. Puizdar, M. Fonovic, M. Trstenjak-Prebanda, I. Dolenc, V. Turk, B. Turk. Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death Differ.* 10 (2003) 881-888.
- [97] M. Li, VO. Ona, C. Guécán, M. Chen, V. Jackson-Lewis, LJ. Andrews, AJ. Olszewski, PE. Stieg, JP. Lee, S. Przedborski, RM. Friedlander. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288 (2000) 335-339.
- [98] TM. Caserta, AN. Smith, AD. Gultice, MA. Reedy, TL. Brown. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 8 (2003) 345-352.
- [99] TT. Rohn, E. Head. Caspases as therapeutic targets in Alzheimer's disease: is it time to cut to the chase? *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2 (2009) 108-118.
- [100] M. Werle, A. Bernkop-Schnürch. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids.* 30 (2006) 351-367.
- [101] SD. Linton. Caspase Inhibitors: A Pharmaceutical Industry Perspective. *Curr. Topics Med. Chem.* 5 (2005) 1697-1717.
- [102] Y. Jiang, TV. Hansen. Isatin 1,2,3-triazoles as potent inhibitors against caspase-3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 1626-1629.
- [103] LM. Havran, DC. Chong, WE. Childers, PJ. Dollings, A. Dietrich, BL. Harrison, V. Marathias, G. Tawa, A. Aulabaugh, R. Cowling, B. Kapoor, W. Xu, L. Mosyak, F. Moy, WT. Hum, A. Wood, AJ. Robichaud. 3,4-dihydropyrimido(1,2-A)indol-10(2H)-ones as potent non-peptidic inhibitors of caspase-3. *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 7755-7768. 14.
- [104] R. Fattorusso, D. Jung, KJ. Crowell, M. Forino, M. Pellechia. Discovery of a novel class of reversible non-peptide caspase inhibitors via a structure-based approach. *J. Med. Chem.* 48 (2005) 1649-1656.
- [105] Y. Han, A. Giroux, J. Colucci, CI. Bayly, DJ. Mckay, S. Roy, S. Xanthoudakis, JP. Vaillancourt, DM. Rasper, J. Tam, P. Tawa, DW. Nicholson, RJ. Zamboni. Novel pyrazinone mono-amides as potent and reversible caspase-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 1173-1180.
- [106] Y. Han, A. Giroux, EL. Grimm, R. Aspiotis, S. Francoeur, CI. Bayly, DJ. Mckay, S. Roy, S. Xanthoudakis, JP. Vaillancourt, DM. Rasper, J. Tam, P. Tawa, NA. Thornberry, EP. Paterson, M. García-Calvo, JW Becker, J. Rotonda, DW. Nicholson, RJ. Zamboni. Discovery of novel aspartyl ketone dipeptides as potent and selective caspase-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 805-808.

- [107] D. Lee, SA. Long, JH. Murray, JL. Adams, ME. Nuttall, DP. Nadeau, K. Kikly, JD. Winkler, CM. Sung, MD. Ryan, MA. Levy, PM. Keller, WE. DeWolf. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7. *J. Med. Chem.* 44 (2001) 2015-2026.
- [108] W. Chu, J. Rothfuss, A. d'Avignon, C. Zeng, D. Zhou, RS. Hotchkiss, RH. Mach. Isatin sulfonamide analogs containing a Michael addition acceptor: a new class of caspase 3/7 inhibitors. *J. Med.Chem.* 50 (2007) 3751-3755.
- [109] PJ. Lakshmi, BVSS. Kumar, RS. Nayana, MS. Mohan, R. Bolligarla, SK. Das, MU. Bhanu, AK. Kondapi, M. Ravikumar. Design, synthesis, and discovery of novel non-peptide inhibitor of Caspase-3 using ligand based and structure based virtual screening approach. *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6040-6047.
- [110] Z. Li, Y. Pan, W. Zhong, Y. Zhu, Y. Zhao, L. Li, W. Liu, H. Zhou, C. Yang. Synthesis and evaluation of N-acyl-substituted 1,2-benzisothiazol-3-one derivatives as caspase-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6735-45.
- [111] B. Halliwell, JMC. Gutteridge. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine. *Free Radic. Biol. Med.* 12 (1992) 93-5.
- [112] G. Kim, YE. Lee, H. Xu, MA. Philbert, R. Kopelman. Nanoencapsulation method for high selectivity sensing of hydrogen peroxide inside live cells. *Anal Chem.* 82 (2010) 2165-9.
- [113] M. Aslan, T. Ozben. Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 1 (2004) 111-9.
- [114] G. Perry, A. Nunomura, K. Hirai, X. Zhu, M. Pérez, J. Avila, RJ. Castellani, CS. Atwood, G. Aliev, LM. Sayre, A. Takeda, MA. Smith. *Free Radical Biol. Med.* 33 (2002) 1475.
- [115] G. Barriga, C. Olea-Azar, E. Norambuena, A. Castro, W. Porcal, A. Gerpe, M. González, H. Cerecetto. New heteroaryl nitrones with spin trap properties: Identification of a 4-furoxanyl derivative with excellent properties to be used in biological systems. *Bioorgan. Med. Chem.* 18 (2010) 795–802.
- [116] C. Chavarría, DI. Perez, C. Pérez, JA. Morales, S. Alonso, A. Pérez, C. Gil, JM. Souza, W. Porcal. Microwave-assisted synthesis of hydroxyphenyl nitrones with protective action against oxidative stress. *Eur. J. Med. Chem.* 58 (2012) 44-49.
- [117] W. Porcal, P. Hernández, M. González, A. Ferreira, C. Olea-Azar, H. Cerecetto, A. Castro. Heteroaryl nitrones as drugs for neurodegenerative diseases: synthesis, neuroprotective properties, and free radical scavenger properties. *J. Med. Chem.* 51 (2008) 6150-6159.
- [118] Y. Zhao, J. Dou, T. Wu, HA. Aisa. Investigating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activities of Gossypium herbaceam. *Molecules.* 18 (2013) 951-62.
- [119] IE. Orhan, IP. Sutar, EK. Akkol. In vitro neuroprotective effects of the leaf and fruit extracts of Juglans regia L. (walnut) through enzymes linked to Alzheimer's disease and antioxidant activity. *Int J Food Sci Nutr.* 62 (2011) 1781-6.
- [120] M. Lohani, M. Ahuja, MA. Buabeid, S. Dean, S. Dennis, V. Suppiramaniam, B. Kemppainen, M. Dhanasekaran. Anti-oxidative and DNA protecting effects of flavonoids-rich Scutellaria lateriflora. *Nat. Prod. Commun.* 10 (2013) 1415-8.
- [121] JY. Wang, LL. Wen, YN. Huang, YT. Chen, MC. Ku. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr. Pharm. Des.* 12 (2006) 3521-33.
- [122] MJ. McManus, MP. Murphy, JL. Franklin. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate caspase-dependent and -independent neuronal deaths. *Mol. Cell. Neurosci.* 63 (2014) 13-23.

- [123] A. Das, B. Gopalakrishnan, OH. Voss, AI. Doseff, FA. Villamena. Inhibition of ROS-induced apoptosis in endothelial cells by nitron spin traps via induction of phase II enzymes and suppression of mitochondria-dependent pro-apoptotic signaling. *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 486–497.
- [124] H. Cerecetto, W. Porcal. Pharmacological Properties of Furoxans and Benzofuroxans: Recent Developments. *Mini-Rev. Med. Chem.* 5 (2005) 57-71.
- [125] A. Castro, T. Castaño, A. Encinas, W. Porcal, C. Gil. Advances in the synthesis and recent therapeutic applications of 1,2,4-thiadiazole heterocycles. *Bioorgan. Med. Chem.* 14 (2006) 1644–1652.
- [126] S. Cancela, F. Ferraro, L. Minini, A. Merlino. Docking y dinámica molecular aplicados al diseño racional de inhibidores selectivos de caspasa-3. *2da Jornadas de +Biofísica*, Montevideo, Uruguay, 21-23 de diciembre 2013.
- [127] P. Maher, JB. Davis. The Role of Monoamine Metabolism in Oxidative Glutamate Toxicity. *J. Neurosci.* 16 (1996) 6394 – 6401.
- [128] J. Liu, L. Li, WZ. Suo. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci.* 84 (2009) 267-71.
- [129] TJ. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol. Methods.* 65 (1983) 55 - 63.
- [130] B. Liu, Z. Jian, Q. Li, K. Li, Z. Wang, L. Liu, L. Tang, X. Yi, H. Wang, C. Li, T. Gao. Baicalein protects Human melanocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase activation and the p38 MAPK pathway. *Free Rad. Biol. Med.* 53 (2012) 183–193.
- [131] LR. Aminova, JC. Chavez, J. Lee, H. Ryu, A. Kung, JC. LaManna, RR. Ratan. Prosurvival and Prodeath Effects of Hypoxia-inducible Factor-1Stabilization in a Murine Hippocampal Cell Line. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 3996 –4003.
- [132] G. Viola, I. Castagliuolo, R. Bortolozzi, MG. Ferlin, E. Hamel, G. Basso, S. Moro. MG-2477, a new tubulin inhibitor, induces autophagy through inhibition of the Akt/mTOR pathway and delayed apoptosis in A549 cells. *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 16–26.
- [133] RBJS. Krishnan, JS. Binkley, R. Seeger, JA. Pople. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. Basis set for correlated wave-functions. *J. Chem. Phys.* 72 (1980) 650-654.
- [134] J. Tomasi. B. Mennucci & E. Cancès. *The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level.* *J. Molec. Struc.* Vol. 464 pp. 211-226. 1999.
- [135] JD Chai, M. Head-Gordon. Long-range corrected hybrid density functionals with dumped atom-atom dispersion corrections. *J. Chem. Phys.* 10 (2008) 6615-6620.
- [136] MJ. Frisch, GW. Trucks, HB. Schlegel, GE. Scuseria, MA. Robb, JR. Cheeseman. *Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT.* 2009
- [137] GM. Morris, R. Huey, MF. Lindstrom, RK. Sanner, DS. Belew, AJ. Goodsell. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785-2791.
- [138] DA Case, TA. Darden, TE. Cheatham, CL. Simmerling, J. Wang, RE. Duke. *AMBER 12, University of California, San Francisco.* 2012.
- [139] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, MC. Lee, G. Xiong, W. Zhang. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* 24 (2003) 1999-2012.

- [140] WL. Jorgensen, J. Chandrasekhar, JD Madura, RW. Impey, ML. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926-935.
- [141] RW. Pastor. An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms. *Mol. Phys.* 65 (1988) 1409-1419.
- [142] HJC. Berendsen, JPM. Postma, WF. Van Gunsteren, ARHJ. & JR. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3584-3690.
- [143] JP. Ryckaert. Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints - molecular-dynamics of N-alkanes. *J. Comput. Chem.* 23 (1997) 327-341.
- [144] W. Humphrey A. Dalke, K. Schulten. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33-38.
- [145] AJ. Krohn, E. Preis, JHM. Prehn. Staurosporine-Induced Apoptosis of Cultured Rat Hippocampal Neurons Involves. (1998)
- [146] EJ. Morris, E. Keramaris, HJ. Rideout, RS. Slack, NJ. Dyson, L. Stefanis, DS. Park. *J. Neurosci.* 21 (2001) 5017–5026.