



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN SILICO* DE
TETRAHIDROQUINOLINAS COMO AGENTES CONTRA LA ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

**AUTOR: CAMILO SILVA SEPÚLVEDA
PROFESOR GUÍA: LIC. EN BIOLOGÍA DRA. MARGARITA GUTIERREZ
CABRERA**

TALCA, CHILE

2021

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

Dedicatoria

A mis padres Camilo e Ivonne por que con su compromiso y scarificio hicieron posible que llegara a estas instancias además de su grna apoyo incondicional, a acad miembro de familia que de una manera u otra auyudó a que ho llegara hasta estas instancias

Agradecimientos:

A la profesora Margarita Gutiérrez por su compromiso, paciencia y disponibilidad a la hora de ayudar a llevar a cabo este trabajo.

A mis amigos que ayudaron a hacer más ameno esta etapa llamada universidad y porque, aunque la sufrimos las risas no faltaron, de que estuvo bueno estuvo bueno.

A cada una de las personas que creyó en mí y me incentivaron a seguir adelante a pesar de los malos ratos.

También agradecer al Fondo Nacional de Desarrollo científico y Tecnológico, que mediante Fondecyt de iniciación 1200531 permitió la realización de esta investigación y trabajo

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
I. RESUMEN	9
II. INTRODUCCIÓN	10
III. MARCO TEÓRICO	13
Etiología y patogenia de la Enfermedad de Alzheimer	13
Hipótesis de las causas de la Enfermedad de Alzheimer	13
Hipótesis genética o familiar	14
Primeras hipótesis: hipótesis Tau y Cascada amiloide	15
Hipótesis colinérgica	15
Hipótesis oxidativa e hipótesis de la Cascada mitocondrial	16
Excitotoxicidad del glutamato	19
Déficit de vitamina B5	20
Neuroinflamación	20
Tratamientos para la enfermedad de Alzheimer	21
Enzimas Colinesterasas: Blanco terapéutico para la Enfermedad de Alzheimer	24
Obtención de quinolinas y tetrahydroquinolinas	29
Origen sintético	31
Propiedad antioxidante de Heterociclos de Tetrahydroquinolinas	33
IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
V. MATERIALES Y MÉTODOS	35
Inhibición enzimática	35

Actividad antioxidante	37
Análisis <i>in Silico</i>	41
VI. RESULTADOS	42
Determinación de la capacidad antioxidante	44
Capacidad Inhibitoria de la enzima Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa	47
Propiedades Farmacológicas	48
Toxicidad.....	49
VII. DISCUSIÓN	50
VIII. CONCLUSIÓN	52
IX. REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1:** Algunas hipótesis que explican la Etiología de la EA. Fuente: elaboración propia..... 14
- **Figura 2:** Daño producido por el estrés oxidativo en la neurona, específicamente a nivel de la conexión sináptica. Tomado de C. Dorado y Col., 2003 17
- **Figura 3:** Principales fármacos para el tratamiento de la EA, que han sido aprobados y usados en las etapas sintomáticas, Elaborado con ChemDraw drawing. 22
- **Figura 4:** Diferentes subsitios presentes en la cavidad del sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa. 25
- **Figura 5:** Disposición de la acetilcolina en el sitio activo de la enzima, en donde ocurre la hidrólisis del neurotransmisor. Elaborado a partir de ChemDraw drawing 25
- **Figura 6:** Inhibidores Colinérgicos que interactúan con la cavidad aromática de la enzima acetilcolinesterasa. Elaborado con ChemDraw drawing..... 27
- **Figura 7:** Ejemplo de compuestos que interactúan con el subsitio periférico aniónico. Elaborado con ChemDraw drawing. 27

- Figura 8: Productos de la reacción de Pfitzinger y la reacción de Niementowski. Elaborado con ChemDraw drawing. 31
- Figura 9: esquema general de síntesis de Camps. Elaborado a partir de ChemDraw drawing. 32
- Figura 10: Esquema general de reducción de quinolinas a THQs por hidrogenación catalítica. Elaborado con ChemDraw drawing. 32
- Figura 11: Reacción química de la inhibición de colinesterasa por colorimetría. Elaborado con ChemDraw. 36
- Figura 12: Reacción de atrapamiento del radical DPPH. Tomada y adaptada de de BECKER, Magda M. y col. 2019(1) 37
- Figura 13: Fórmula para expresar el porcentaje de atrapamiento o decoloración. elaboración propia 38
- **Figura 14:** reacción de atrapamiento del radical ABTS, indicando el color original y el que se debería tornar en caso de un correcto atrapamiento. Tomada y adaptada de de BECKER, Magda M. y col. 2019(1) 40
- **Figura 15:** Porcentaje de atrapamiento del radical DPPH de cada uno de los compuestos analizados en las concentraciones de 100,50 y 10 µg/mL. La fórmula química y estructura de cada uno de los compuestos se detalla en la tabla 3..... 45
- **Figura 16:** Porcentaje de atrapamiento del radical ABTS de cada uno de los compuestos analizados en las concentraciones de 100, 50 y 10 µg/mL. La fórmula química y estructura de cada uno de los compuestos se detalla en la tabla 3..... 47
- **Figura 17:** indicadores de toxicidad del software Osiris, los indicadores dieron el mismo resultado para cada uno de los compuestos analizados 50

ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1:** Moléculas que servirían como blanco terapéuticos para la EA. Tomad y adaptado de Srivastaba y col.(12)..... 23
- **Tabla 2:** Quinolinas y/o compuestos derivados de ellas, de origen natural, que han demostrado tener un buen potencial farmacológico. Tomado y adaptado de Matada y col (58)..... 30
- **Tabla 3:** Protocolo de trabajo con Volúmenes expresados en mL, volumen final del ensayo 2.25 mL. 38
- **Tabla 4:** protocolo de trabajo para determinar el porcentaje de atrapamiento del radical ABTS, con un volumen final de 3ml. este protocolo se aplicó en duplicado para cada una de las muestras descritas en la **Tabla 5** y se midió su absorbancia a 732 nm 40
- **Tabla 5:** Moléculas derivadas de THQS con diferente patrón de sustitución y sus respectivos nombres, fórmula química, estructura química y masa. sintetizadas en el marco del proyecto FONDECYT 1200531. 42
- **Tabla 6:** Porcentaje de atrapamiento del radical DPPH de las muestras analizadas, expresado en porcentaje (%)..... 45
- **Tabla 7:** Porcentaje de atrapamiento del radical ABTS de las muestras analizadas, expresado en porcentaje (%)..... 46
- **Tabla 8:**Concentración necesaria para lograr el 50% de inhibición enzimática, calculados en base a estudios de inhibición de la actividad enzimática *in vitro*, para después obtener dicha concentración expresada en μM 48
- **Tabla 9:** Análisis de las propiedades farmacológicas (ADME) de cada uno de los compuestos descritos previamente. 49

I. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común a nivel mundial, produce un deterioro cognitivo progresivo, cada vez su incidencia aumenta debido al envejecimiento de la población, a pesar de ser cada vez más común esta enfermedad aún es de causa desconocida y por la misma razón aún no se cuenta con un tratamiento efectivo que logre frenar o revertir los efectos de esta por esto es que desde su descubrimiento se han planteado diferentes hipótesis sobre la patogenia de la EA y a partir de estas se han generados fármacos para combatir la enfermedad, de los cuales ninguno ha logrado detener el deterioro cognitivo, y los que mejores resultados han dado solo logran hacer más lento la aparición de la sintomatología, dentro de los medicamentos que mejor rendimiento han tenido se encuentran los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), que basándose en la hipótesis colinérgica, alargan la vida del neurotransmisor acetilcolina, dando como resultado un deterioro cognitivo más lento. Dentro de los inhibidores se ha probado diversos medicamentos que pudieran lograr un mejor efecto que los ya aprobados y reduzcan los efectos adversos en las personas que padecen de EA, dentro de esta búsqueda aparecen las quinolinas y sus derivados tetrahydroquinolinas, que ya han servido de andamio químico para la síntesis de otros medicamentos como lo son antipalúdicos, estos compuestos son fácil síntesis y su estructura se puede modificar, lo que va a permitir modificar su actividad ya sea potenciándola o disminuyéndola, además por su estructura estos compuestos representa un potencial antioxidante, por lo que también estaría cubriendo la hipótesis oxidativa de la EA. Para este estudio se probaron 6 de estos compuestos ya sintetizados y se puso a prueba su actividad antioxidante, su capacidad de inhibir la enzima AChE, la selectividad que tienen por esta enzima por sobre otra colinesterasa como lo es la butirilcolinesterasa (BuChE), todos estos ensayos *in vitro*, además los compuestos se sometieron a estudios *in silico* para evaluar su potencial farmacológico. De todos los compuestos analizados el que presentó un mejor rendimiento fue el compuesto **C** que tiene una buena capacidad antioxidante, tiene la capacidad de inhibir la AChE, aunque no es comparable con el fármaco inhibidor de referencia galantamina, también presentó muy buenas propiedades farmacológicas y en teoría no presentaría ningún efecto tóxico, por lo que puede sentar las bases para realizar futuros ensayos biológicos en cultivos celulares para evaluarlo y desarrollar a partir de él posible fármaco que ampliaría la gama de medicamentos anti- Alzheimer.

II. INTRODUCCIÓN

Las demencias se definen como las manifestaciones conductuales de una disfunción cerebral, manifestándose como deterioro en la orientación, la memoria, las funciones intelectuales, el juicio y el efecto.(2), si bien las demencias están relacionadas con muchas enfermedades neurodegenerativas más de la mitad de estas se relacionan con la enfermedad de Alzheimer (EA), convirtiendo a esta enfermedad en un gran desafío para la salud pública desde la década 1980, siendo hoy en día una de las principales causas de morbimortalidad en pacientes ancianos(3).

La EA, fue descrita por primera vez en 1907 por Alois Alzheimer, quien describió los síntomas de la enfermedad en su paciente Auguste Deter, una mujer de 51 años, que se encontraba internada en el asilo estatal de Frankfurt, Alemania, describió los síntomas de su paciente, donde se evidenciaba un grave deterioro de su memoria, reconocía objetos, pero luego olvidaba sus nombres y usos, tenía problemas para leer y escribir, entre otros relacionados con la cognición que afectaban también su conducta.(4) Cuando Auguste Deter murió, Alzheimer utilizó la nueva técnica histológica de tinción de plata para examinar su cerebro. Cuando lo hizo, observó las placas neuróticas, los ovillos neurofibrilares y la angiopatía amiloide que se convertiría en las señas de identidad de la enfermedad que ahora lleva su nombre.(2)

Por definición la EA se trata de un cuadro de inicio en la edad adulta que deteriora, de forma progresiva e irreversible, las funciones cognitivas, con una especial predilección por la memoria a corto plazo, y que se relaciona con el acúmulo de placas β -amiloide y proteína tau hiperfosforilada en el cerebro.(3), si bien no hay una causa clara de la enfermedad, hay una serie de factores de riesgo que pueden contribuir con la aparición y desarrollo de esta, siendo la edad el factor de riesgo más importante, aunque existen casos raros donde la enfermedad es producida por factores genéticos. Existen diversos estudios genéticos que han encontrado asociación de ciertos factores genéticos con la enfermedad, pero estos representan una menor parte de la enfermedad(5). Respecto a la o las causas de la EA se han planteado diferentes hipótesis, siendo la de la acumulación de péptido amiloide y la hiperfosforilación de tau el mecanismo patógeno más estudiado y aceptado por la

comunidad científica, sin embargo otras hipótesis han despertado interés como la hipótesis de la cascada mitocondrial(6). La hipótesis de la cascada amiloide propone brevemente que, la acumulación suficiente de un derivado de la proteína precursora de amiloide (APP), A β , induce los cambios bioquímicos, histológicos y clínicos destacados que pueden manifestarse en pacientes con EA(6). Además de esta existen otras hipótesis que intentan explicar la etiología de la EA, dentro de estas se encuentran: 1) hipótesis Tau, 2) hipótesis de estrés oxidativo, 3) hipótesis inflamatoria, 4) hipótesis vascular, 5) hipótesis de colesterol, 6) hipótesis de metal, 7) hipótesis de metal, 8) hipótesis de ciclo celular.(6), entre otras hipótesis que también se estudian. Dentro de estas se encuentra la hipótesis colinérgica. Un avance inicial en la EA llegó en la década de 1970 con la demostración de un déficit colinérgico en el cerebro de los pacientes con EA, mediado por déficits en la enzima colina acetiltransferasa. Esto, junto con el reconocimiento del papel de la acetilcolina en la memoria y el aprendizaje, condujo a la hipótesis colinérgica de EA y estimuló los intentos de aumentar terapéuticamente la actividad colinérgica. El agotamiento colinérgico es una característica tardía de la cascada neurodegenerativa. Inhibidores de la colinesterasa bloquean la enzima colinesterasa, que descompone la acetil colina en la hendidura sináptica, potenciando la transmisión colinérgica.(7)

Desde el descubrimiento de la EA y el posterior planteamiento de diversas hipótesis se han realizado una gran cantidad de estudios buscando una terapia, ya sea de tipo farmacológica o conductual, que logre detener el deterioro cognitivo en la EA. De todos los fármacos descubiertos y estudiados a la fecha los que han dado mejores resultados son los que tienen como base la hipótesis colinérgica de la enfermedad siendo aprobados solo 3 medicamentos con acción anticolinesterásica. Los únicos medicamentos aprobados clínicamente y/o la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para EA son tres inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), a saber, donepezil, rivastigmina y galantamina, y el receptor NMDA (NMDAR) antagonista de la memantina.(8). Por esta razón es que se hace de suma urgencia el descubrir nuevos medicamentos que puedan ayudar a combatir el deterioro de la enfermedad y en lo posible llegar a frenarlo, en este caso los anticolinesterásicos, que aumentan los niveles de neurotransmisores específicamente de la acetilcolina (ACh), generan un modesto desempeño y solo traen un alivio temporal de los síntomas, pero a pesar de esto son los que mejores

resultados han dado comparándolos con otros medicamentos en vías de desarrollo. En general, los nuevos fármacos candidatos parecen estar lejos del horizonte de aprobación, porque los ensayos clínicos siguen proporcionando resultados desalentadores.(8)

Por las razones anteriores es que las quinolinas y sus derivados tetrahydroquinolinas, muestran un potencial de desarrollo fármacos, en la misma línea que los ya descubiertos, inhibidores de AchE, con ejemplos tales como: Tacrine tiene acción de inhibición de la colinesterasa mientras que los derivados de la 8-hidroxiquinolina tienen propiedades quelantes de metal, neuroprotectores y antioxidantes(9). Por otro lado, Los oximes 1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2,2,4-trionas actúan como antagonistas de NDMA en receptores de glicina. Estos compuestos se pueden utilizar como agentes contra las enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, la EA) que permitan un mejor tratamiento de la enfermedad, menos efectos adversos en relación con los fármacos actualmente en uso y una mejora en la calidad de vida de quien padece de esta enfermedad y de su entorno familiar.

III. MARCO TEÓRICO

Etiología y patogenia de la Enfermedad de Alzheimer

Si bien la etiopatogenia de la EA no está bien documentada aún, se describen ciertos hallazgos propios de la enfermedad, dentro de estos, principalmente, se encuentran: características histológicas de la EA, la reducción considerable en el número de células corticales y la presencia de 2 tipos de estructuras proteicas, las placas amiloides extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares.(10) Estos hallazgos junto con los cambios conductuales que se caracterizan por un fracaso sutil y poco reconocido de la memoria (a menudo llamado deterioro cognitivo leve o ICM) y lentamente se vuelve más grave y, eventualmente, incapacitante. Otros hallazgos comunes incluyen confusión, mal juicio, alteración del lenguaje, quejas visuales, agitación, retirada y alucinaciones.(11). Con la presencia de todos los criterios mencionados se puede hacer diagnóstico de la enfermedad. El diagnóstico clínico de EA, basado en signos clínicos de demencia progresiva lenta y hallazgos de neuroimagen de atrofia cortical cerebral grave, es correcto aproximadamente 80%-90% de los casos.(11)

La(s) causa(s) de la EA no está bien descrita y pueden ser de tipo familiar o hereditaria, o de tipo no familiar, dónde la causa no está bien determinada. Aproximadamente el 25% de toda la EA es familiar, y el 75% no es familiar (es decir, una persona con EA y sin antecedentes familiares conocidos de EA). Debido a que la EA familiar y la EA no familiar parecen tener los mismos fenotipos clínicos y patológicos, sólo pueden distinguirse por antecedentes familiares y/o por pruebas genéticas moleculares.(11)

Hipótesis de las causas de la Enfermedad de Alzheimer

Con la finalidad de intentar explicar el mecanismo fisiopatológico de la EA, han surgido diferentes hipótesis que mediante diferentes mecanismos de neurotoxicidad y muerte celular explican el daño neuronal que se produce en la enfermedad (Figura 1).

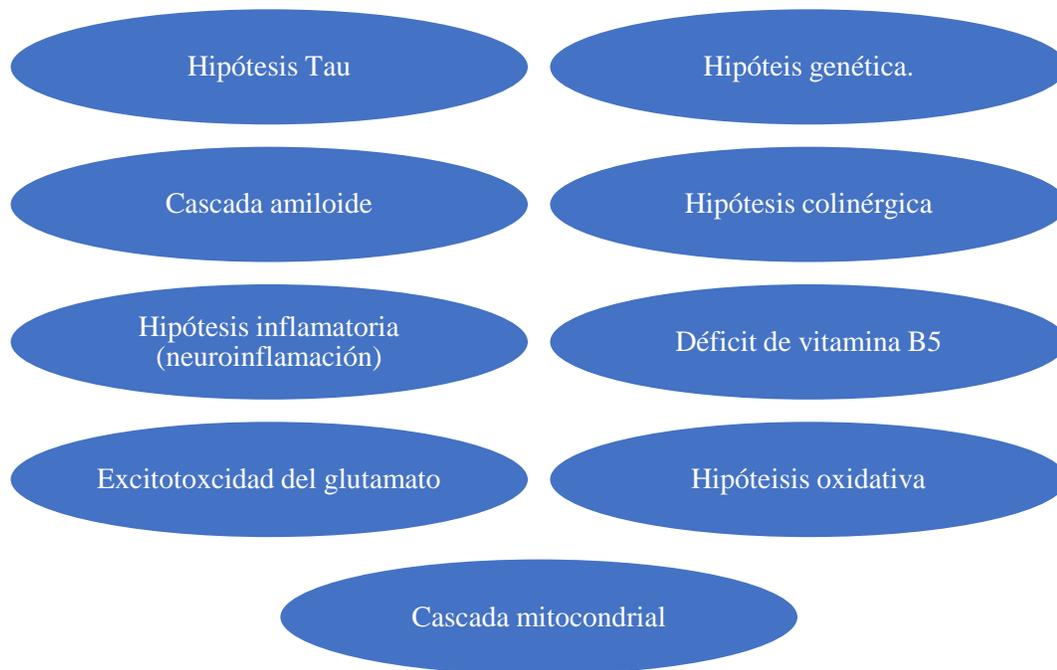


Figura 1: Algunas hipótesis que explican la Etiología de la EA. Fuente: elaboración propia

Hipótesis genética o familiar

Esta más que una hipótesis es una causa ya bien descrita y dilucidada, pero que representa una mínima parte de los casos de EA, alrededor del 0,1% de los casos y se caracteriza, principalmente por presentarse, de manera sintomática, a una edad más temprana que los casos de EA idiopática, presentado síntomas de la enfermedad entre los 30 y 50 años. Es estos casos la enfermedad se produce por mutaciones en los genes que codifican para la presenilina 1y2, y la proteína precursora amiloide. Una mutación en cualquiera de estos genes va a conllevar a un mal funcionamiento de las proteínas antes mencionados, lo que a su vez conlleva a la formación anormal de $A\beta$ que se va a acumular y va a generar el deterioro neuronal característico de la EA que se a continuación al desarrollar la hipótesis amiloide.(12)

Primeras hipótesis: hipótesis Tau y Cascada amiloide

La hipótesis de la cascada amiloide se basa en que la neurodegeneración que ocurre durante el desarrollo de la EA es producida por el mal procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP), este mal procesamiento conduce a la producción anormal del péptido β -amiloide ($A\beta$). Las enzimas secretasas, en condiciones normales se encargan de cortar APP, pero al ocurrir este proceso de forma aberrante, producto, principalmente, de mutaciones en β y γ secretasas, puede conducir a una producción anormal de $A\beta$ (7). Posterior a esto, se puede desencadenar una cascada que conduce al daño sináptico y a la pérdida de neuronas, y en última instancia a las señales de identidad patológicas de la EA: placas amiloideas y ovillos neurofibrilares compuestos de proteína Tau hiperfosforilada, con la neurodegeneración resultante.(7) Esta hipótesis es sustentada en base a los casos de EA de tipo familiar, donde existen mutaciones autosómicas dominantes en los genes que codifican la proteína precursora amiloide(13) y las proteínas del complejo gamma secretasa presenilina 1/2 (PSEN1/2) y en la porción considerable de pacientes con síndrome de Down que muestran manifestaciones clínicas de EA a temprana edad, lo que se ha atribuido a la triplicación y sobreexpresión del gen que codifica para APP, que se encuentra en el cromosoma 21.(13)

Respecto a la hipótesis de Tau, esta se basa en otro importante hallazgo histopatológico en pacientes con EA, los ovillos neurofibrilares, los cuales se encuentran compuestos de proteína Tau. Tau es una proteína asociada a microtúbulos que trabaja como proteína de andamio y es abundante en los axones(14). El exceso de fosforilación de Tau por desequilibrio entre quinasas y fosfatasas da lugar al secuestro de la proteína Tau normal y de otras proteínas asociadas con los microtúbulos (MAP 1 y MAP 2). Esto provoca el desensamble de los microtúbulos y el deterioro del flujo axoplásmico, que produce degeneración retrógrada y pérdida de sinapsis, por un lado, y por otro, la polimerización de Tau hiperfosforilada, asociada con Tau normal, que genera los ovillos neurofibrilares.(15)

Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica de la EA surge durante mediados de la década de 1970 e inicios de la década de 1980 y más que una hipótesis que busca explicar las causas y la

fisiopatología de la enfermedad, esta buscaba explicar el mecanismo del deterioro cognitivo que se produce durante el desarrollo de la EA, el curso de otras demencias, y en el envejecimiento normal, proponiendo a las neuronas colinérgicas como pieza central en los procesos cognitivos y de memoria. Lo cual se ha comprobado por medio de diferentes estudios que han ido aportando a la concepción que se tiene hoy en día de esta hipótesis. (16)

El planteamiento de esta hipótesis partió con la demostración de que un déficit colinérgico en el cerebro de los pacientes con EA, mediado por déficits en la enzima colina acetiltransferasa. Esto, junto con el reconocimiento del papel de la acetilcolina (ACh) en la memoria y el aprendizaje, condujo a la hipótesis colinérgica de EA. La cual postula que la causa principal del deterioro cognitivo en las demencias es el descenso de la cantidad de ACh en regiones cerebrales relacionadas con la memoria y aprendizaje, y ha estimulado los intentos de aumentar terapéuticamente la actividad colinérgica. El agotamiento colinérgico es una característica tardía de la cascada neurodegenerativa. La pérdida sináptica es el principal correlato de la progresión de la enfermedad y la pérdida de neuronas colinérgicas que contribuye a los déficits de memoria y atención(17-19)

La hipótesis colinérgica se basa en tres hitos: el descubrimiento de marcadores colinérgicos presinápticos agotados en la corteza cerebral, el descubrimiento de que el núcleo basalis de Meynert (NBM) en el prosencéfalo basal es la fuente de inervación colinérgica cortical que sufre neurodegeneración grave en la enfermedad de Alzheimer y la demostración de que los antagonistas colinérgicos deterioran la memoria mientras que los agonistas tienen el efecto contrario(20) Los inhibidores de la colinesterasa bloquean esta enzima, que descompone la acetilcolina en la hendidura sináptica, potenciando la transmisión colinérgica. (7)

Hipótesis oxidativa e hipótesis de la Cascada mitocondrial

El estrés oxidativo ha sido reconocido como un factor que contribuye en el envejecimiento y en la progresión de múltiples enfermedades neurodegenerativas incluyendo

la EA. Un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) asociadas con la pérdida de la función mitocondrial, dependiente de la edad y la enfermedad, la homeostasis metálica alterada, y la reducción de la defensa antioxidante afectan directamente la actividad sináptica y la neurotransmisión en las neuronas, lo que conduce a la disfunción cognitiva característica en la EA.(21)

Cuando se genera un desequilibrio con los sistemas antioxidantes endógenos, como la superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa, las ROS no pueden ser neutralizadas por lo que se liberan y pueden causar un daño a nivel sistémico, incluido un daño neuronal, lo que va a conllevar al desarrollo de la EA. El equilibrio entre la producción de ROS y la defensa antioxidante es esencial para la función celular normal. Sin embargo, en EA, se altera la actividad de las enzimas antioxidantes, contribuyendo así a la acumulación sin restricciones de daño oxidativo(21, 22) (Figura 2). Numerosos estudios han demostrado la disfunción de las mitocondrias como un factor importante implicado en la patogénesis de la EA, a través de la producción de ROS(23). Hay evidencia de que el daño mitocondrial que resulta en una mayor producción de ROS contribuye a las primeras etapas de la EA antes de la aparición de los síntomas clínicos y la aparición de la patología Aβ(21). (22)

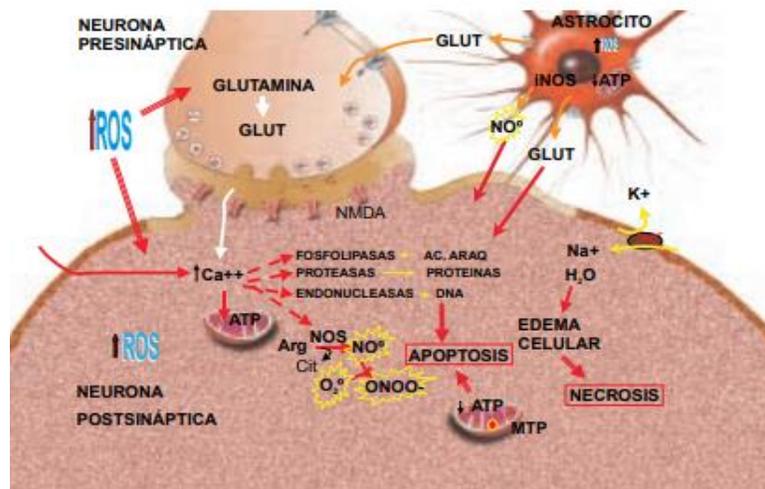


Figura 2: Daño producido por el estrés oxidativo en la neurona, específicamente a nivel de la conexión sináptica. Tomado de C. Dorado y Col., 2003

La hipótesis de la cascada mitocondrial, postula que, en los casos de EA de origen esporádico o idiopático de aparición tardía, la pérdida de la función mitocondrial asociada con factores como la edad afecta el procesamiento de A β PP, lo que desencadenaría una acumulación de A β . Esto sumado a que la disfunción mitocondrial ha sido bien documentada en la EA(21), incluso llega a poner en duda la existencia de la cascada amiloide, ya que según esta hipótesis el origen de la acumulación anormal de A β , que lleva a la acumulación de las placas amiloides, son defectos mitocondriales.(24) además, esta teoría también se sustenta en que se ha encontrado cierta relación entre las formas patológicas de la proteína Tau y la disfunción mitocondrial. (25)

El estrés oxidativo puede contribuir a la patogenia y progresión de la EA de diferentes formas, de las cuales destacan 3 principales: 1) peroxidación de macromolécula, 2) Potencial redox de iones metálicos A β , 3) disfunción mitocondrial. Todas estas formas de daño oxidativo tienen un efecto sobre la homeostasis celular, la generación de ROS y la regulación de la formación A β y p-tau.(26)

Otra de las formas en las que disfunción mitocondrial puede llevar a la formación de ROS es la desregulación que se produce en el metabolismo del hierro, metal de suma importancia en procesos oxidativos como la respiración celular, este metal mediante reacciones como las de Fenton y Heber-Weiss, va a generar estas ROS que van a aumentar el estrés oxidativo a nivel celular y aumentar el daño celular que conlleva, acelerando de cierta forma la neurodegeneración en el transcurso de la EA. Además de que el hierro podría jugar un papel en la formación del péptido A β y potenciar su toxicidad, el daño oxidativo asociado con A β se debe más bien a su alta afinidad por el hierro de unión (y el cobre) y su capacidad para reducir químicamente ambos metales que conducen a la formación catalítica de peróxido de hidrógeno y posterior daño oxidativo (27)

El papel del estrés oxidativo en el daño neuronal y consiguiente deterioro cognitivo, tanto en los pacientes con EA como en otras demencias se puede evidenciar mediante la medición de los mecanismos antioxidantes propios del organismo, ya que se ha comprobado una disminución de estos mecanismos tanto en el desarrollo de la EA, como en el deterioro cognitivo leve e incluso en el envejecimiento normal, donde a medida que aumenta la edad va disminuyendo la capacidad antioxidante, esto se evidencia con que muchos estudios han comparado la actividad antioxidantes de pacientes con la EA con individuos completamente sanos. Siguiendo esta hipótesis algunos estudios han tenido resultados favorables al evaluar sustancias basadas en fuertes antioxidantes en pacientes con la EA y deterioro cognitivo leve.(28)

Con los diferentes estudios que se enfocan en esta hipótesis se ha logrado definir que La disfunción mitocondria y el estrés oxidativo desempeñan un papel fundamental tanto en la aparición de signos y síntomas como en la fisiopatología.(29), pero no se le ha logrado atribuir un papel etiológico comprobable y/o exclusivo, y la terapia basada en mantener la viabilidad mitocondrial y disminuir el estrés oxidativo, aunque ha tenido muchos estudios y aun se están desarrollando tratamientos, no ha tenido buen rendimiento en la regresión de la enfermedad ni en la reducción sintomática.

Excitotoxicidad del glutamato.

La neurotransmisión medida por glutamato, principalmente la mediada por los receptores de N-metil-d-aspartato, tienen un rol neuroprotector, que se ha visto reflejado en diferentes estudios, en donde se ha evidenciado que un bloqueo de la función de estos receptores conduce a apoptosis. Esta neuroprotección se produce debido a que esta vía es capaz de activar factores de transcripción capaces de promover la supervivencia neuronal, además de bloquear vías de apoptosis mediadas por caspasas u otras vías como PUMA. Pese a este rol protector se ha evidenciado una señalización glutamatérgica excesiva conduce una excitotoxicidad en la que las células nerviosas pueden resultar dañadas o muertas, o también puede resultar en un trauma como un accidente cerebrovascular. Una modesta despolarización de la membrana postsináptica, sumado a otros factores que suprimen el bloqueo de Mg^{2+} en los receptores, pueden activar los NMDAR de forma leve y crónica, lo

que provoca el influjo prolongado de Ca^{2+} en la neurona postsináptica. El nivel patológico de la señalización de Ca^{2+} conduce a la pérdida gradual de la función sináptica y a la muerte celular neuronal final, que se correlaciona clínicamente con la disminución progresiva de la cognición / memoria y el desarrollo de la anatomía neural patológica observada en pacientes con EA.(30)

Déficit de vitamina B5

La vitamina B5 juega un rol muy importante en el metabolismo de muchos órganos y/o sistemas de gran importancia para el correcto funcionamiento del organismo, ya que es precursora de la acetil-coenzima A, que también es el precursor de acetilcolina, y los grupos compuestos grasos-acilo que regulan la función aislante vital de la mielina, en la EA tanto el neurotransmisor como la mielina se encuentran deteriorados, ya sea en función o en cantidad. Por otra parte, en la EA se evidencia un déficit de vitamina B5, el cual se ve aumentado en las zonas más dañadas con el desarrollo de la enfermedad, es decir que sufren un deterioro cerebral agudo, estas zonas comprenden la circunvolución temporal media, la corteza entorrinal y el hipocampo. Estudios han concluido que la deficiencia cerebral de vitamina B5 podría causar neurodegeneración y demencia en la EA, que podría ser prevenible, o incluso reversible en sus etapas iniciales, mediante el tratamiento con dosis orales de vitamina B5 suficientes para normalizar los niveles cerebrales.(12, 31)

Neuroinflamación

LA neuroinflamación como etiopatogenia de la EA, es controversial de cierto modo ya que si bien, existe un aumento de citoquinas proinflamatorias a medida que progresa la enfermedad y se producen los agregados $\text{A}\beta$, Se ha observado que la expresión de genes proinflamatorios puede inducirse debido a la unión de $\text{A}\beta$ a la superficie de la célula microglial y esto puede causar un aumento de las citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, IL-18, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β , que además puede causar hiperfosforilación de tau y pérdida neuronal. En el cerebro de los pacientes con EA, se ha encontrado que la expresión inicial de citoquinas proinflamatorias por células no neuronales, por ejemplo, las células endoteliales,

tiene una contribución significativa al desarrollo de la EA. Además, se ha encontrado que la microcirculación cerebral podría desempeñar un papel esencial en las citocinas proinflamatorias en el medio del cerebro de las personas con EA y también podría participar en la neurodegeneración.(32)

Tratamientos para la enfermedad de Alzheimer

Tomando en cuenta todas las hipótesis que buscan explicar la etiología y desarrollo de la EA, se han ido investigando diferentes fármacos para el tratamiento de la EA, sin embargo, aún no se ha determinado alguna cura o una regresión en la enfermedad, ya que los tratamientos existentes solo logran frenar el deterioro cognitivo y no pararlo ni revertirlo. En la actualidad no existe una prevención eficaz, ni un tratamiento etiopatogénico que cure o detenga la enfermedad; hoy disponemos de tratamientos sintomáticos modestamente efectivos, para mejorar la cognición y las alteraciones conductuales con la finalidad de mantener la función(33).

Actualmente no existe un tratamiento causal aprobado para EA, Sin embargo, sí se dispone de algunos fármacos que pueden retrasar, en determinadas etapas de la enfermedad, la progresión de la patología. Avances relacionados con el tratamiento de la EA incluyen control del estrés oxidativo, inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE), agonistas muscarínicos y nicotínicos, factores de crecimiento nervioso (NGF), antiinflamatorios y compuestos que impiden la formación y deposición de A β .(34)

Para preservar la cantidad de acetilcolina (ACh), se ha venido tratando a los pacientes desde hace más de diez años con inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE), que frenan las alteraciones en los primeros estadios de la enfermedad. Sin embargo, estos fármacos pierden su efectividad una vez que han degenerado las neuronas colinérgicas (35). Dentro de los fármacos existentes los que han mostrado mejores resultados en retrasar, cierta manera, la progresión de la EA, son los inhibidores de la AChE, los cuales son recomendados como tratamiento de primera elección para la EA(36) y son los que hasta ahora han sido aprobados

por diferentes entidades tanto las Guías de Práctica Clínica de la Academia Americana de Neurología como del Centro de Excelencia del Reino Unido sugieren el uso de inhibidores de AChE como tratamiento estándar de la EA(36, 37)

Durante los últimos años varios fármacos se han desarrollado y lanzado al mercado, principalmente los inhibidores de AChE indicados para el tratamiento de la EA leve a moderada, tales como galantamina, donepezilo, tacrina, rivastigmina y más recientemente, la memantina, (Figura 3) que ha sido aprobada para el tratamiento de la EA de moderada a grave. Pero ninguno de estos medicamentos ha detenido la enfermedad como tal, por tanto, hasta ahora no existe un tratamiento efectivo para combatirla; Por tal razón, es de vital importancia generar inhibidores selectivos para el tratamiento de dicha enfermedad, mediante la síntesis de nuevas moléculas y derivados con alto potencial bioactivo.

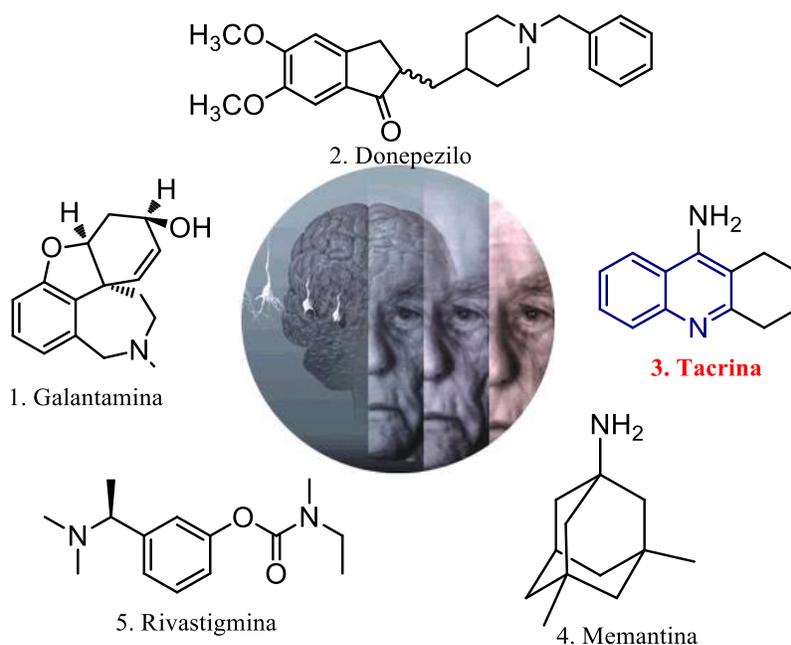


Figura 3: Principales fármacos para el tratamiento de la EA, que han sido aprobados y usados en las etapas sintomáticas, Elaborado con ChemDraw drawing.

Blancos terapéuticos de la enfermedad de Alzheimer

A lo largo de los años, desde que se conoce la EA, han surgido las hipótesis que se describieron anteriormente, la que a su vez dan como resultados estudios farmacológicos que han tratado de buscar tratamiento definitivo que cure la EA o frene completamente el avance de esta, estos estudios han encontrado diferentes moléculas que de alguna manera participan en el desarrollo y progresión de la EA, por lo que representarían un blanco terapéutico para focalizar los ensayos clínicos de ciertos fármacos, algunas de estas moléculas también pueden representar biomarcadores tempranos de la EA, haciendo posible un tratamiento previo a la sintomatología. Estas moléculas se detallan en la Tabla 1

Tabla 1: Moléculas que servirían como blanco terapéuticos para la EA. Tomad y adaptado de Srivastaba y col.(12)

Nombre de la proteína
Ciclooxigenasa-1 (COX-1)
TDP-43
N-metil- D- aspartato (NMDA)
Glucógeno-sintasa-quinasa-3β (GSK-3β)
Óxido nítrico sintasa (NOS)
Fosfodiesterasa-5 (PD-5)
Acetilcolinesterasa (AChE)
Enzima convertidora de angiotensina (ACE)
c-Jun quinasa N-terminal (JNK)
Ciclooxigenasa-2 (COX-2)
Butirilcolinesterasa (BuChE)
Enzima 1 de escisión de la proteína precursora de amiloide del sitio β (BACE1)

Enzimas Colinesterasas: Blanco terapéutico para la Enfermedad de Alzheimer

La AChE es una enzima del grupo de las hidrolasas (EC. 3.1.1.7) que está presente principalmente en los vertebrados, incluyendo a los seres humanos, así como también en invertebrados, como los insectos. Está localizada en el sistema nervioso y los músculos, y es la responsable de la regulación de la concentración de ACh, neurotransmisor involucrado en la sinapsis colinérgica en el sistema nervioso, permitiendo la transmisión de la señal nerviosa en el sistema nervioso central y periférico.(38)

La acetilcolinesterasa (AChE) obtenida de la anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*) ha sido caracterizada en cuanto a su estructura, y se ha encontrado que esta presenta varias zonas que participan en la hidrólisis de la ACh. El más importante es el sitio activo, también conocido como “sitio esterático”, que está constituido por tres residuos aminoacídicos: Ser 200, His 440 y Glu 327 (Figura 4). La orientación que adquiere el neurotransmisor en el proceso de hidrólisis se debe al subsitio aniónico, dado por los residuos de Trp 84, Tyr 121 y Phe330. Esta orientación facilita la hidrólisis de la ACh en colina y acetato. Adicionalmente, esta enzima posee otros dos sitios que son importantes en la interacción del neurotransmisor con el sitio activo de la enzima, la cavidad aromática y el sitio periférico aniónico (Figura 5). La cavidad aromática abarca una gran cantidad de residuos aromáticos encargados de las interacciones π - catión de la parte del amonio cuaternario de la ACh y estos residuos aromáticos del sitio activo. El sitio periférico aniónico aísla la cavidad aromática de la superficie externa de la enzima, además participa en funciones no catalíticas, como la adhesión a membranas, la diferenciación de células, etc. (39)

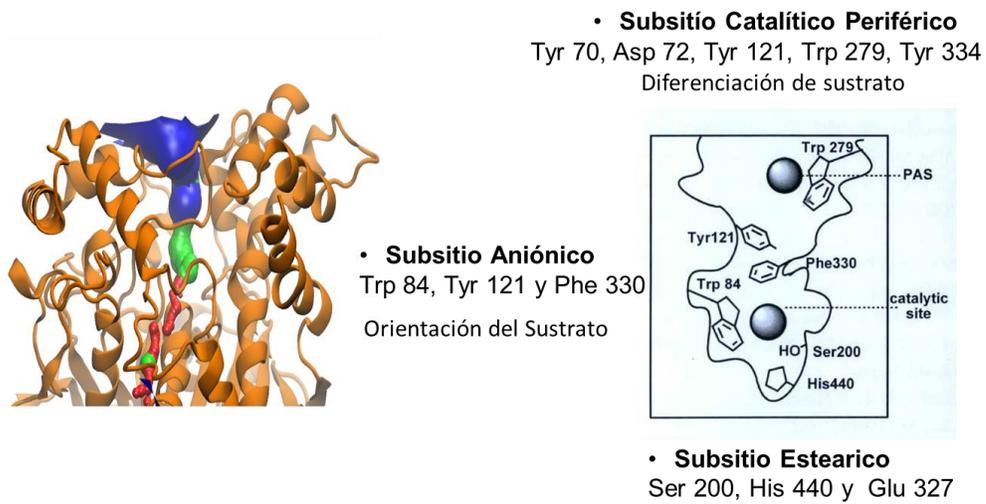


Figura 4: Diferentes subsítios presentes en la cavidad del sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa.

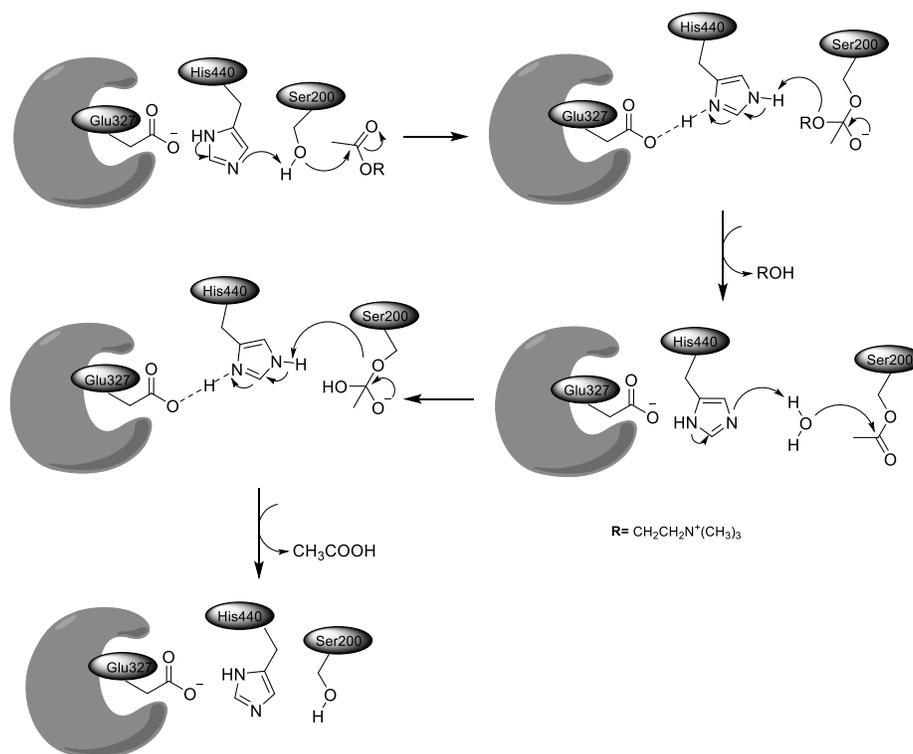


Figura 5: Disposición de la acetilcolina en el sitio activo de la enzima, en donde ocurre la hidrólisis del neurotransmisor. Elaborado a partir de ChemDraw drawing

Los inhibidores de AChE (AChEI) envuelven a un gran número de compuestos con estructuras muy variadas, que alteran la sinapsis colinérgica.(40) Estos compuestos interactúan de maneras diferentes con la cavidad del sitio activo de la enzima, y en función de ellos se clasifican en tres grupos(41):

- **Compuestos que interactúan con el sitio activo:** La interacción de este tipo de inhibidores se da con la tríada presente en el sitio activo, principalmente con el residuo serina, mediante la formación de ésteres estables que inactivan el sitio activo. Esta característica es común en compuestos usados como toxinas, pesticidas y agentes nerviosos, por ejemplo, las armas químicas. No obstante, en algunos casos también son usados como medicamentos, los cuales suelen ser carbamatos y organofosforado(42). En general estos compuestos son nocivos, tóxicos inclusive fatales por la formación de uniones covalentes con la serina, ocasionando pérdida parcial o completa de la actividad enzimática. Un ejemplo atípico de este grupo es la galantamina(**Figura 5**), aislada de la planta denominada gota de nieve (*Galanthus woronowii*, Amaryllidaceae)(42, 43), la cual interactúa no sólo con el sitio activo sino también con la cavidad aromática, de manera reversible, por lo que es usada como medicamento en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. (41)
- **Compuestos que interactúan con la cavidad aromática:** En general este tipo de compuestos interactúan también con el sitio activo. No obstante la cavidad aromática no es un blanco terapéutico para inhibidores de colinesterasas; sin embargo, compuestos como la galantamina y el decametonio (obtenido por síntesis) (Figura 6) presentan interacciones con esta cavidad y son usados como medicamentos,(41) este último como agente anestésico para inducir parálisis muscular.(44)

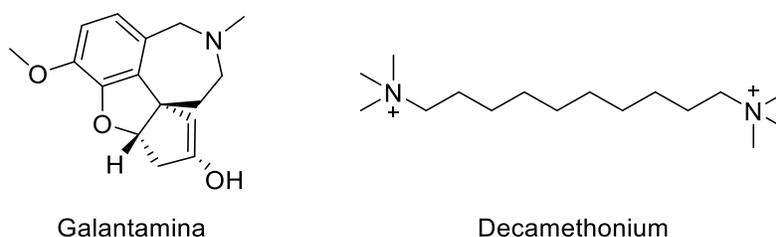


Figura 6: Inhibidores Colinérgicos que interactúan con la cavidad aromática de la enzima acetilcolinesterasa. Elaborado con ChemDraw drawing

- Compuestos que interactúan con el subsitio periférico aniónico:** Es uno de los principales blancos que se estudian para la búsqueda y diseño de medicamentos contra la EA, debido a que la formación de placas amiloides en las redes neuronales (una de las características de la EA) puede ser aceleradas por la interacción con el subsitio periférico aniónico. Así, si un compuesto interactúa con este sitio aniónico, las placas amiloides no interactuarían con él. No obstante, la formación de estas placas es sólo una de las posibles causas de la enfermedad, ya que el cuadro patológico de la EA es muy complejo y aún no se entiende del todo, por lo que esta aproximación no se podría considerar como una cura. Entre los compuestos AChEI que interactúan con este subsitio se destacan la huperzina A (aislada de *Huperzia serrata*(45)) y el donepezil (Figura 7) (como mezcla racémica), que son comercializados para el tratamiento de la AD, siendo la primera además de muy potente como inhibidora de la AChE una molécula segura pues presenta pocos efectos secundarios **Figura 6**, a diferencia de los otros inhibidores de AChE.(39)

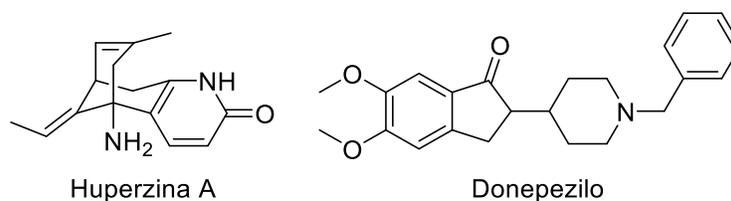


Figura 7:Ejemplo de compuestos que interactúan con el subsitio periférico aniónico. Elaborado con ChemDraw drawing.

Las quinolinas y sus derivados reducidos, Tetrahydroquinolinas (THQ), son heterociclos aromáticos, compuestos por un anillo bencénico y uno de piridina. Los compuestos quinolínicos son reconocidos por diversas actividades biológicas, por lo tanto, se le asocian aplicaciones industriales y en la química medicinal. Los compuestos quinolínicos en el ámbito medicinal, tienen diversas propiedades farmacológicas puesto que actúan frente a diferentes blancos terapéuticos, tales como: antiparasitarios contra *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria(46), anticancerígeno, por ejemplo frente a cáncer de mama(47), anti-bacterianos(48), anti-fúngicos (49)y anti-Leishmania(50), entre otras.

Las Quinolinas y THQs comúnmente son encontradas en productos naturales. Uno de los primeros hitos dentro de la química y la medicina fue el aislamiento de Quinina y su exitoso tratamiento contra la malaria en el siglo XVII(51). Otros ejemplos de quinolinas naturales son las que se obtienen de la familia de plantas Rutaceae, específicamente de sus especies *Zanthoxylum wutaiense* y *Lunasia amara*, las que podrían ser posibles tratamientos para tuberculosis.(52).

El núcleo de las THQs, ya sean sintéticas o naturales, ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades en la química medicinal. Diversas THQs han sido encontradas con función sobre targets en los que actúan las terapias antirretrovirales contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), como por ejemplo actúan como inhibidores alostéricos en la Transcriptasa Reversa del virus (53) y según otros reportes derivados de THQs actúan como antagonistas de CXCR4, proteína correceptora del virus VIH ubicada en la membrana de células, como los Linfocitos T CD4+(54). Otras actividades mostradas en trabajos de síntesis de THQs, muestran que estas, agregándole residuos tipo sulfonamidas, claramente tienen una significativa actividad anticancerígena, actuando sobre la enzima anhidrasa carbónica, enzima importante en la regulación del cáncer, pues si se inhibe se reducen los

niveles de bicarbonato intracelular y no hay producción de nuevos nucleótidos para sintetizar ADN y de algunos lípidos de membrana para las nuevas células cancerígenas(55).

Algunas THQs obtenidas sintéticamente han mostrado actividad inhibidora de enzimas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas como es el caso colinesterasas involucradas en la EA (56) Las THQs pueden ser consideradas moléculas de múltiples funciones y usos farmacológicos ya que han mostrado actividad captadora de radicales libres lo cual disminuye el estrés oxidativo involucrado en gran parte de las patologías que afectan a la humanidad.(57)

Obtención de quinolinas y tetrahydroquinolinas

Origen natural

Las Quinolinas y THQs comúnmente son encontradas en productos naturales. Uno de los primeros hitos dentro de la química y la medicina fue el aislamiento de Quinina y su exitoso tratamiento contra la malaria en el siglo XVII(51). Otros ejemplos de quinolinas naturales son las que se obtienen de la familia de plantas Rutaceae, específicamente de sus especies *Zanthoxylum wutaiense* y *Lunasia amara*, las que podrían ser posibles tratamientos para tuberculosis.(52). Aparte de las antes mencionadas, durante los últimos años se han aislado varios de estos compuestos a partir de diversas fuentes naturales, de los que se han obtenido varios esqueletos de quinolina que sirven de base para sintetizar compuestos que han demostrado un prometedor potencial farmacológico, convirtiéndose, algunos de ellos, tratamientos de algunas patologías para las cuales presentan un gran rendimiento, dentro de estos se pueden mencionar algunas como las que se muestran en la **Tabla 2**

Tabla 2: Quinolinas y/o compuestos derivados de ellas, de origen natural, que han demostrado tener un buen potencial farmacológico. Tomado y adaptado de Matada y col (58)

Compuesto	Origen	Aplicación farmacológica
Criptoleptina	<i>Cryptolepis sp.</i>	Antipalúdico Citotóxico: intercalador de ADN
Camptotecina	<i>Camptotheca acuminata</i>	Anticancerígeno (inhibición de la topoisomerasa)
Alcaloides de Cinchona	<i>Cinchona sp.</i>	Dependiendo del tipo de compuesto tiene diferentes funciones. La más conocida es la quinina, tratamiento de primera elección para varias enfermedades parasitarias.
Berbina	<i>Berberis aristata</i>	Actividad antimicrobiana contra <i>Helicobacter pylori</i> resistente a los medicamentos aislado de pacientes con ERGE del norte de la India.
Graveolina 4-methoxy-2-fenilquinolina kokusagina	<i>Juncea amara</i>	Actividad antimicrobiana significativa contra <i>M. tuberculosis</i> .
Dictanina γ-fagarina	<i>Zanthoxylum wutaiense</i>	Actividad antituberculosa moderada.
Queleritrina Quelidonina	<i>Chelidonium majus</i>	Actividad antimicrobiana y una fuerte actividad antifúngica contra <i>C. Albicans</i> .
Vasicina Vasicinona	<i>Peganum harmala</i>	Actividad broncodilatadora y antianafiláctica
Equinopsina equinorina	<i>Echinops albicaulis</i>	Actividad antioxidante significativa.

Origen sintético

Durante el desarrollo de la síntesis orgánica han aparecido un sinnúmero de estrategias para la obtención de compuestos quinolínicos debido a su gran interés farmacológico. Un método clásico muy utilizado ha sido la reacción de Friedländer que data del 1882 y aún es ampliamente empleada, la cual consiste en la condensación de orto-aminoaril aldehídos o cetonas y una cetona con un grupo α -metileno en presencia de una base(59). De igual forma la reacción de Pfitzinger y la reacción de Niementowski se relacionan directamente con la síntesis de Friedländer, obteniendo ácido 4-quinolincarboxílico y 4-hidroxiquinolina respectivamente. (Figura 8)

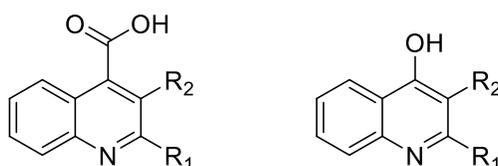


Figura 8: Productos de la reacción de Pfitzinger y la reacción de Niementowski. Elaborado con ChemDraw drawing.

Otro de los métodos clásicos para la preparación de quinolinas es la síntesis de Skraup la cual consiste en el calentamiento de anilinas en presencia de ácido sulfúrico y glicerol, así como también un agente oxidante. Esta reacción debe ser realizada con mucho cuidado debido a que tiende a ser violenta (60).

Una estrategia también muy utilizada que conlleva a una condensación intramolecular catalizada en medio básico de acilaminoacetofenonas para obtener hidroxiquinolinas es la reacción de Camps. Esta reacción ofrece la opción de adicionar una alta variedad de

sustituyentes por la cual se pueden obtener múltiples compuestos con diversidad estructural. (Figura 9)

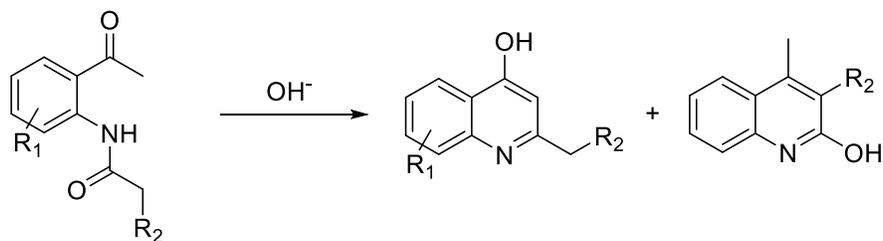


Figura 9: esquema general de síntesis de Camps. Elaborado a partir de ChemDraw drawing.

Por medio de una reducción de los compuestos obtenidos a partir de los procedimientos antes mencionados se obtienen los análogos THQs. (Figura 10)

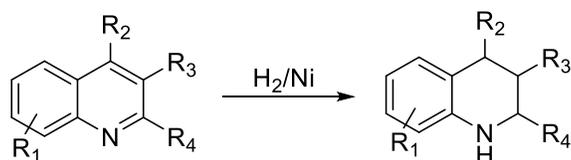


Figura 10: Esquema general de reducción de quinolinas a THQs por hidrogenación catalítica. Elaborado con ChemDraw drawing.

A su vez las THQs también pueden ser obtenidas por métodos directos, ya sean rearrreglos estructurales, reacciones de condensación intramoleculares o una de las más populares, reacciones tricomponentes, las cuales son un proceso en el que tres o más precursores reaccionan a través de un mecanismo unificado formando un producto final(61). Dentro de las reacciones tricomponentes podemos encontrar la reacción Aza Diels-Alder también conocida como imino Diels-Alder o reacción de Povarov, haciendo honor a su artífice (REF). La reacción de Povarov involucra la condensación de aldehídos, anilinas y alquenos ricos en electrones generando así el esqueleto de THQ con amplios puntos de

diversificación estructural. Esta reacción envuelve una cicloadición tipo Diels-Alder ($4\pi + 2\pi$), y como se incluye un heteroátomo, en este caso nitrógeno, se denomina aza o imino Diels-Alder (iDA). (62)

Propiedad antioxidante de Heterociclos de Tetrahydroquinolinas

La capacidad antioxidante o antirradical se puede manifestar de diferentes maneras, al unir radicales para formar compuestos más estables o al quelatar metales redox activos en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, o como una capacidad de afectar las enzimas antioxidantes.(63)

Como las quinolinas y sus derivados THQs han tenido un papel importante en el desarrollo farmacológico, como se ha mencionado anteriormente, se han estudiado múltiples propiedades y/o efectos una de gran importancia es la capacidad antioxidante, donde varios estudios han demostrado una capacidad de captura de radicales, evidenciando que esta capacidad puede aumentar o disminuir dependiendo del patrón de sustitución de los heterociclos. (63-65)

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO

“Tetrahydroquinolinas de origen sintético muestran actividad biológica frente a blancos terapéuticos involucrados en la enfermedad de Alzheimer lo que se puede demostrar mediante estudios *in vitro* e *in silico*.

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar una serie de tetrahydroquinolinas sintéticas, ya sintetizadas, con diferente patrón de sustitución y evaluar su posible acción como agentes inhibidores acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), su potencial farmacológico y su poder antioxidante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar *in vitro* las Tetrahydroquinolinas como inhibidores de colinesterasas (acetil y butiril)
2. Evaluar el potencial *in vitro* antioxidante de las Tetrahydroquinolinas de origen sintético (DPPH, ABTS)
3. Evaluar *in silico* las propiedades ADME de las Tetrahydroquinolinas sintéticas (Osiris y Molinspiration,).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Moléculas a evaluar

Las moléculas que serán evaluadas en este estudio son compuestos que ya se han sintetizado y purificado previamente en el marco del proyecto FONDECYT 1200531. Las estructuras fueron dibujadas en el programa CHEMDRAW Professional, desde donde se obtuvo en nombre según las reglas IUPAC de nomenclatura de compuestos orgánicos, así como la información en relación con su fórmula molecular, masa exacta, masa molecular, patrón de fragmentación de masa y análisis elemental.

Inhibición enzimática

La capacidad de inhibir las enzimas colinesterasas se fundamenta en un método colorimétrico modificado del usado por Ellman et al., (1961)(66) el cual se basa en el incremento de color producido por la tiocolina, procedente de la hidrólisis de la acetilcolina, cuando esta reacciona con el ión ditiobisnitrobenzoato para formar el anión del ácido tiobisnitrobenzónico que es de color amarillo, por lo tanto si la enzima es inhibida se ve una disminución en la coloración amarilla respecto del control, el cual es cuantificable espectrofotométricamente.(Figura 11)

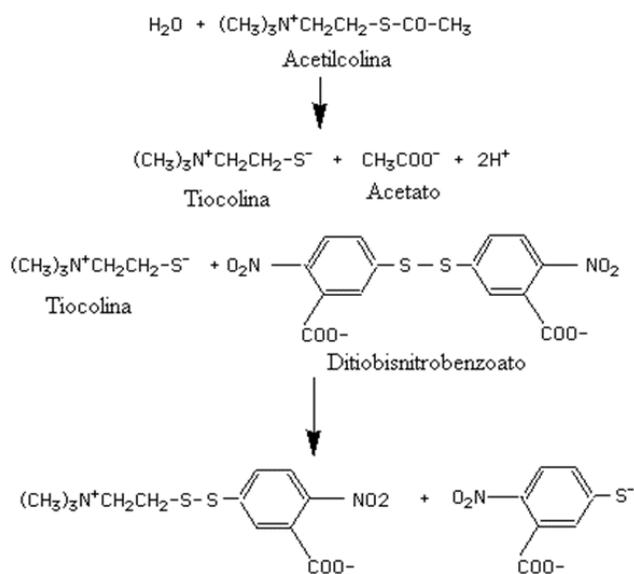


Figura 11: Reacción química de la inhibición de colinesterasa por colorimetría. Elaborado con ChemDraw

El ensayo para medir la actividad inhibitoria de las enzima colinesterasas (AChE/BuChE) de los compuestos sintetizados es adaptado del método descrito por Ellman en 1961 y adaptado a placas de 96 pocillos.(67) La actividad enzimática se determina mediante la lectura espectrofométrica a 405 nm de la mezcla realizada entre la muestra (diluciones seriadas en tampón PBS), enzima AChE/BuChE (0,25 U/mL en tampón fosfato) y PBS (8 mM K₂HPO₄, 2,3 mM NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,6). La microplaca es incubada por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se añade a cada pocillo una solución de sustrato (0,04 M NaH₂PO₄ x H₂O, 0,2 mM Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), 0,24 mM Ioduro de acetilcolina/Ioduro de butirilcolina en agua destilada, pH 7,5). Los compuestos serán evaluados a partir de 500 µg/mL. Los resultados se reportan en tablas mostrando el porcentaje de inhibición y se comparan con el inhibidor de referencia . Como inhibidor de referencia se utilizará el alcaloide galantamina. El protocolo de trabajo con los respectivos volúmenes a utilizar se describen en la tabla 3

Tabla 3 Protocolo del ensayo de microdilución para determinar actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE/BuChE). El volumen final de cada pocillo será de 200 µL.

Reactivo	Muestra	Blanco de Muestra	Control	Blanco
PBS	-	50µl	50µl	100µl
Compuesto	50µl	50µl	-	-
Enzima	50µl	-	50µl	-
Incubación 30 minutos a T° ambiente				
Sustrato	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubación 3-5 minutos a T° ambiente				
Lectura de Absorbancia a 405 nm				

Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de las THQs sintéticas se determinó mediante lecturas espectrofotométricas midiendo la capacidad de cada compuesto para atrapar el radical libre dado (DPPH, ABTS), en cada caso las muestras se llevaron en duplicado y para cada gradilla procesada se preparó un control.

Atrapamiento del radical DPPH

La técnica del atrapamiento del radical DPPH se determinó espectrofotométricamente evaluando la capacidad que presenta cada compuesto sintetizado para decolorar una solución metanólica de radical libre 1,1-difenil-2-picril hidracil (DPPH•, C₁₈H₁₂N₅O₆), que en su forma radical tiene color púrpura con una absorbancia máxima de 517 nm (Figura 12). Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical, se produce la forma reducida DPPH-H con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia. Este ensayo se realiza según el protocolo descrito por Brand-Williams et al., 1995, y Molyneux, 2004; 0,75 mL del muestra (en las concentraciones de 100, 50 y 10 µg/mL) disuelto en H₂O destilada se agrega a una solución metanólica de DPPH•(0.2mg/L) (1,5 mL), empleando como control una mezcla de agua y la solución radicalaria en iguales proporciones que las muestras a evaluar. (68, 69)

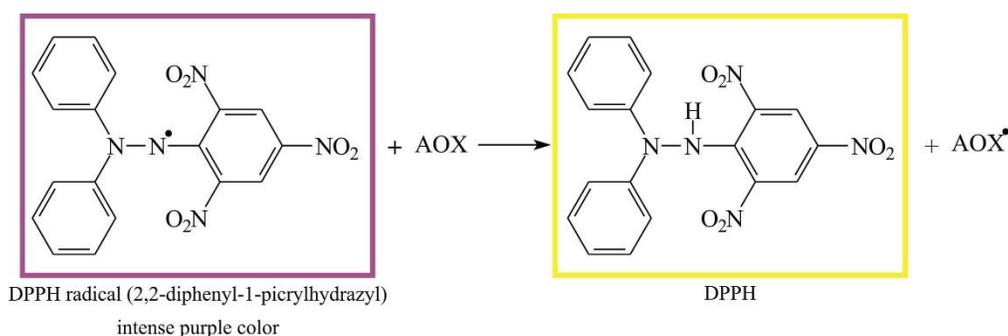


Figura 12: Reacción de atrapamiento del radical DPPH. Tomada y adaptada de de BECKER, Magda M. y col. 2019(1)

Luego de realizar las mezclas de reacción, se deja incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La absorbancia de la solución del radical estable en presencia de la muestra (Am) es medida en un espectrofotómetro a 517 nm. Los porcentajes de inhibición (PI) de la absorción del DPPH• producidos por las muestras son calculados en relación con la absorbancia de la muestra blanco (Ab, con H₂O destilada) usando la siguiente ecuación (Figura 13):

$$= \left[\frac{1 - (\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco muestra})}{\text{Abs control}} \right] \times 100$$

Figura 13: Fórmula para expresar el porcentaje de atrapamiento o decoloración. elaboración propia

La CI₅₀ es calculada mediante curvas dosis respuesta a partir de los valores de % de decoloración obtenidos.

Para cada muestra a ensayar es necesario llevar un blanco que permita restar la coloración de la muestra si la presentase, el protocolo se resume en la Tabla 3.

Tabla 3: Protocolo de trabajo con Volúmenes expresados en mL, volumen final del ensayo 2.25 mL.

	Muestra (mL)	Blanco Muestra (mL)	Control(mL)
Muestra	0.75	0.75	-
DPPH	1.5	-	1.5
Agua destilada	-	-	0.75
Metanol	-	1.5	-

Atrapamiento del radical ABTS

1. Preparación del Radical ABTS

En primer lugar, se preparó la solución del radical ABTS, mezclando 77,6 mg de ABTS⁺⁺ 20ml de agua destilada y 13,2 mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈). Esta mezcla se incubó de 12 a 16 horas en oscuridad, cubierta con papel aluminio, a temperatura ambiente. (70)

Una vez terminada la incubación se procedió a diluir la muestra en etanol hasta que la solución resultante tuviese una absorbancia aproximada de 0,7 a una longitud de onda de 732 nm.

2. Cuantificación del porcentaje de atrapamiento.

Para la preparación de cada una de las muestras en estudio, se pesaron 3mg de cada una de ellas y se completó a un volumen final de 1ml, obteniéndose una concentración final de 300mg /ml para cada una de las muestras.

Una vez realizado el pesaje y la posterior dilución se procedió a calcular el volumen necesario de cada una de las soluciones, para llegar a las concentraciones de 100, 10 y 50 mg/ml, teniendo como volumen final del tubo 3 ml.

Se procesaron las muestras en duplicado donde se tenía un tubo para cada una de las concentraciones que se nombraron anteriormente, además se trabajó con un blanco de muestra para cada uno de ellos. A cada uno de los tubos se les agregó la muestra en estudio, se completó con una solución de etanol-agua 1:1 hasta completar un volumen de muestra de 0,1ml, luego se adicionaron 2ml de la solución Radical ABTS (exceptuando los blancos). Para cada gradilla se trabajó un control el cual no contenía la muestra. El detalle de los volúmenes se puede ver en la Tabla 4

Tabla 4: protocolo de trabajo para determinar el porcentaje de atrapamiento del radical ABTS, con un volumen final de 3ml. este protocolo se aplicó en duplicado para cada una de las muestras descritas en la **Tabla 5** y se midió su absorbancia a 732 nm

	Muestra (mL)	Blanco Muestra (mL)	Control(mL)
Muestra	1	1	-
ABTS	2	-	2
Mezcla Etanol-Agua 1:1	-	2	1

Una vez completados los volúmenes, se incubó cada una de las gradillas a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad y luego se procedió a medir la absorbancia a 732nm. La Figura 14 muestra la reacción de atrapamiento del radical y el cambio de color que debiera observarse en una reacción positiva.

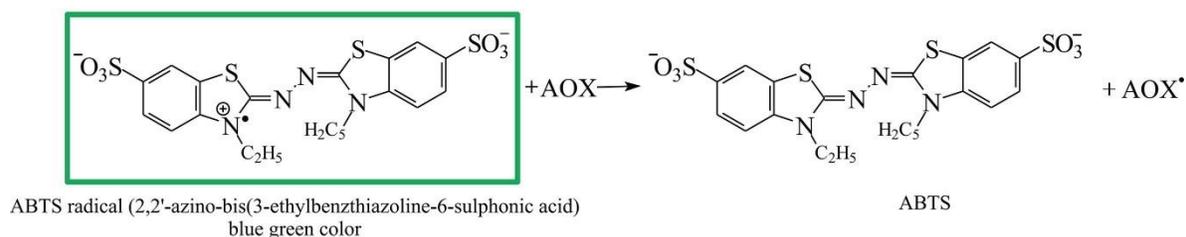


Figura 14: reacción de atrapamiento del radical ABTS, indicando el color original y el que se debería tornar en caso de un correcto atrapamiento. Tomada y adaptada de de BECKER, Magda M. y col. 2019(1)

Las tablas obtenidas se hicieron mediante el programa Microsoft Excel, y lo gráficos fueron creados con el programa Graphpad Prism.

Análisis in Silico

Reglas de Lipinski y Veber en el diseño de los compuestos con actividad biológica.

La regla de los 5 (regla de Lipinski), junto con las reglas de Veber son de las más utilizadas para el diseño racional de nuevas moléculas, así como su predicción para una buena permeabilidad celular y por ende una absorción adecuada, ya que mantienen los compuestos propiedades estructurales similares a fármacos. Para la regla de Lipinski y Veber, la molécula no debe presentar más de dos violaciones a los siguientes criterios, ya que podrían tener problemas de absorción, permeabilidad y biodisponibilidad, estas reglas son:

Regla de Lipinski (71)

- Peso molecular inferior a 500 g/mol.
- Número de donadores de puentes de hidrógeno menor a 5, expresado sobre la misma molécula.
- Número de aceptores de puentes de hidrógeno menor a 10 (2 X 5), expresado sobre la misma molécula.
- Coeficiente de partición (LogP) menor a 5.

Regla de Veber (72)

- ≤ 10 enlaces rotables (flexibilidad molecular).
- $\leq 140 \text{ \AA}^2$ de área polar superficial (APS).
- ≤ 12 puentes de hidrógenos totales (aceptores y donadores).

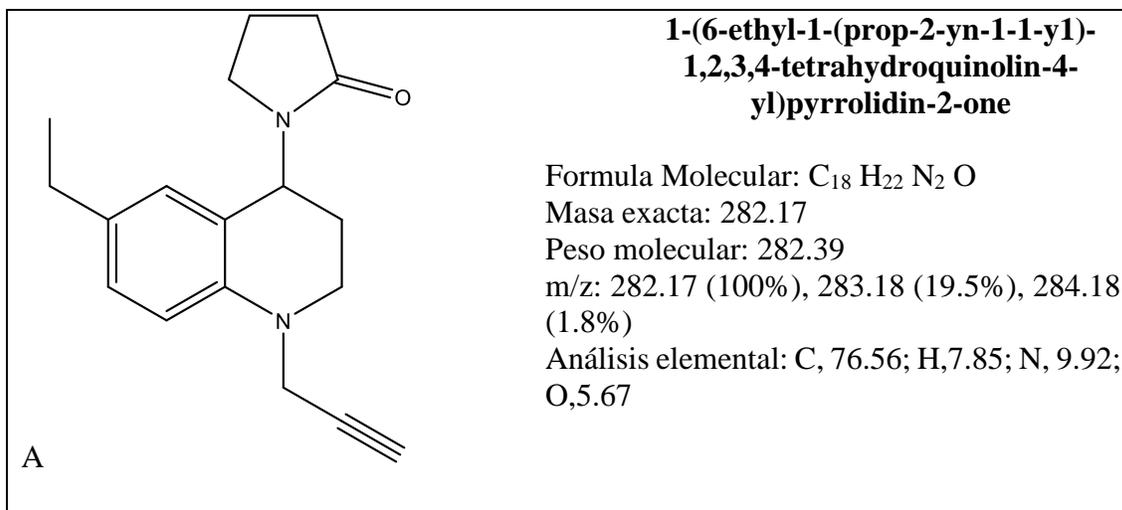
Para obtener esta información, se usó el servidor computacional Molinspiration Cheminformatics (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) que permite calcular las reglas antes mencionadas, así de igual forma indica el número de violaciones a dichas reglas, mientras que para determinar toxicidad de los compuestos se evalúa el servidor computacional Osiris (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>), ambos softwares disponibles de manera gratuita.

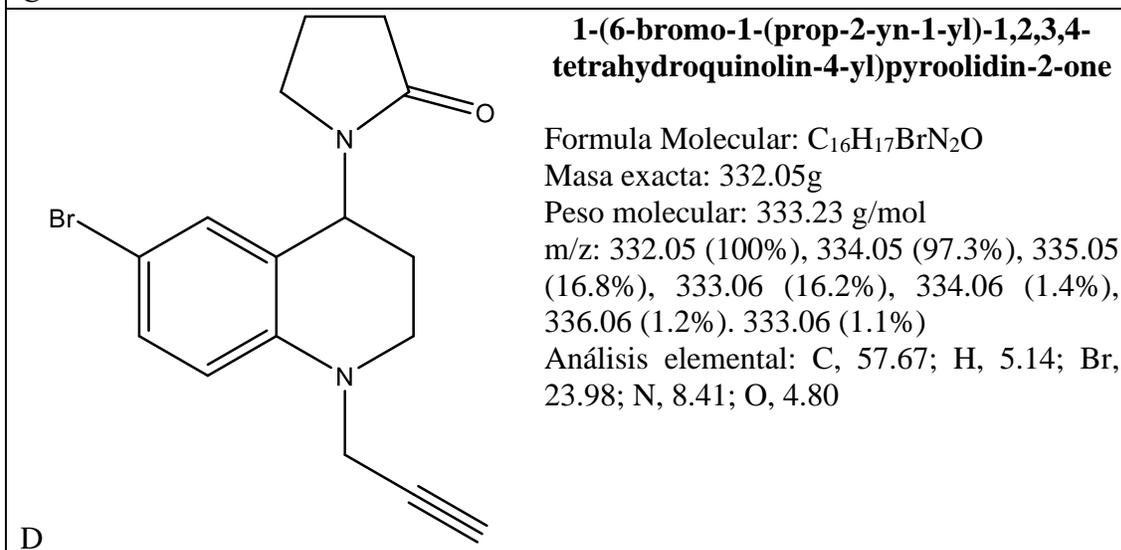
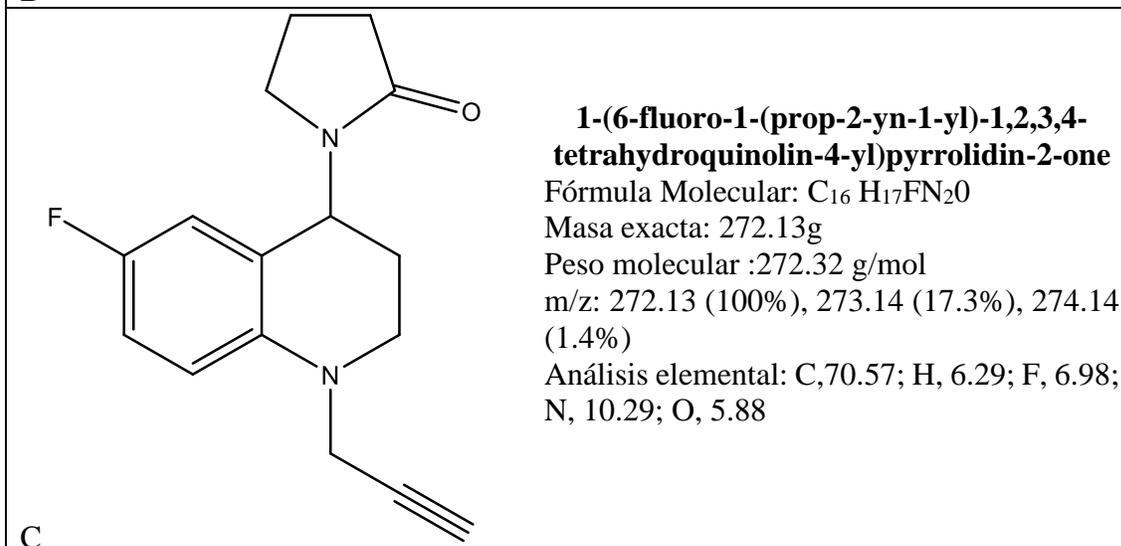
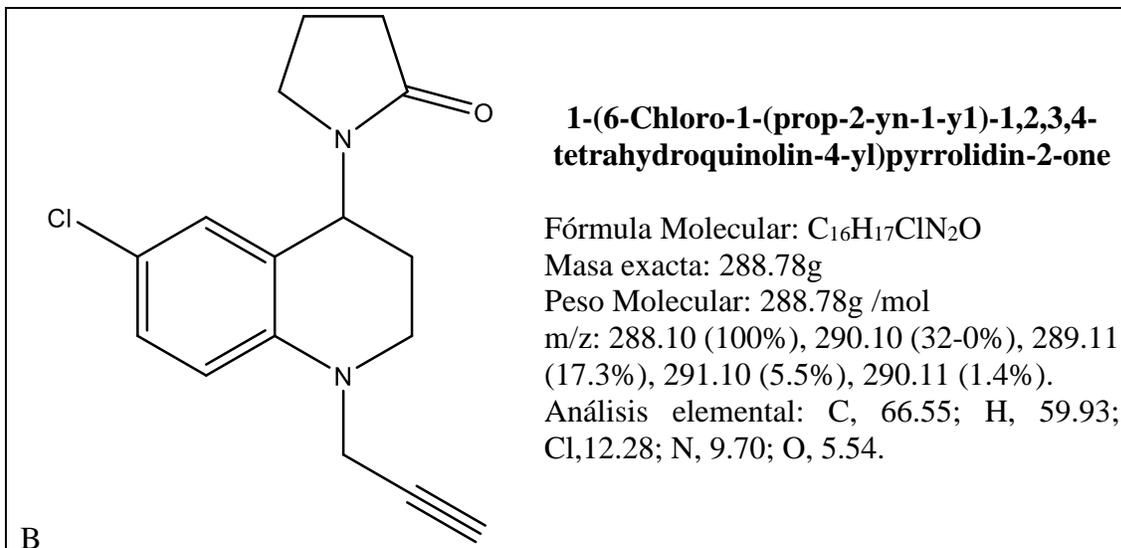
Los posibles target sobre los cuales pueden actuar los compuestos será determinado mediante la aplicación del software Swiss target prediction. (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) disponible de manera gratuita.

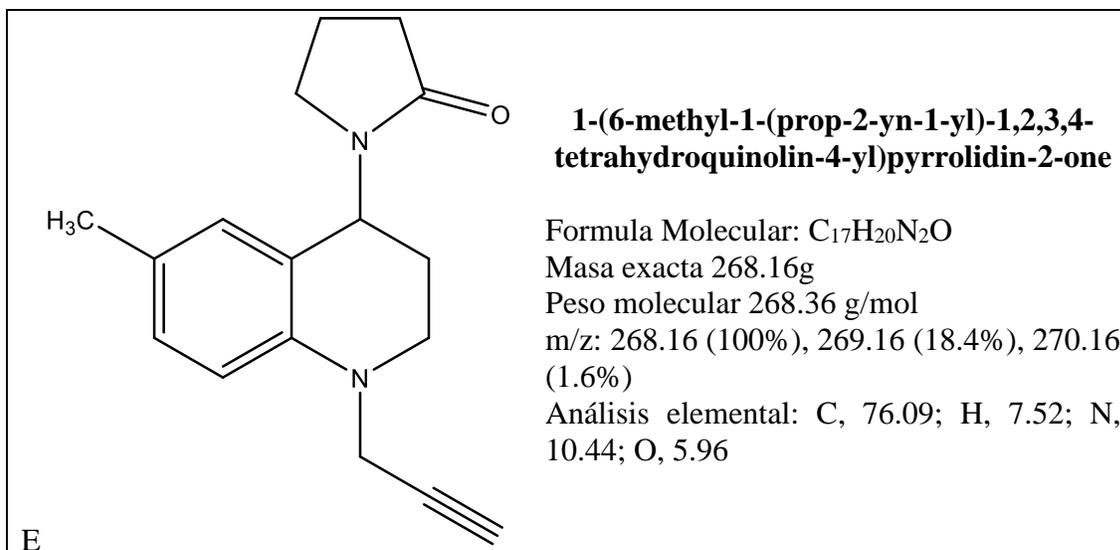
VI. RESULTADOS

Se trabajó con seis compuestos derivados de THQs con diferente patrón de sustitución obtenidos mediante síntesis orgánica en el marco del Proyecto FONDECYT 1200531. Los compuestos se muestran en la, donde se expone su estructura química y se incluyen algunas de sus características, considerando que la principal diferencia entre ellas es el sustituyente químico presente en el anillo aromático.

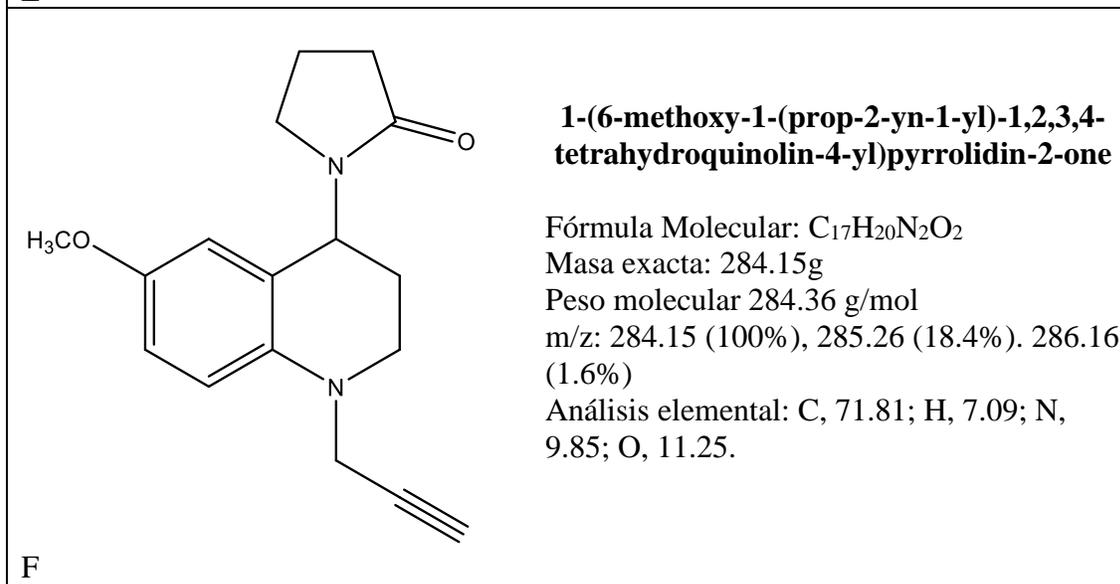
Tabla 5: Moléculas derivadas de THQS con diferente patrón de sustitución y sus respectivos nombres, fórmula química, estructura química y masa. sintetizadas en el marco del proyecto FONDECYT 1200531.







E



F

Determinación de la capacidad antioxidante

Porcentaje de atrapamiento del radical DPPH

Las muestras observadas en la tabla 3 se sometieron a los ensayos *in vitro*, descritos anteriormente, para medir el porcentaje de atrapamiento del radical DPPH, se midió la absorbancia de cada uno de los tubos a una longitud de onda de 517nm en el equipo Spectroquant[®] Pharo 300 y a partir de este dato se calculó el porcentaje de atrapamiento usando la fórmula que se ve en la figura 13, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 6 y Figura 15. Como referencia se utilizó ácido ascórbico, el cual presentó un valor de IC₅₀ de 1±0.3 µg/mL

Tabla 6: Porcentaje de atrapamiento del radical DPPH de las muestras analizadas, expresado en porcentaje (%)

Muestra	Concentración		
	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$
A	26.48 %	9.69%	3.74%
B	23.86 %	7.47%	5.66%
C	11.20 %	3.86%	0.00%
D	24.00 %	20.09%	0.59%
E	9.88 %	3.61%	0.00%
F	22.70 %	13.95%	6.26%

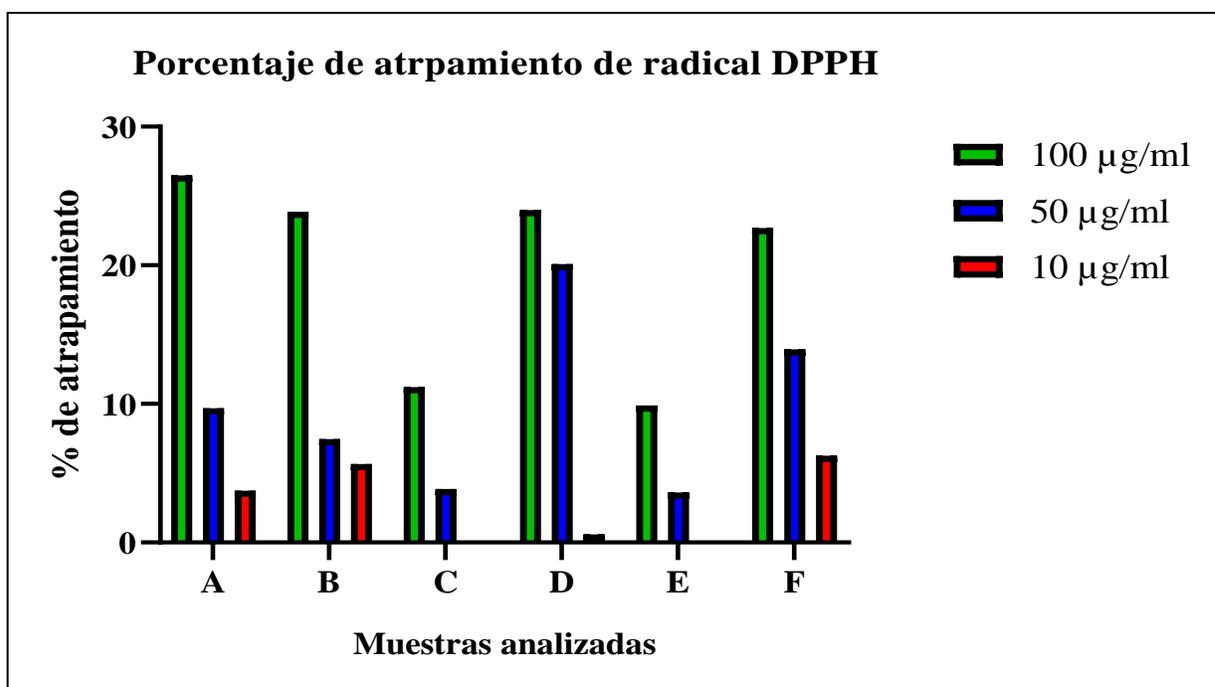


Figura 15: Porcentaje de atrapamiento del radical DPPH de cada uno de los compuestos analizados en las concentraciones de 100,50 y 10 $\mu\text{g/mL}$. La fórmula química y estructura de cada uno de los compuestos se detalla en la tabla 3

Atrapamiento de Radical ABTS

Para medir el porcentaje de atrapamiento del radical ABTS, las muestras fueron trabajadas en duplicado, con la metodología descrita anteriormente, y luego se midió su absorbancia a 732 nm. Y se calculó el porcentaje según lo descrito en la metodología. Como compuesto de referencia se utilizó ácido ascórbico, el cual presentó un valor de IC₅₀ de 35±2.7µg/mL

Tabla 7: Porcentaje de atrapamiento del radical ABTS de las muestras analizadas, expresado en porcentaje (%)

Muestra	Concentración		
	100 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL
A	100.00	100.00	100.00
B	53.22	39.01	23.88
C	96.61	91.49	82.73
D	89.26	81.57	64.21
E	95.77	95.12	99.35
F	100.00	100.00	100.00

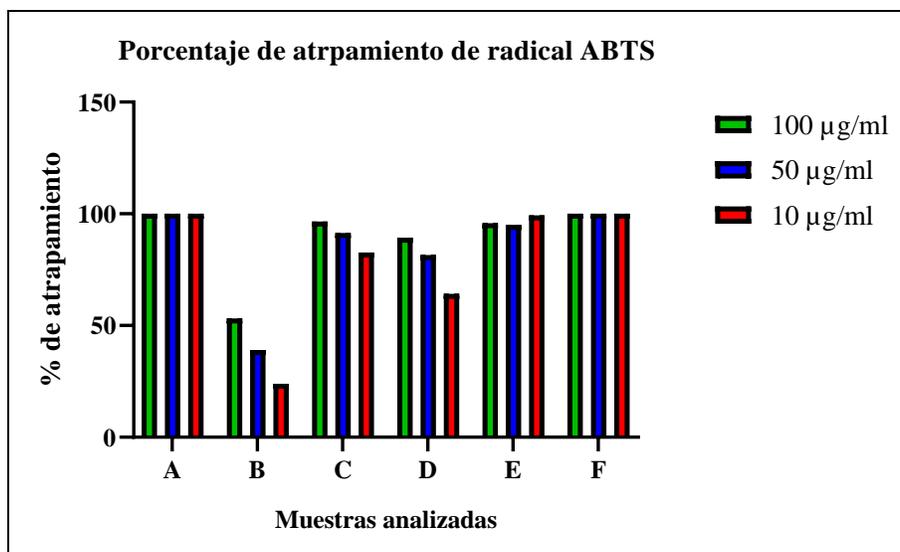


Figura 16: Porcentaje de atrapamiento del radical ABTS de cada uno de los compuestos analizados en las concentraciones de 100, 50 y 10 µg/mL. La fórmula química y estructura de cada uno de los compuestos se detalla en la tabla 3.

Capacidad Inhibitoria de la enzima Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa

Para medir la capacidad de los compuestos se determinó el IC_{50} según la metodología descrita anteriormente, además se calculó un índice de selectividad para poder determinar la afinidad del compuesto para cada una de las enzimas estudiadas. Como compuesto de referencia se utilizó el alcaloide aprobado por la FDA como fármaco contra el Alzheimer, galantamina, quien presenta valores de IC_{50} de $0.54 \pm 0.07 \mu M$ sobre AChE y $8.80 \pm 0.5 \mu M$ sobre BuChE, lo que da un índice de selectividad de 16.29. Los compuestos fueron ordenados según la letra que se le asignó en la Tabla 5. Los valores de IC_{50} , expresado en μM , sobre cada enzima se presentan en la

Compuesto	IC_{50} AChE (μM)	IC_{50} BuChE (μM)	Índice de selectividad
-----------	----------------------------	-----------------------------	------------------------

A	-----	5,20	Indeterminado
B	1,70	29,82	0,06
C	11,64	0,44	26,42
D	59,60	94,89	0,63
E	46,06	27,28	1,69
F	90,66	112,57	0,81

Tabla 8

Tabla 8: Concentración necesaria para lograr el 50% de inhibición enzimática, calculados en base a estudios de inhibición de la actividad enzimática *in vitro*, para después obtener dicha concentración expresada en μM .

Compuesto	IC₅₀ AChE (μM)	IC₅₀ BuChE (μM)	Índice de selectividad
A	-----	5,20	Indeterminado
B	1,70	29,82	0,06
C	11,64	0,44	26,42
D	59,60	94,89	0,63
E	46,06	27,28	1,69
F	90,66	112,57	0,81

Propiedades Farmacológicas

En la Tabla 9 se muestran los resultados del análisis de propiedades farmacológicas *in silico* obtenidas por las herramientas web descritas en los materiales y métodos, las letras de cada uno de los compuestos corresponden a las mismas asignadas en la Tabla 5

Tabla 9: Análisis de las propiedades farmacológicas (ADME) de cada uno de los compuestos descritos previamente.

<i>Compuesto</i>	Log P	Peso molecular (g/mol)	TPSA (Å²)	n-ON aceptores	n-OH/NH Donantes	Volumen	Número de violaciones (reglas de Lipinsky)
<i>A</i>	3.06	272.39	23.55	3	0	274.47	0
<i>B</i>	2.65	288.78	23.55	3	0	260.34	0
<i>C</i>	2.13	272.32	23.55	3	0	251.74	0
<i>D</i>	2.78	333.23	23.55	3	0	264.69	0
<i>E</i>	2.42	268.36	23.55	3	0	263.37	0
<i>F</i>	2.03	284.36	32.78	4	0	272.35	0

Toxicidad

Mediante ensayos *in silico* en el software Osiris, se determinaron diferentes características de posible toxicidad de los compuestos al ser usados como fármacos. Al analizar cada uno de los compuestos, se confirmó que ninguno presentó toxicidad en los siguientes parámetros: Mutagenicidad, tumorigenicidad, irritación, efectos en la reproducción. **Figura 17**

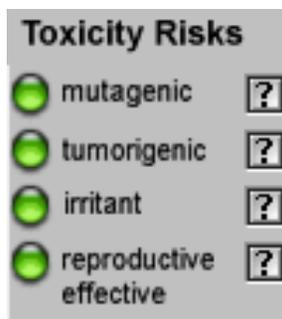


Figura 17: indicadores de toxicidad del software Osiris, los indicadores dieron el mismo resultado para cada uno de los compuestos analizados.

VII. DISCUSIÓN

La propiedad antioxidante de los compuestos analizados radica en la capacidad que tuvieron los compuestos para atrapar los radicales DPPH y ABTS. Como se observa en la **Tabla 6**, todos los compuestos tuvieron algún grado de atrapamiento del radical DPPH, sin embargo, ninguno logró igualar o superar el nivel de atrapamiento del compuesto de referencia en este caso el ácido ascórbico. Por otra parte, al realizar la evaluación de la capacidad de atrapamiento del radical ABTS se obtuvieron resultados mucho mejores, ya que la totalidad de los compuestos logró un porcentaje de atrapamiento mayor al 50 % **Tabla 7:** Porcentaje de atrapamiento del radical ABTS de las muestras analizadas, expresado en porcentaje (%) al analizar estos resultados se puede apreciar que dentro todos los compuestos estudiados, los que presentaron una mayor capacidad antioxidante son los compuestos A,C, E y F, ya que su porcentaje de atrapamiento en general fue por sobre el 80% en todas las concentraciones estudiadas, superando con creces al compuesto de antioxidante de referencia que es el ácido ascórbico, cuyo IC50 es de $35 \pm 2.7 \mu\text{g/mL}$.

La actividad antioxidante de estos heterociclos se ve fuertemente afectada por la presencia de grupos dadores de electrones, necesarios para reaccionar con el radical y la presencia de elementos aceptores de electrones como el Bromo o el Flúor (73), además de su fracción propargilo ya que diversos derivados de amina con el fragmento de propargilo en su

estructura son compuestos versátiles con aplicaciones farmacológicas y farmacéuticas demostradas como agentes antioxidante(65)

Respecto a la diferencia de en los resultados de capacidad antioxidante, se ve una capacidad de atrapamiento mucho mayor en todos los compuestos para el radical ABTS, dentro de las explicaciones que se le buscó dar a esta diferencia, se puede intuir que puede deberse al método de fabricación del radical en solución previo al experimento, ya que puede ser que la sustancia preparada para realizar los experimento no contenga al radical formado en su totalidad. Estos resultados se relacionan con los obtenidos en estudios previos donde se demuestra que donde los compuestos que tienen un grupo atractor de electrones como el flúor, y los grupos donantes de electrones, como el metoxi en los anillos de fenilo, exhiben una buena actividad antioxidante, como es el caso de los compuestos estudiados(65, 74, 75)

En el caso de la inhibición de las colinesterasas se observa que, si bien todas los compuestos analizados presentaron un grado de inhibición, el que más destaque es el compuesto C, el cual tiene un sustituyente Flúor, si bien al compararla con la referencia, que en este caso se usó galantamina, no se observa un grado de inhibición tan significativo. También se debe destacar que, al medir la selectividad de estos compuestos, en general se obtuvo que la mayoría tenía una mayor selectividad por la enzima Acetilcolinesterasa por sobre Butirilcolinesterasa, lo que sería esperado ya que este es el principal blanco de los medicamentos anti- Alzheimer. Resultados similares a estos se han obtenido en estudios previos donde se evalúan heterociclos como inhibidores de la AchE.(76), para determinar la interacción es específico de este compuesto C con la AchE son necesarios estudios *in silico* que muestren la interacción de manera precisa entre el compuesto y el sitio activo de la enzima.

Al complementar los estudios *in vitro* realizados con ensayos *in silico* se pudo predecir que cualquiera de los compuestos analizados podría representar una alternativa farmacológica, ya que ninguno presentó algún grado de citotoxicidad u efectos no deseados

en otros sistemas **Figura 17**, y con respecto a las propiedades ADME también se puede decir que son potenciales fármacos ya que los análisis indicaron que no existió ninguna violación a las reglas de Lipinski **Tabla 9**.

De todos los compuestos que se analizaron el que presentó mejor rendimiento en general fue el compuesto C, ya que tiene un grado de inhibición enzimática de la Ache aceptable, sumado con una gran capacidad antioxidante, además que según los software que se utilizaron para las pruebas *in silico* no presentó ningún grado de toxicidad y tiene buenas propiedades ADME, todo lo anterior lo convertiría en un gran foco de estudio para el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento del Alzheimer, además este compuesto estaría abarcando dos hipótesis de esta enfermedad al neutralizar las ROS sugestivas de daño neuronal en la hipótesis oxidativa, y por otro lado se estaría aumentando la vida media de la acetilcolina, respondiendo a la hipótesis colinérgica.

VIII. CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos se puede concluir que los compuestos, derivados de las tetrahydroquinolinas, analizados durante el desarrollo de este trabajo se logró demostrar que en general tienen una buena capacidad antioxidante, además de tener un grado aceptable de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, además de tener una selectividad por esta enzima en general.

Al analizar los compuestos de modo particular, se encuentra que el compuesto C, descrito en la **Tabla 5**, con el sustituyente flúor es el que mejor resultados mostró, siendo un excelente antioxidante y además tiene el mayor grado de inhibición de la Ache y es más selectivo por esta enzima. Todo lo antes mencionado más los estudios *in silico* que indican que tiene buenas propiedades farmacológicas y prácticamente nula toxicidad, convierten a este compuesto en un potencial fármaco para poder tratar la EA, abarcando dos de las hipótesis de la enfermedad: la hipótesis oxidativa y la hipótesis colinérgica, por lo que con

estos resultados se puede decir que se cumple con la hipótesis de trabajo ya que se logró demostrar que los compuestos tetrahydroquinolinas de origen sintético muestra actividad sobre blancos terapéuticos de la EA.

Es importante mencionar que se bien los estudios *in silico* demostraron que cualquiera de los compuestos analizados sería un potencial fármaco, ya que no tendrían ningún grado de toxicidad o efectos adversos, deben realizarse estudios biológicos en cultivos celulares para comprobar estos resultados teóricos, en caso de comenzar con el desarrollo de algún fármaco. Es importante destacar que este estudio sienta las bases para el desarrollo farmacológico ya que a partir de los compuestos que tuvieron resultados más prometedores se puede ir mejorando su actividad biológica mediante diferentes modificaciones químicas, puesto que este tipo de compuestos tienen la característica de poder modificarse gracias a su grupo propargil.

IX. REFERENCIAS

1. Becker MM, Nunes GS, Ribeiro DB, Silva FEPS, Catanante G, Marty J-L. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2019;30:1108-14.
2. Bondi MW, Edmonds EC, Salmon DP. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J Int Neuropsychol Soc*. 2017;23(9-10):818-31.
3. Martínez DB, Soldevilla MAG, Santiago AP, Martínez JT. Enfermedad de alzheimer. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2019;12(74):4338-46.
4. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr f Psychiatr. u Psych. Gerichtl Med*. 1907;64:146-8.
5. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological psychiatry*. 2015;77(1):43-51.
6. Hroudová J, Singh N, Fišar Z, Ghosh KK. Progress in drug development for Alzheimer's disease: An overview in relation to mitochondrial energy metabolism. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;121:774-84.
7. Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond)*. 2016;16(3):247-53.
8. Benek O, Korabecny J, Soukup O. A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer's Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2020;41(7):434-45.
9. Marella A, Tanwar OP, Saha R, Ali MR, Srivastava S, Akhter M, et al. Quinoline: A versatile heterocyclic. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013;21(1):1-12.
10. Villegas S. Enfermedad de Alzheimer: nuevas estrategias terapéuticas. *Medicina Clínica*. 2015;145(2):76-83.
11. Bird TD. Alzheimer disease overview. *GeneReviews®[Internet]: University of Washington, Seattle*; 2018.
12. Srivastava S, Ahmad R, Khare SK. Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;216:113320.
13. Ricciarelli R, Fedele E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Current neuropharmacology*. 2017;15(6):926-35.

14. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translational Neurodegeneration*. 2018;7(1):2.
15. Fuente-Rocha Jdl. Taupatía en la enfermedad de Alzheimer. *Medicina interna de México*. 2017;33:515-21.
16. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Khachaturian AS, Vergallo A, Farlow MR, et al. Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. 2019;6(1):2-15.
17. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current neuropharmacology*. 2016;14(1):101-15.
18. Mash DC, Flynn DD, Potter LT. Loss of M2 muscarine receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science*. 1985;228(4703):1115-7.
19. Davies P, Maloney J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976;2(8000):1403.
20. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018;141(7):1917-33.
21. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;57:1105-21.
22. Martínez CD, Vargas CR, Arancibia SR. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med*. 2003;46(6):229-35.
23. Tramutola A, Lanzillotta C, Perluigi M, Butterfield DA. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin*. 2017;133:88-96.
24. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(8):1219-31.
25. Guha S, Johnson GVW, Nehrke K. The Crosstalk Between Pathological Tau Phosphorylation and Mitochondrial Dysfunction as a Key to Understanding and Treating Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*. 2020;57(12):5103-20.

26. Cassidy L, Fernandez F, Johnson JB, Naiker M, Owoola AG, Broszczak DA. Oxidative stress in alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complementary Therapies in Medicine*. 2020;49:102294.
27. Belaidi AA, Bush AI. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 1:179-97.
28. Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczyk A, Oniszczyk T, Waksmundzka-Hajnos M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;78:39-49.
29. Tobore TO. On the central role of mitochondria dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*. 2019;40(8):1527-40.
30. Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2017;57(4):1041-8.
31. Xu J, Patassini S, Begley P, Church S, Waldvogel HJ, Faull RLM, et al. Cerebral deficiency of vitamin B5 (d-pantothenic acid; pantothenate) as a potentially-reversible cause of neurodegeneration and dementia in sporadic Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;527(3):676-81.
32. Uddin MS, Kabir MT, Mamun AA, Barreto GE, Rashid M, Perveen A, et al. Pharmacological approaches to mitigate neuroinflammation in Alzheimer's disease. *International Immunopharmacology*. 2020;84:106479.
33. López Locanto Ó. Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Archivos de Medicina Interna*. 2015;37:61-7.
34. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol*. 1981;10(2):122-6.
35. Clos MV, Pera M, Ratia M, Roman S, Camps P, Muñoz-Torrero D, et al. Effect of acetylcholinesterase inhibitors on AChE-induced PrP106-126 aggregation. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2006;30(1-2):89.
36. Fuentes G P, Slachevsky Ch A. Enfermedad de Alzheimer: Actualización en terapia farmacológica. *Revista médica de Chile*. 2005;133:224-30.
37. Doody RS, Stevens JC, Beck C, Dubinsky RM, Kaye JA, Gwyther L, et al. Practice parameter: Management of dementia (an evidence-based review): Report of the Quality

Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2001;56(9):1154-66.

38. Wiesner J, Kříž Z, Kuča K, Jun D, Koča J. Acetylcholinesterases—the structural similarities and differences. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2007;22(4):417-24.

39. Pohanka M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008–present). *Expert opinion on therapeutic patents*. 2012;22(8):871-86.

40. Khan MTH. Molecular interactions of cholinesterases inhibitors using in silico methods: current status and future prospects. *New biotechnology*. 2009;25(5):331-46.

41. Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*. 2011;155(3).

42. Castellanos Castillo FA. Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del Caribe colombiano. Departamento de Química. 2014.

43. Berkov S, Codina C, Bastida J. The genus *Galanthus*: a source of bioactive compounds. *Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*: IntechOpen; 2012.

44. Lee C, Jones T. Molecular conformation–activity relationship of decamethonium congeners. *British journal of anaesthesia*. 2002;88(5):692-9.

45. Liu J-S, Zhu Y-L, Yu C-M, Zhou Y-Z, Han Y-Y, Wu F-W, et al. The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry*. 1986;64(4):837-9.

46. Bulbule VJ, Rivas K, Verlinde CLMJ, Van Voorhis WC, Gelb MH. 2-Oxotetrahydroquinoline-based antimalarials with high potency and metabolic stability. *Journal of medicinal chemistry*. 2008;51(3):384-7.

47. Gedawy EM, Kassab AE, El-Malah AA. Synthesis and anticancer activity of novel tetrahydroquinoline and tetrahydropyrimidoquinoline derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 2015;24(9):3387-97.

48. Ramesh E, Manian RDRS, Raghunathan R, Sainath S, Raghunathan M. Synthesis and antibacterial property of quinolines with potent DNA gyrase activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2009;17(2):660-6.

49. Gholap AR, Toti KS, Shirazi F, Kumari R, Bhat MK, Deshpande MV, et al. Synthesis and evaluation of antifungal properties of a series of the novel 2-amino-5-oxo-4-phenyl-5, 6, 7, 8-tetrahydroquinoline-3-carbonitrile and its analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007;15(21):6705-15.
50. Madkour HMF, El-Hashash MAEAM, Salem MS, Mahmoud ASOA, Al Kahraman YMSA. Design, synthesis, and in vitro antileishmanial and antitumor activities of new tetrahydroquinolines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2018;55(2):391-401.
51. Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria journal*. 2011;10(1):144.
52. Mishra SK, Tripathi G, Kishore N, Singh RK, Singh A, Tiwari VK. Drug development against tuberculosis: Impact of alkaloids. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;137:504-44.
53. Chander S, Ashok P, Zheng Y-T, Wang P, Raja KS, Taneja A, et al. Design, synthesis and in-vitro evaluation of novel tetrahydroquinoline carbamates as HIV-1 RT inhibitor and their antifungal activity. *Bioorganic chemistry*. 2016;64:66-73.
54. Truax VM, Zhao H, Katzman BM, Prosser AR, Alcaraz AA, Saindane MT, et al. Discovery of tetrahydroisoquinoline-based CXCR4 antagonists. *ACS medicinal chemistry letters*. 2013;4(11):1025-30.
55. Ghorab MM, Ragab FA, Hamed MM. Design, synthesis and anticancer evaluation of novel tetrahydroquinoline derivatives containing sulfonamide moiety. *European journal of medicinal chemistry*. 2009;44(10):4211-7.
56. Rodríguez YA, Gutiérrez M, Ramírez D, Alzate-Morales J, Bernal CC, Güiza FM, et al. Novel N-allyl/propargyl tetrahydroquinolines: Synthesis via Three-component Cationic Imino Diels-Alder Reaction, Binding Prediction, and Evaluation as Cholinesterase Inhibitors. *Chemical biology & drug design*. 2016;88(4):498-510.
57. Núñez YAR, Norambuena M, Bohorquez ARR, Morales-Bayuelo A, Gutiérrez M. Efficient synthesis and antioxidant activity of novel N-propargyl tetrahydroquinoline derivatives through the cationic Povarov reaction. *Heliyon*. 2019;5(8):e02174.

58. Matada BS, Pattanashettar R, Yernale NG. A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2021;32:115973.
59. Sridharan V, Suryavanshi PA, Menendez JC. Advances in the chemistry of tetrahydroquinolines. *Chemical reviews*. 2011;111(11):7157-259.
60. Chisholm DR, Zhou G-L, Pohl E, Valentine R, Whiting A. Practical synthetic strategies towards lipophilic 6-iodotetrahydroquinolines and-dihydroquinolines. *Beilstein journal of organic chemistry*. 2016;12(1):1851-62.
61. Annunziata R, Cinquini M, Cozzi F, Molteni V, Schupp O. A new multicomponent synthesis of 1, 2, 3, 4-tetrahydroquinolines. *Tetrahedron*. 1997;53(28):9715-26.
62. Vicente-García E, Ramón R, Preciado S, Lavilla R. Multicomponent reaction access to complex quinolines via oxidation of the Povarov adducts. *Beilstein journal of organic chemistry*. 2011;7(1):980-7.
63. Rudenko DA, Shavrina TV, Shurov SN, Zykova SS. Synthesis and Antioxidant Activity of Tricyclic Compounds Containing a 5,6,7,8-Tetrahydroquinoline Moiety. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;48(2):100-3.
64. Fernández-Bachiller MI, Pérez C, González-Muñoz GC, Conde S, López MG, Villarroya M, et al. Novel Tacrine–8-Hydroxyquinoline Hybrids as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer’s Disease, with Neuroprotective, Cholinergic, Antioxidant, and Copper-Complexing Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010;53(13):4927-37.
65. Rodríguez Núñez YA, Norambuena M, Romero Bohorquez AR, Morales-Bayuelo A, Gutiérrez M. Efficient synthesis and antioxidant activity of novel N-propargyl tetrahydroquinoline derivatives through the cationic Povarov reaction. *Heliyon*. 2019;5(8):e02174.
66. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*. 1961;7(2):88-95.
67. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961;7(2):88-95.
68. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 1995;28(1):25-30.

69. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J sci technol.* 2004;26(2):211-9.
70. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology.* 2005;25:726-32.
71. Di L, Kerns E. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. In: Press A, editor. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY.* First edition ed. New York: ELSEVIER; 2008.
72. Glennon RA. Pharmacophore identification for sigma-1 (sigma1) receptor binding: application of the "deconstruction-reconstruction-elaboration" approach. *Mini reviews in medicinal chemistry.* 2005;5(10):927-40.
73. Douadi K, Chafaa S, Douadi T, Al-Noaimi M, Kaabi I. Azoimine quinoline derivatives: Synthesis, classical and electrochemical evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activities and the DNA / BSA binding. *Journal of Molecular Structure.* 2020;1217:128305.
74. Polo E, Trilleras J, Ramos J, Galdámez A, Quiroga J, Gutierrez M. Efficient MW-assisted synthesis, spectroscopic characterization, X-ray and antioxidant properties of indazole derivatives. *Molecules.* 2016;21(7):903.
75. Mubeen M, Kini SG, Pai KSR. Design, synthesis, antioxidant and anticancer activity of novel pyrazole derivatives. *Der Pharma Chemica.* 2015;7(2):215-23.
76. Torre PDI, Saavedra LA, Caballero J, Quiroga J, Alzate-Morales JH, Cabrera MG, et al. A novel class of selective acetylcholinesterase inhibitors: Synthesis and evaluation of (E)-2-(Benzo [d] thiazol-2-yl)-3-heteroarylacrylonitriles. *Molecules.* 2012;17(10):12072-85.