Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
Carrera de Médico Cirujano

"Evaluación del compuesto 3f derivado de benzotiazolisotiureas sobre dianas terapéuticas en un modelo de Alzheimer inducido por β-amiloide intracortical"

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO CIRUJANO

P R E S E N T A

JUAN ISRAEL SANTOS MACÍAS

Directores:
D. en C. MARTHA CECILIA ROSALES HERNÁNDEZ
D. en C. LUÍS OSKAR SOTO ROJAS

Facultad de Estudios Superiores
IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Edo de México, 23 de mayo del 2024

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biofísica y Biocatálisis de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

Mi completa gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México por haber proveído de educación de calidad y una formación profesional que me permita desarrollarme en el campo de la ciencia, investigación y la clínica.

Al Instituto Politécnico Nacional por permitirme utilizar las instalaciones, así como el brindarme apoyo para el desarrollo de este protocolo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por brindarme apoyo económico a través del programa de Apoyo para ayudante de investigador nivel III con CVU: 1194380.

Al departamento de histología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México por orientarme y apoyarme en la realización del protocolo.

Dedicatoria

A mi asesora de tesis la Dra. Martha Cecilia Rosales Hernández, muchas gracias por la oportunidad de realizar este protocolo a pesar de ser yo provenir de una institución externa, por sus asistencia y docencia en el aprendizaje de técnicas y uso de material de laboratorio, así como la continua supervisión y apoyo en el desarrollo del protocolo.

A mis compañeros de laboratorio por darme numerosos consejos, a quien entonces no tenía mucho conocimiento en el uso de material de laboratorio y por amenizar y hacer divertidos mis momentos en el laboratorio, complementaron enormemente este protocolo.

Y a mi familia, por todo el amor y apoyo que me han entregado, siempre dándome consejos y entusiasmo para seguir y mantenerme en pie ante las adversidades que suponían una de las etapas más difíciles de mi vida.

Sin todo el apoyo, la realización de este protocolo no podría haber sido posible, mis infinitas gracias a todos.

Índice

Contenido

1. Resumen 6

Abstract 7

2. Introducción 8

3. Marco teórico 10

3.1 Enfermedad de Alzheimer (EA) 10

3.2 Epidemiología mundial 11

3.3 Epidemiología en México 11

3.4 Vía amiloidogénica y no amiloidogénica 11

3.5 Proteína de unión a tubulina (tau) 13

3.6 Hipótesis colinérgica de la EA 14

3.7 Correlación entre las teorías amiloidogénica, colinérgica y de fosforilación de tau 16

3.8 Complejos βA-AChE 17

3.9 Neuroinflamación producida durante la EA 18

3.10 Fármacos actuales para EA 19

3.11 Fármacos derivados de benzotiazolisotiureas 20

3.12 Modelos de estudio en la EA 23

3.13 Pruebas conductuales 25

4. Planteamiento del problema 28

5. Justificación 29

6. Hipótesis 30

7. Objetivos 31

7.1 Objetivo general 31

7.2 Objetivos específicos 31

8. Metodología 32

8.1 Animales de experimentación 32

8.2 Formación de oligómeros de βA_{1-42} 32

8.3 Estandarización de la cirugía estereotáxica 32

8.4 Grupos de experimentación 33

8.5 Administración intracortical de βA1-42 34

8.6 Evaluación del deterioro cognitivo 34

8.7 Evaluación de motricidad 35

8.8 Obtención de las muestras de hipocampo y corteza 36
8.9 Cuantificación de actividad de AChE en hipocampo y corteza 36
8.10 Cuantificación de actividad del complejo AChE-βA 37
8.11 Cuantificación de proteínas por la prueba de Bradford 38
8.12 Cuantificación de βA por la técnica ELISA 38
8.13 Análisis estadístico 39
9. Resultados 40
9.1 Estandarización de la cirugía estereotáxica 40
9.2 Prueba de evitación pasiva 41
9.3 Prueba de campo abierto 42
9.4 Actividad de acetilcolinesterasa en hipocampo y corteza 43
9.5 Actividad del complejo acetilcolinesterasa- βA 47
9.6 Cuantificación de βA por medio de la técnica ELISA 47
10. Discusión 49
11. Conclusión 52
12. Perspectivas 53
12. Bibliografía 54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE LA PROTEINA PRECURSORA DE AMILOIDE 13
FIGURA 2 SÍNTESIS DE ACH EN LAS NEURONAS COLINÉRGICAS 15
FIGURA 3 EFECTOS DE ACH MEDIANTE SU UNION AL RECEPTOR M1 EN LA EA 16
FIGURA 4 CORRELACIÓN DE LAS TEORÍA PRINCIPALES 17
FIGURA 5 ESTRUCTURA DE LOS BENZOTIAZOLES 21
FIGURA 6 PRUEBAS IN VITRO DEL COMPUESTO 3F 23
FIGURA 7 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BETA-AMILOIDE INTRACORTICAL 25
FIGURA 8 ESQUEMA DE TRABAJO 34
FIGURA 9 REPRESENTACIÓN DE LOS CUADRANTES DEL CAMPO ABIERTO 36
FIGURA 10 CORTES HISTOLÓGICOS DE CEREBRO DE RATAS MEDIANTE ADMINISTRADAS ESTEREOTÁXICA CON EOSINA Y A 4X..... 40
FIGURA 11 PRUEBA DE EVITACIÓN PASIVA 41
FIGURA 12 PRUEBA DE CAMPO ABIERTO 43
FIGURA 13 ACTIVIDAD DE ACHE 44
FIGURA 14 ACTIVIDAD DE ACHE EN MUESTRA DE HIPOCAMPO 45
FIGURA 15 ACTIVIDAD DE ACHE EN CORTEZA 46
FIGURA 16 ACTIVIDAD DE ACHE EN COMPLEJOS ACHE-BETA-AMILOIDE 47
FIGURA 17 CUANTIFICACIÓN DE BETA-AMILOIDE 48

1. Resumen

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la presencia de placas amiloides y marañas neurofibrilares en el cerebro, formadas a partir de la agregación del péptido β-amiloide y proteína de unión a tubulina respectivamente. Clínicamente se presenta con déficit de la memoria y alteraciones de las funciones cognitivas. Representa la causa más frecuente de demencia, posicionándola como un problema en salud pública a nivel mundial.

Los tratamientos actuales se basan en el uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa y los bloqueadores no competitivos del receptor N-metil-D-aspartato, sin embargo, actualmente se continua la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas que sean capaces de retrasar el progreso de la enfermedad.

En este estudio, se evaluó el **compuesto 3f**, un nuevo compuesto derivado de benzotiazolisotiurea con resultados prometedores en estudios *in silico* e *in vitro* previos. El método utilizado fue un modelo *in vivo* de enfermedad de Alzheimer inducido por administración intracortical de β-amiloide$_{1-42}$ (βA_{1-42}), posteriormente se realizaron pruebas conductuales incluyendo la prueba de evitación pasiva y prueba de campo abierto, así como pruebas bioquímicas que incluyeron la cuantificación de la actividad de acetilcolinesterasa y cuantificación de βA con el fin de medir el efecto neuroprotector del **compuesto 3f**.

El **compuesto 3f,** ante las pruebas conductuales y bioquímicas, presentó una tendencia discreta a disminuir la actividad de acetilcolinesterasa y la producción de β-amiloide. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los resultados, por lo que se concluyó que el **compuesto 3f** no fue capaz de disminuir el déficit cognitivo en el modelo animal de enfermedad de Alzhemer ocasionado por la administración intracortical de βA_{1-42}.

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder characterized by the presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the brain, formed from the aggregation of amyloid-β peptide and Microtubule Associated Protein respectively. Clinically it presents as memory and cognitive impairment. It's the most common cause of dementia, pointing it out as a global public health issue.

The current treatment options are based on the acetylcholinesterase inhibitors and the non-competitive N-Methyl-D-Aspartic channel blockers, however, the research for new treatment options that can slow the progression of the disease continues.

*In this study, we evaluated **3f compound**, a novel compound derivative from bezothiazolilisothioureas, which was the most promising in previous in silico e in vitro studies. The method used was an in vivo Alzheimer's disease model inducted by intracortical injection of $A\beta_{1-42}$, to later use behavior tests, including passive avoidance test and open field test, as well as biochemical tests, which included acetylcholinesterase activity quantification and Aβ quantification to measure the neuroprotective effect of **3f compound**.*

*The **3f compound** showed a tendency to decrease acetylcholinesterase activity and βA production in the behavioral and biochemical tests, however, they were not found statistically significant difference in the results, concluding that the **3f compound** didn't show improvements in the cognitive impairment in an Alzheimer's disease model inducted by intracortical injection of $A\beta_{1-42}$.*

2. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la presencia de placas extracelulares de β-amiloide (βA) y marañas neurofibrilares intracelulares de proteína asociada a tubulina (tau) en el cerebro. La EA. Es clínicamente caracterizado por demencia, siendo la misma definida como déficit en la memoria y alteración en ≥1 de las funciones cognitivas, incluyéndose el lenguaje, praxis, gnosias, funciones ejecutivas, juicio y pensamiento abstracto, así como discapacidad funcional, sin alteración al estado de conciencia.[1, 2]

A nivel mundial, la demencia tiene una prevalencia de 55 millones de personas anualmente, de estos ~60% son causadas por EA y aproximadamente el 60% viven en países de bajos y medianos ingresos. Cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos, se prevé que el número total de personas con demencia alcance los 82 millones en 2030 y 139 millones en el 2050.[3] En México hay pocos estudios epidemiológicos, sin embargo, se calcula una prevalencia de demencia del 7-8% de los adultos mayores, siendo 60% mujeres y el 31% de los afectados son mayores de 80 años de edad.[4]

Para la etiopatogenia de la EA sigue siendo importante la hipótesis amiloide, en la cual, está implicado el péptido βA. Este péptido es producido a partir de la proteína precursora de amiloide (PPA), una proteína transmembrana que, en un proceso no amiloidogénico, es cortada por la enzima α-secretasa, seguida por γ-secretasa, para su posterior procesamiento y eliminación, sin producir el péptido βA.[5] Sin embargo, en la vía amiloidogénica, el corte de la APP es realizado por β-secretasa (BACE-1, por sus siglas en inglés *beta-site APP-cleaving enzyme* 1), seguido por γ-secretasa, generando isoformas de βA insolubles que posteriormente forman agregados capaces de inducir efectos neurotóxicos y neuroinflamación.[5]

En la actualidad, los tratamientos farmacológicos para la EA presentan un éxito moderado, no existe cura alguna para la enfermedad[6], ocasionando que la patología sea sumamente incapacitante, tanto para quien la padece como para los familiares, por lo que, la investigación se ha enfocado en la búsqueda de nuevos compuestos que, a través de las dianas terapéuticas implicadas en la etiopatogenia, generen un cambio en la progresión de la EA.

El desarrollo de un fármaco que logre la reducción de la progresión de la EA y mejore la calidad de vida de los pacientes, así como la de sus familiares. Además de generar un cambio en el gasto anual que produce la enfermedad a nivel mundial. Debido a lo anterior, en este trabajo se evalúa un compuesto denominado "**3f**", el cual es un derivado de benzotiazolisotiourea, que en estudios *in silico* previos se evidenció interacción química con residuos de aminoácidos del sitio activo de BACE1, acetilcolinesterasa (AChE) y en el sitio de oligomerización del péptido βA,

mostrando así una posible actividad *multitarget.*[7] Se ha corroborado, mediante estudios *in vitro*, la actividad al inhibir AChE y en la oligomerización de βA .[7] Cabe mencionar que, compuestos derivados de benzotiazoles y adamantadina, han sido reportados como inhibidores de AChE. Por lo tanto, es posible que, al evaluar el **compuesto 3f** en un modelo para la EA inducido mediante la administración intracortical de βA, tenga efecto sobre las funciones conductuales medidas por la prueba de evitación pasiva y prueba de campo abierto, así como en las pruebas bioquímicas, al inhibir la actividad de AChE y disminuir la agregación del βA.

3. Marco teórico

3.1 Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es un trastorno neurodegenerativo de lenta progresión, ocasionado por un procesamiento y polimerización aberrante de proteínas, lo anterior debido a distintos factores como mutaciones genéticas, factores y envejecimiento. El mal plegamiento ocasiona pérdida de la función normal de la proteína, al igual que la ganancia de toxicidad, lo que resulta en muerte neuronal, neuroinflamación y disfunción neuronal.[8]

La EA es la causa más frecuente de demencia, ocasionando ~60-90% de los casos de demencia, que clínicamente se presenta como déficit cognitivo amnésico prominente, sin embargo, el déficit en la expresión oral, procesamiento visoespacial, y función ejecutiva puede acompañarlo. Se relaciona con las lesiones histológicas observables en los pacientes, que implican las placas amiloides extracelulares que se distribuyen a lo largo de la corteza cerebral y las marañas neurofibrilares de proteína tau, que inician en el lóbulo temporal medial para posteriormente esparcirse a las regiones corticales de los lóbulos temporal, parietal y frontal.[1]

En la EA existen distintas fases clínicas; la fase preclínica, en la que ocurren alteraciones en el funcionamiento de distintas células nerviosas, incluyendo a las neuronas, microglía, astrocitos, conduciendo la progresión de la enfermedad a sus estadios clínicos, donde será observable el deterioro cognitivo. La neuroinflamación, el envejecimiento y la disfunción del sistema de limpieza metabólico actúan a la par de la acumulación de βA; el cual, por un mecanismo desconocido, induce la agregación y esparcimiento de tau a distintas áreas del cerebro.[9]

Se puede clasificar en EA esporádica, la cual compone el 95% de los casos y se presenta como EA de desarrollo tardío y EA familiar o autosómica, la cual representa el 1-5% y se inicia <65 años de edad.[10]

El desarrollo de la EA se asocia a distintos factores de riesgo, al factor genético se le atribuye ~60-80% del riesgo de EA, siendo el más implicado el alelo de la apolipoproteína E (APOE ε4), que explica una parte sustancial de los casos de EA, sin embargo no da explicación de todos. También influyen otros factores, destacando la edad avanzada (>65 años y especialmente >80 años), el género, ya que las mujeres presentan mayor incidencia, el estilo de vida, mencionando factores patológicos, se ha relacionado con obesidad, hipertensión, diabetes, entre otros.[1, 9]

El inicio de la EA es insidioso y suele ser diagnosticada en un estadio altamente avanzado siendo incurable. La rehabilitación y el cuidado de los pacientes es complicado y ocasiona un gran desgaste económico y psicológico para los familiares y la sociedad.[1, 9]

Para encontrar un tratamiento eficiente, seguro y costeable es necesario el conocimiento en el mecanismo etiopatogénico, conocer las principales teorías y la identificación de posibles dianas terapéuticas.

3.2 Epidemiología mundial

De acuerdo con la *Alzheimer's Disease International*, en el 2018 se estimó la prevalencia de la demencia en ~50 millones de personas a nivel mundial y se proyectan ~82 millones para el año 2030 y de 139-150 millones casos para el 2050, con 2 terceras partes viviendo en países de bajos o medianos recursos. Se estima que por año se presentan 10 millones de nuevos casos mundialmente.[9, 4]

La incidencia de la demencia cambia con la edad, siendo que en pacientes entre los 65-70 años es de ~1/100 por año, incrementando a ~4/100 por año entre los 80-90 años de edad. Mientras que la prevalencia de la demencia amnésica diagnosticable incrementa alrededor del 1% en pacientes <65-69 años a 7-8% entre los 80-84 años y hasta del 27% entre los 90-94 años.[1]

3.3 Epidemiología en México

En México, se realizó una proyección de las demencias en el 2015, donde se calculó que habría 11.5 millones de personas con demencia en México para el 2050; un estimado realizado en el 2018, proyecta una población de 13.5 millones de personas. Hay pocos estudios epidemiológicos, sin embargo, en los estudios realizados por la Encuesta Nacional sobre Salud y Envejecimiento en México (ENASEM, https://www.inegi.org.mx/programas/enasem/2018/) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT; https://ensanut.insp.mx), para el 2015, se calculó una prevalencia de demencia del 7.9-9%, de las cuales, el 60% eran mujeres y el 31-35 % tenía >80 años, el 40% del total vivían en condiciones de muy alta marginalidad y situación de pobreza extrema.[4]

El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) realizó el estudio con el grupo de investigación 10/66, donde se calculó una incidencia de 30.4 nuevos casos por cada 1,000 habitantes por año. En cuanto a la mortalidad, en este mismo estudio, se observó un riesgo del doble de la mortalidad en los pacientes con demencia.[4]

3.4 Vía amiloidogénica y no amiloidogénica

La hipótesis amiloide es el evento etiopatogénico principal detrás de la EA, se postula que dos enzimas secretasas distintas pueden generar el primer corte en la proteína precursora amiloide, resultando en el paso a dos vías distintas, la amioloidogénica y no amiloidogénica.[5] Ambas vías han sido ilustradas y contrastadas en la figura 1 para su mejor comparación**.**

3.4.1 Vía no amiloidogénica

La PPA es una proteína integral de membrana constituida por 639-770 aminoácidos en el humano, la cual tiene alta expresión en el sistema nervioso central y realiza diversas funciones fisiológicas, entre estas se le ha atribuido participación en la plasticidad sináptica, actividad excitatoria neuronal, transporte, endocitosis, regulación de vías intracelulares, así como control en el sistema inhibitorio GABAérgico. Es inicialmente cortada por una α-secretasa, generando un fragmento carboxilo-terminal soluble de 83 aminoácidos (FCTα 83) y una subunidad de la proteína precursora amiloide (sPPAα). Posteriormente, una γ-secretasa genera un segundo corte en FCTα83, resultando en un péptido de dominio intracelular (AICD/AID), un péptido p3 (3 KDa) pequeño de FCTα83 (Figura 1A). Esta cascada se considera neuroprotectora, al contrario de la derivada de β-secretasa, ya que el paso de PPA por esta vía, no genera la producción de fragmentos βA. [5, 8, 9, 11]

3.4.2 Vía amiloidogénica

En esta vía, la primera escisión, contrario a la vía no amiloidogénica, es realizada por β-secretasa[9], donde se corta a PPA y genera fragmentos carboxilo-terminales solubles de 99 aminoácidos (FCTβ 99) y una subunidad de la proteína precursor amiloide β (sPPAβ), con la segunda escisión en FCTβ 99 realizada por la misma γ-secretasa, resulta en un péptido amiloide de dominio intracelular (AICD/AID) y fragmentos de β-amiloide, dependiendo del sitio de corte de γ-secretasa, se pueden generar diversas isoformas de βA, compuestos por 38-43 aminoácidos (Figura 1B). [5, 12]

Siendo el βA_{1-40} el de mayor predominio, βA_{1-42} está presente en bajas concentraciones, pero es más propenso a formar agregados; también se han observado βA_{1-38} y formas truncadas de la región N-terminal; como βA_{1-15}, βA_{1-16} y βA_{1-17}.[5, 6, 11, 13]

El βA forma distintos agregados, desde monómeros hasta oligómeros de alto peso molecular, los cuales son capaces de inducir efectos neurotóxicos, así como disfunción de la plasticidad sináptica; particularmente en el hipocampo.[7, 11]

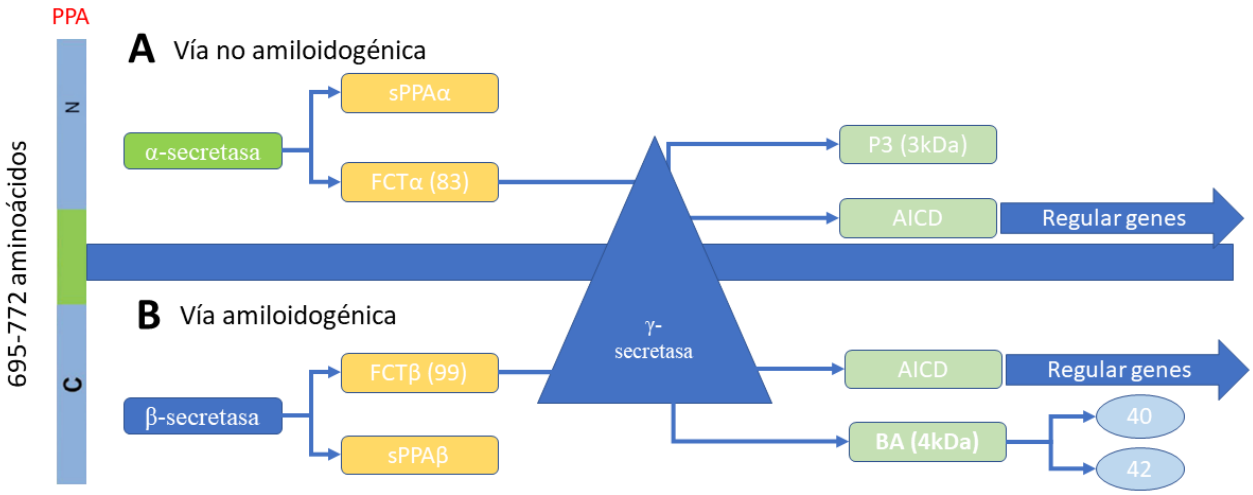


FIGURA 1 PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE LA PROTEINA PRECURSORA DE AMILOIDE

A. La vía no amiloidogénica se caracteriza por el corte de PPA por α-secretasa y no genera el péptido βA. B. En la vía amiloidogénica, PPA es cortado por β-secretasa, generando fragmentos que tienen la capacidad de formar oligómeros, precursores de las placas amiloideas. [5, 12]

3.5 Proteína de unión a tubulina (tau)

La proteína tau es una proteína asociada a los microtúbulos, conocida como proteína esencial termoestable para el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos. Se presenta en 6 isoformas en el cerebro humano, derivados del empalme alternativo de los exones 2, 3 y 10 del gen de la proteína tau asociado a microtúbulos (MAPT), el cual se localiza en el cromosoma 17q21[11, 12] Este gen se expresa altamente en neuronas.[11, 16]

El empalme del exón 10 determina la presencia de la isoforma obtenida, que contiene 3-4 repeticiones (3R o 4R) de una secuencia de alrededor de 32 aminoácidos en el dominio de unión a microtúbulos, de igual manera, el empalme de los exones 2 y 3 determina el número de residuos 29 cercanos al amino terminal, que pueden no contenerlos, o tener de 1-2, lo que resulta en que las isoformas contengan 0,1 o 2 insertos (0N, 1N o 2N). Tanto las repeticiones R o N son las encargadas del ensamblaje a los microtúbulos.[5, 11, 16, 17]

Se han realizado varios estudios sobre las implicaciones fisiológicas de tau en diferentes niveles celulares, siendo que se asocia con la maduración, transporte y regulación axonal, en las dendritas participa en la plasticidad sináptica y, a nivel nuclear, se encarga del mantenimiento e integridad del ADN genómico y del ARN nuclear y citoplasmático.[5, 11, 16, 18]

En condiciones normales, la proteína tau tiene la función de proteína estabilizadora en los microtúbulos de los axones neurales. Sin embargo, en un estado anormal, se produce hiperfosforilación de tau que resulta en la desestabilización de los microtúbulos y en la formación de marañas neurofibrilares, que se depositan principalmente en el soma de las neuronas.[5, 11, 16, 18]

Estudios bioquímicos han demostrado que los depósitos de agregados insolubles de tau dependen de la desregulación del proceso de fosforilación de las regiones de tau. Normalmente hay 2 fosforilaciones por molécula de tau, sin embargo, en pacientes con EA, hay alrededor de 8 fosforilaciones. La fosforilación produce cambios conformacionales, generando filamentos helicoidales, los cuales se asocian a la formación de ovillos, daño neural y disfunción cognitiva.[5, 11, 16, 18]

3.6 Hipótesis colinérgica de la EA

En la fisiopatología de la EA también participa la disfunción colinérgica, la cual se origina por perdida de neuronas productoras de acetilcolina (ACh) en el núcleo basal de Meyner (NBM) y disfunción en las síntesis y acción de ACh.[19]

La ACh es uno de los neurotransmisores principales en el cerebro, que actúa en múltiples vías colinérgicas, encontrándose una alta densidad de neuronas que las producen en el tálamo, cuerpo estriado, sistema límbico y neocorteza, sin embargo, actúa en más regiones del cerebro. Entre estos, se destaca el NBM el cual, contiene una alta concentración de neuronas colinérgicas que se proyectan a la neocorteza, hipocampo, entre otras áreas y modula funciones importantes como la atención, el miedo y las interacciones sociales, como la memoria de reconocimiento social, éste es el origen de una gran parte de la inervación colinérgica que se ve afectada en la neurodegeneración severa en la EA, produciendo el déficit cognitivio.[11, 19, 20]

En estos sitios hay una gran densidad de neuronas colinérgicas, en donde la síntesis de ACh inicia en la neurona presináptica, con la unión del sustrato colina con la Acetil Coenzima A (Ac CoA) y con ayuda de la enzima colinacetiltransferasa (ChAT). La Ac CoA se obtiene del procesamiento de la glucosa en la glucólisis y el ciclo de Krebs. Posteriormente, la ACh es liberada a la hendidura sináptica. [11, 19, 21]

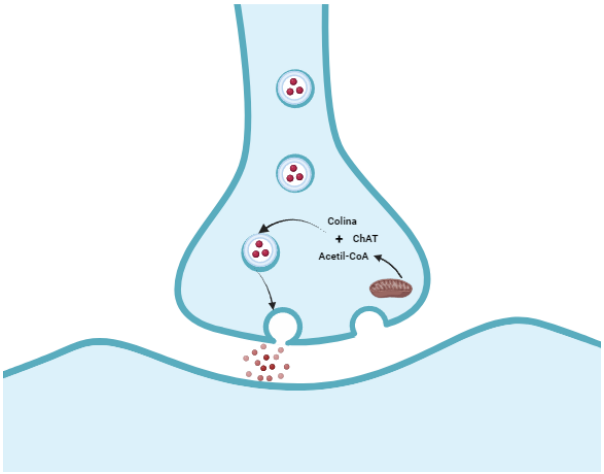


FIGURA 2 SÍNTESIS DE ACH EN LAS NEURONAS COLINÉRGICAS

ChAT=Colinacetiltransferasa[11, 19, 21]

La cantidad de ACh en la sinapsis es regulado por la enzima AChE, la cual hidroliza alrededor del 80% de la ACh en colina y acetato, la colina se recaptura para posteriormente ser reutilizado en la síntesis de ACh, mientras que el acetato se utiliza en diversas funciones celulares, incluyendo la producción de energía, síntesis de lípidos y acetilación de proteínas.[22, 23, 24]

ACh cumple diversas funciones esenciales, como promover la neuroplasticidad, la sincronización de la actividad neuronal, el remodelado cortical, así como regulación de la vasodilatación y perfusión cerebral.[15]

En la membrana de la neurona posináptica, la ACh se une al receptor colinérgico muscarínico tipo 1 (M1), que es un receptor de la subfamilia de receptores acoplados a proteína G, el cual opera a través de la cascada de señalización Gi/Gq, e interviene en diversas funciones ilustradas en la figura 2.[19, 21, 22, 23]

La estimulación de M1 por agonistas de ACh ha probado mejorar la generación de sPPAα y reducir la producción de βA por su acción en la vía de proteíncinasa C (PKC) y la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK 1/2) que, a su vez, se relacionan en la activación de α-secretasa. Igualmente, altera los niveles de BACE-1 por un mecanismo aún desconocido. [21, 22]

La activación de M1 genera neuroprotección contra la neurotoxicidad inducida por βA a través de su acción en la vía de señalización Wnt/β-catenina. Además, ejerce acción inactivando la vía de glucógeno sintasa cinasa-3β (GSK3β) y con ello estabilizando a β-catenina, induciendo la expresión de genes diana de Wnt que se implican en supervivencia neuronal. La acción de M1 no solo se limita a intervenir en βA, igualmente inhibe la fosforilación de tau, ya que GSK3β es la cinasa principal implicada en la fosforilación de tau.[22]

Adicionalmente, M1 está implicado en la protección contra factores apoptóticos como el daño en DNA, disfunción mitocondrial, activación de la vía de las caspasas y estrés oxidativo. Finalmente, protege contra la disminución del flujo sanguíneo cerebral que ha sido reportado como una de las características principales de la EA.[19, 22]

Es necesario resaltar que βA en la EA, induce el desacoplamiento de M1 con su proteína G, así como su activación, con ello antagonizando la función de M1; esto por interacciones aún no conocidas pero que sugieren ser por cambios en las características del receptor M1 que inducen acoplamiento.[22, 24, 25]

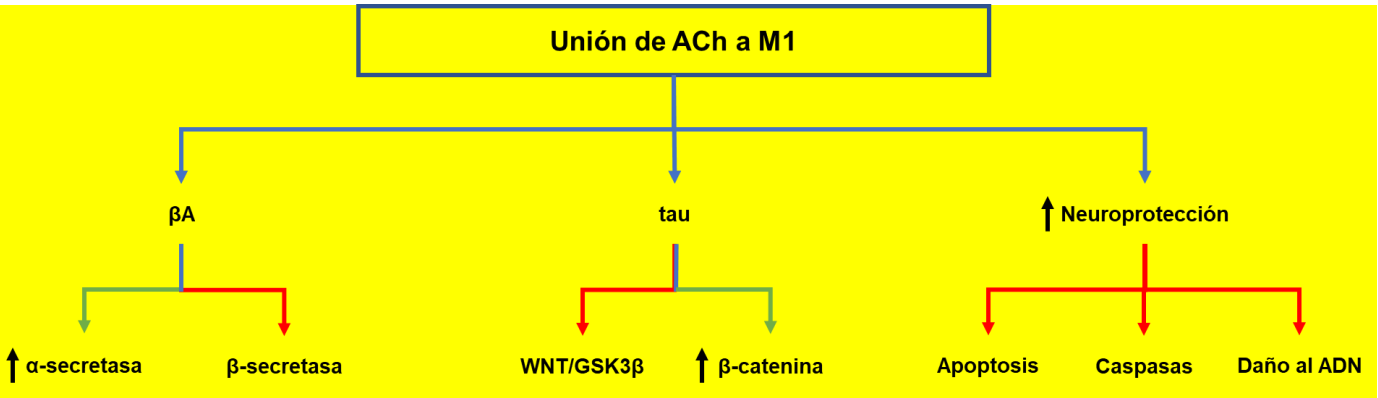


FIGURA 3 EFECTOS DE ACH MEDIANTE SU UNION AL RECEPTOR M1 EN LA EA

En rojo se presentan las vías que son inhibidas por la acción del receptor M1 estimulado por la ACh; las vías favorecidas se presentan de color verde. [19, 22, 24]

*ACh: Acetilcolina. M1: Receptor muscarínico de tipo 1. βA: Beta amiloide. Tau: Proteína de unión a tubulina.

3.7 Correlación entre las teorías amiloidogénica, colinérgica y de fosforilación de tau

La formación de complejos βA conlleva la generación de neuroinflamación y muerte neuronal en las vías colinérgicas, especialmente en el NBM, lo que condiciona alteración en el metabolismo de la ACh de diversas formas, siendo las principales un aumento en la actividad hidrolítica de la AChE a, afectando la síntesis de ACh, la cual se ve disminuida por reducción de la actividad de la ChAT y, finalmente, por acción directa sobre la ACh.[21]

Todo esto es regulado por una retroalimentación positiva producida por el aumento en la formación de péptido βA y aumento de la fosforilación de la proteína tau que, a su vez, produce su desestabilización y formación de oligómeros, y con ello, contribuyendo a la formación de las placas amiloides y las marañas neurofibrilares, que son las marcas fisiopatológicas de la EA (Figura 3).[21, 22]

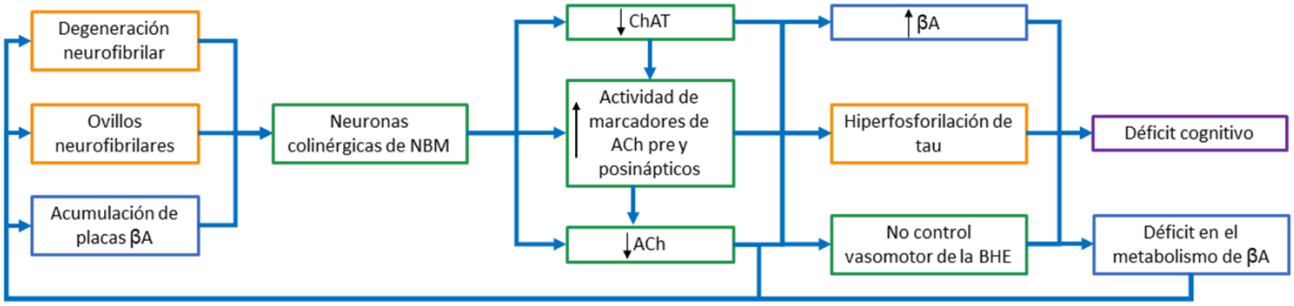


FIGURA 4 CORRELACIÓN DE LAS TEORÍA PRINCIPALES

En cuadros azules se presentan los cambios fisiopatológicos de la hipótesis amiloide, en cuadros verdes los cambios de la hipótesis colinérgica y en cuados naranjas los cambios en la hipótesis de tau, las ↓ refieren disminución de la concentración, al contrario de las ↑, las cuales aluden a un aumento .

*βA: Beta amiloide. NBM: Núcleo Basal de Meynert. ChAT: Colin-acetil transferasa. ACh: Acetilcolina. tau: Proteína de unión a tubulina. BHE: Barrera hematoencefálica. [21, 22]

3.8 Complejos βA-AChE

En estudios *in vivo* se ha comprobado que la interacción entre βA y AChE forma complejos βA-AChE, ocasionando la aceleración de la agregación del βA, además de incrementar el tamaño de los agregados y generar depósitos de βA más grandes. Igualmente, se ha observado que produce mayor inflamación y muerte neuronal cuando se generan los complejos βA-AChE, demostrando que estos complejos son más tóxicos que las fibrillas βA.[24, 26, 27]

Los complejos βA-AChE ocasionan cambios en el recambio de calcio, decrementando los niveles de su influjo en las neuronas, observándose la salida de este hacia el espacio extracelular. Aún no se conoce cuál es el canal implicado en este proceso, este cambió ocasiona desequilibrio en la homeostasis de Ca^{+2}/K^{+} siendo propuesto como un mecanismo de neurotoxicidad.[26, 27, 28]

Se ha observado que los complejos inducen la activación de la AChE mediada por la apertura de los canales de calcio tipo L, aumentando la producción de la isoforma monomérica anfifílica de la misma, y con ello favoreciendo su actividad hidrolítica.[28]

Y en un estudio más actual realizado por Zueva et al. en el 2023, se observó un incremento de la actividad catalítica de AChE *in vitro* por la formación de complejos de βA-AChE, teorizando que esto es debido al incremento de la activación más que

estos contribuyan en la estabilización de la enzima, ya que no se observan efectos en la hidrólisis de ACh, demostrando que para la activación de AChE es necesaria la formación de oligómeros de βA. En este mismo estudio se preguntaron sí los complejos βA-AChE podían afectar el funcionamiento de los inhibidores de AChE, demostrando por medio de un experimento *in vitro* donde hubo disminución de la inhibición del donepezilo por la presencia de βA.[29]

3.9 Neuroinflamación producida durante la EA

La neuroinflamación es un complejo sistema de respuesta celular inmune del sistema nervioso central (SNC) que se presenta ante un estímulo y que afecta la actividad basal celular, estos estímulos pueden ser distintos, tales como infecciones, trauma, isquemia y toxinas. El cerebro esta protegido en condiciones fisiológicas por la barrera hematoencefálica (BHE) que limita el paso de las células inmunológicas periféricas, con ello regulando y limitando la respuesta inflamatoria que se presenta en el mismo. En consecuencia, una de las células que participa en la respuesta inflamatoria es la microglía, células fagocíticas que consta de alrededor del 10% de las células del SNC, la cual ejerce acción en la plasticidad neuronal, neurogénesis y defensa ante estímulos nocivos en el SNC. Esta tiene la capacidad de expresar factores pro y antiinflamatorios. [30, 31, 32]

Cuando un estímulo nocivo afecta a la microglía se modifica su morfología y perfil genético, cambiando al fenotipo proinflamatorio que genera citocinas y quimiocinas proinflamatorias destacando al factor necrosis tumoral α (TNF-α) y la interleucina 1β (IL-1β), que se relacionan con la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que ayudan a la eliminación del estímulo nocivo y la reparación tisular, pero que, en algunas patologías, fungen como un retroalimentación positivo que promueve la muerte neuronal, pérdida de sinapsis, inhibición de la neurogénesis, alteración del metabolismo de los neurotransmisores, reducción del soporte neurotrófico, daño a la BHE y, si es crónico, deterioro cognitivo, alteración motora y pérdida de la memoria. [30, 31, 32]

En la respuesta neuroinflamatoria también participan otras células del sistema inmune innato del SNC, como los astrocitos y células endoteliales; además, cuando la BHE se encuentra dañada, las células inmunitarias sistémicas logran infiltrarse en el SNC, contribuyendo todas al proceso neuroinflamatorio. En condiciones de enfermedades neurodegenerativas, la respuesta neuroinflamatoria se mantiene de manera crónica, este mecanismo se observa en distintas patologías neurológicas, como la depresión, enfermedad de Parkinson y en la EA.[30, 31]

En la EA, la neuroinflamación ejerce un papel importante. Diversos estudios corroboran la activación exacerbada de las células de la microglía y los astrocitos, así como la alta expresión de factores proinflamatorios en la misma patología. Además, se ha observado alta concentración y acumulación de mediadores inflamatorios alrededor de las marañas neurofibrilares y las placas amiloides, que generan un entorno neuroinflamatorio. [32]

Las citocinas principales encontradas en el cerebro en pacientes con EA son TNF-α e interleucina 6 (IL-6), las cuales tienen la capacidad de aumentar la actividad de BACE 1 y el factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas (NF-κB), este último encargado de la activación de la fagocitosis por las células de la microglía.[32]

3.10 Fármacos actuales para EA

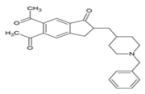
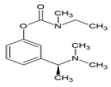
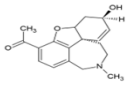
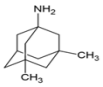
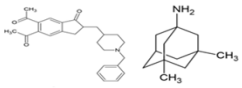
La amplia investigación de las marcas fisiopatológicas de la EA ha llevado a la generación de distintas líneas de investigación, en el desarrollo y evaluación de fármacos que se orientan con una o varias dianas terapéuticas (*multitarget*).

El tratamiento farmacológico actual consta de 5 fármacos principales, los cuales han sido aprobados por la *Food and Drugs Administration* (FDA) en Estados Unidos, 3 son inhibidores de AChE (*donepezilo, galantamina, rivastigmina*), un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (*memantina*) y un último fármaco que combina ambos mecanismos (*namzaric*), los primeros cuatro han sido aprobados igualmente por la Unión Europea.[33, 34]

Sin embargo, el tratamiento se enfoca en la reducción de la sintomatología y no es curativo, además de perder eficacia con el paso del tiempo, así como poseer distintos efectos secundarios y adversos, tal y como se describen en la tabla 1.[1, 33, 34]

Por lo que la investigación en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la EA ha buscado desarrollar distintos compuestos para una amplia variedad de dianas farmacológicas, que puedan generar disminución significativa del progreso de la enfermedad y con ello mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen.

TABLA 1 FÁRMACOS ACTUALES PARA EA

Fármaco	Mecanismo de acción	Año de aprobación	Indicación	Eficacia terapéutica	Efectos advesos	Estructura química
Donepezilo (Aricept)	Inhibidor de la colinesterasa	1996	Demencia leve-moderada	Modesta reducción de la sintomatología	Náuseas, vómitos, pérdida del apetito, calambres, dolor de cabeza y sueños poco placenteros.	
Rivastigmina (Exelon)		2000				
Galantamina (Razadyne)		2001				
Memantina (Namenda)	Bloqueador no competitivo del canal de NMDA	2003	Demencia moderada-severa		Menos	
Namzaric	Ambos mecanismos	2014			N/A	

N/A: No aplica [1, 33, 34]

Un fármaco que es de importancia destacar para este protocolo es la galantamina, inhibidor de la AChE aprobado el año 2001 que, desde entonces, ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de la EA. En estudios previos, se probó este fármaco en el modelo de EA por βA intrahipocampal y se cuantificaron sus efectos en pruebas conductuales, incluyendo la prueba de evitación pasiva y pruebas de motricidad; igualmente, ya se han hecho amplios estudios sobre sus efectos en las pruebas bioquímicas, en las que se incluyen la cuantificación de la actividad de AChE y βA. [35, 36, 37]

Los antecedentes recopilados nos permitieron utilizar la galantamina para comparar sus efectos con los del nuevo compuesto en el modelo de EA por βA intracortical.

3.11 Fármacos derivados de benzotiazolisotiureas

Los benzotiazoles son compuestos miembros de la familia de benzotiazoles, los cuales, son compuestos heterobicíclicos aromáticos con un núcleo de benceno unido en la posición 4 y 5 del anillo tiazol, la estructura de estos se ilustra en la figura 4A.[6, 38]

Los benzotiazoles son importantes farmacóforos en la química medicinal y, debido a la gran diversidad de propiedades farmacológicas, se han utilizado en diferentes líneas de investigación. Su amplia variedad de propiedades químicas depende de la naturaleza y posición de sus sustituyentes, estas moléculas poseen un amplio rango de actividades biológicas que son útiles en farmacología. Las mayormente estudiadas son las propiedades antitumorales, sin embargo, otras de sus

propiedades reportadas son como anticonvulsivo, antiviral, antituberculoso, antimalárico, antiparasitario, diurético, analgésico, antimicrobiano, antiinflamatorio, antidiabético y antioxidante, entre otras actividades que continúan en investigación.[6, 38, 39, 40]

Algunos derivados de benzotiazoles se han utilizado en el tratamiento para diversas enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica, en la cual se le ha relacionado con propiedades neuroprotectoras, como inhibidor no competitivo del receptor NMDA. [6, 38, 39]

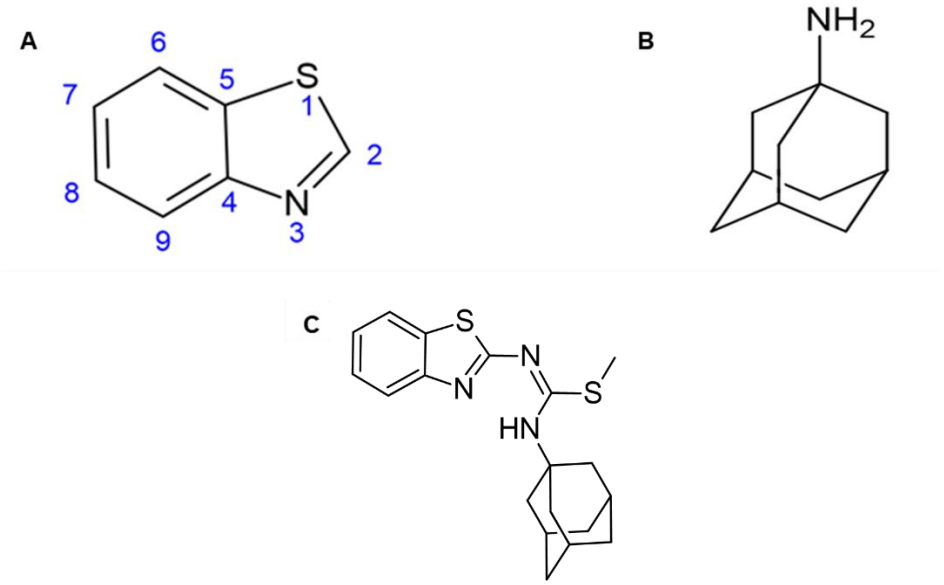


FIGURA 5 ESTRUCTURA DE LOS BENZOTIAZOLES

A. Anillo de benzotiazol B. Adamantadina C. Adamantan-1-il-3-benzotiazol-2-il-2-metil-isotiurea (3f) [Rosales M., et al, 2022]

Relacionado con la EA, los benzotiazoles se han propuesto como posibles farmacóforos para el desarrollo de fármacos que disminuyan la sintomatología y reduzcan la progresión de la enfermedad debido a su alta afinidad a AChE en su sitio activo catalítico (SAC), que los propone como potentes inhibidores de la AChE.[40, 41]

El adamantano es una molécula que resulta de la unión de 3 ciclohexanos con alta simetría y arreglo espacial de los átomos similares a diamantes. La adamantadina (adamantan-1-amina) (figura 4B) fue el primer derivado de adamantano con aplicación medicinal y ha demostrado un amplio rango de actividades biológicas, respecto a su utilidad como fármaco, tuvo su primer uso como tratamiento para la enfermedad de Parkinson desde hace más de 50 años, recientemente para la enfermedad de Huntington y desde hace 10 años para el tratamiento de EA.[7, 41]

Rosales M. y colaboradores (2022) evaluaron el acoplamiento con βA_{1-42} y AChE de 22 compuestos derivados de benzotiazolisotiurea con posible efecto inhibidor de AChE y de la agregación de βA_{1-42}, por medio de *docking* molecular, y seleccionaron uno de los mejores compuestos con mejor afinidad hacia βA y AChE, el cual se sintetizó y caracterizó, siendo el compuesto **1-Adamantan-1-il-3-benzotiazol-2-il-2-metil-isotiurea ("3f")** (figura 4C).[7, 42]

En el acoplamiento molecular con βA_{1-42} en su conformación α-hélice obtuvo un ΔG=-6.02 Kcal/mol (Un valor más negativo de ΔG indica una mejor afinidad entre el ligando y la proteína) y presentó interacción con los residuos F20, F19, Q15, V12, H14, E11, D7, V18, E22, E23 y N27, destacando los residuos E22 y D23, aminoácidos de importancia en el cambio de la forma hélice-α a lámina-β, mientras que la curcumina obtuvo un ΔG=-4.76 Kcal/mol e hizo interacción con los residuos H13, H14, K16, L17, V18, A21, E22, V24, G25 y S26. Mientras el acoplamiento del **compuesto 3f** con AChE obtuvo un ΔG=-7.49 Kcal/mol e interacción con los residuos W86, D74, R296, F295, V294, Y341 y F338, destacando los residuos D74, Y341 de unión al sitio periférico de unión a aniones (función en la orientación de la parte catiónica de la enzima) y F338 que se une al sitio acil (sitio de unió al grupo acetil de la ACh y regula la catálisis) en comparación con la ΔG=-6.9 Kcal/mol en Y341, S293, V294, F295, R296 y F297 de la galantamina.[43]

Posteriormente se sintetizó y se evaluó su actividad *in vitro*, donde se realizó una cinética enzimática para evaluar la actividad de AChE, observándose disminución de la actividad a concentraciones de 80-120 µM del compuesto, sin embargo a las concentraciones evaluadas no fue posible determinar una constante de inhibición (Ki) (figura 5A).[43]

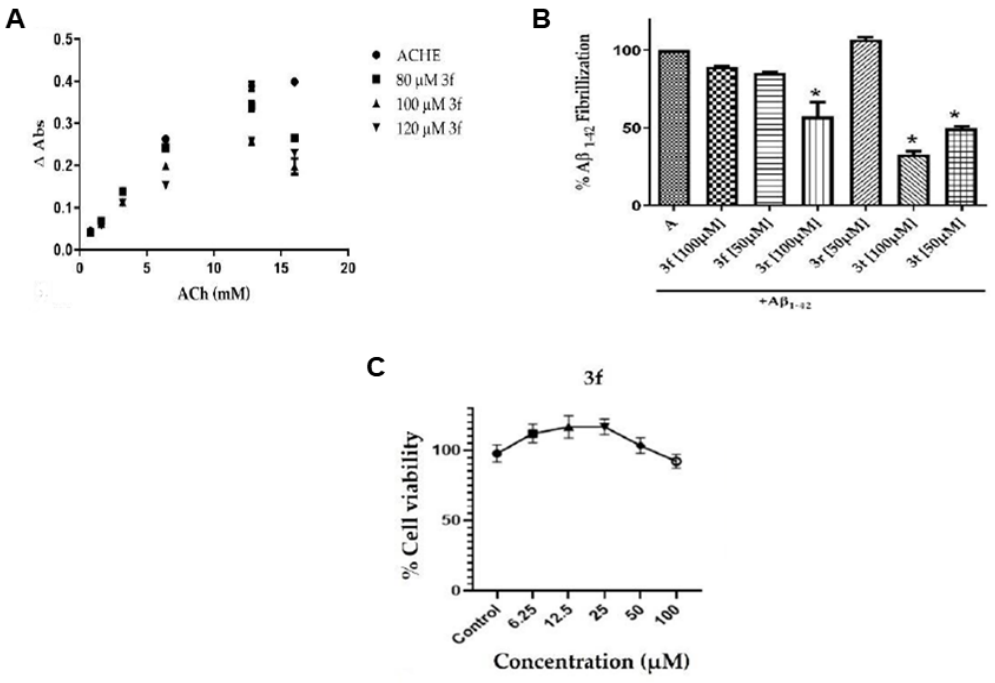


FIGURA 6 PRUEBAS IN VITRO DEL COMPUESTO 3F

*ABS: Absorción. ACh: Acetilcolina. ACHE: Acetilcolinesterasa. $A\beta_{1-42}$: Beta amiloide$_{1-42}$.

A. Evaluación de la actividad de AChE B. Evaluación de la actividad antiagregante de 3f C. Evaluación de la viabilidad celular del compuesto 3f [Rosales M., et al, 2022]

Su efecto como antiagregante de βA se evaluó por medio del ensayo de fluorescencia de Tioflavina T (ThT, por sus siglas en inglés *Thioflavin-T fluorescent assay*), cuyo fundamento es su unión de ThT a la forma oligomerizada y fibrilar del péptido βA, con lo cual aumenta su intensidad de fluorescencia, en los resultados obtenidos se observó una disminución en la oligomerización de βA (figura 5B).[40]

Para la evaluación de la actividad citotóxica, agregaron el **compuesto 3f** a una línea celular PC12 usando el ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual es un ensayo colorimétrico que se basa en la reducción de una sal de tetrazolio a cristales de formazán de color morado por las células metabólicamente activas. Los resultados obtenidos arrojaron que **3f** obtuvo 100% de viabilidad hasta concentraciones de 100 µM (figura 5C).[44, 45]

3.12 Modelos de estudio en la EA

Los modelos de estudio de EA *in vivo* buscan reproducir las características de la enfermedad, como son deposición de placas βA, daño neuronal, formación de marañas neurofibrilares y neuronflamación crónica. Los estudios en modelos

animales de EA son diversos e incluyen distintos tipos de abordajes en los que se busca generar la enfermedad por distintos medios, como los ratones o ratas transgénicos basados en una marca especifica de la enfermedad, como son APP, proteína tau o en la presenilina (PSEN).[46, 47]Además, la inducción de EA por la administración, directamente en el cerebro o por vía sistémica de alguna molécula o compuesto.

Uno de los modelos más utilizados para la evaluación de compuestos con actividad farmacológica, es la reproducción de lesiones específicas en cerebros de ratas mediante la administración intracortical o intrahipocampal de βA. En el cual, más que imitar las marcas histológicas de la EA en el cerebro, se enfoca en replicar el incremento de βA de manera espaciotemporal, previniendo cualquier efecto compensatorio o efecto secundario que se suelen observar en los otros modelos de estudio, como los modelos transgénicos.[48, 49, 50]

Diversos estudios han corroborado que la administración aguda de βA externa deteriora el aprendizaje y el procesamiento de memoria. Estos efectos pueden estar relacionados con la disfunción en la actividad neuronal causada por el péptido, ya que el βA ha mostrado tener efectos a distintos niveles de la función neuronal. Adicionalmente, se han observado efectos en la memoria a corto y largo plazo en 21 días después de la administración de βA.[50, 51, 52]

La evidencia actual muestra que una de las principales consecuencias de la inyección intracortical de βA es el aumento progresivo de la respuesta inflamatoria mediante la activación y proliferación de la microglía (microgliosis), la cual se ha relacionado con cambios en el flujo sanguíneo, incluyendo cambios en la BHE. Adicionalmente, se le ha relacionado con cambios moleculares y celulares que involucran la función de los astrocitos (astrocitosis) (figura 6). [48]

En la figura 6 se ilustran las consecuencias de la administración de oligómeros de βA directamente en la corteza por cirugía estereotáxica, la cual ocasiona la formación de agregados de βA que replican su formación en la EA. La acción mecánica de la aguja misma ocasiona un proceso inflamatorio, el cual, también busca imitar al presente en la misma patología, sin embargo, se ha reportado que esta neuroinflamación puede ser exagerada y no replicar a la presente en la enfermedad, tomándose esta neuroinflamación exacerbada como una posible desventaja.[50, 51]

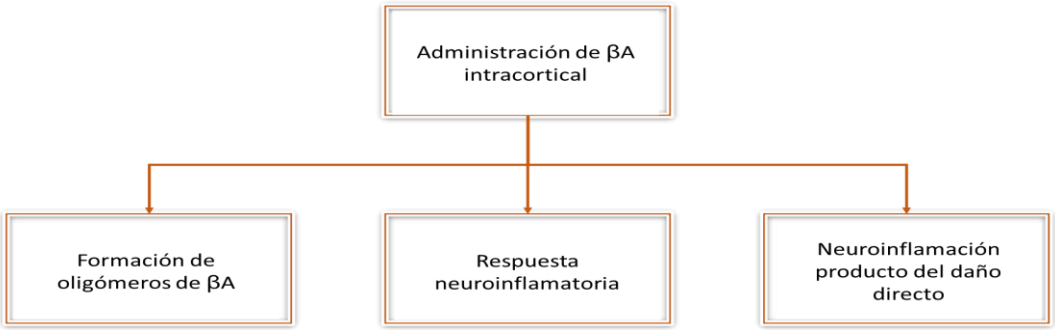


FIGURA 7 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BETA-AMILOIDE INTRACORTICAL

*βA: Beta amiloide [48]

3.13 Pruebas conductuales

La memoria es definida como la habilidad de almacenar, mantener y recuperar información. Su generación consiste en 3 fases: 1. Codificación, que consiste en el registro e integración de la información obtenida. 2. Almacenamiento y 3. Recuperación de la información. El aprendizaje es la adquisición de la información que modifica la memoria y el comportamiento.[53, 54]

Los cambios fisiopatológicos de la EA producen el cuadro clínico caracterizado por diversos cambios conductuales, siendo muy característico la afección de la memoria, sin embargo, la evaluación del déficit en la memoria y el aprendizaje en humanos es una tarea difícil, debido a la complejidad de los sistemas implicados, por lo que se han desarrollado modelos y pruebas con el fin de estudiarlos.[53]

Los modelos en animales han sido utilizados por más de 100 años para la evaluación de la memoria y el aprendizaje, y siguen siendo utilizados actualmente en las investigaciones sobre los trastornos neurodegenerativos, como enfermedad de Parkinson, Huntington, entre otros, siendo uno de estos la EA. Esto es porque el hipocampo, el cual se ve afectado en la EA, tiene un papel importante en el proceso de la memoria y el aprendizaje. Las funciones cognitivas se relacionan con la acción de los receptores muscarínicos de la ACh del hipocampo que regulan la plasticidad sináptica, incluyendo la potenciación a largo plazo (PLP), la cual es el modelo principal de modificación sináptica en el hipocampo.[53, 54, 55]

En diversos estudios se comprueba la implicación de la vía colinérgica en el proceso de memoria y aprendizaje. Se ha reportado que la escopolamina, un antagonista de los receptores muscarínicos, causa deterioro de la memoria y aprendizaje al impedir el acoplamiento de la ACh con su receptor, por ello se ha utilizado como un modelo de demencia y EA. [53]

La inhibición colinérgica afecta el proceso de codificación y consolidación de la memoria, otros fármacos antagonistas colinérgicos no selectivos producen amnesia

preentrenamiento y posentrenamiento en ratas y, finalmente, se ha observado que los agonistas muscarínicos mejoran la PLP y los antagonistas la interrumpen. [53, 55, 56, 57, 58]

La galantamina, un inhibidor competitivo de AChE, ha mostrado revertir la amnesia producida por escopolamina en modelos murinos.[59, 60]

De entre las pruebas de evaluación conductual, una de las principales y más utilizadas para evaluar la memoria y el aprendizaje es la prueba de evitación pasiva, la cual evalúa la memoria no declarativa (conceptual) que se ve afectada en los trastornos neuronales de animales pequeños. [53, 54, 55]

Esta prueba se aprovecha de la conducta innata de los roedores para explorar ambientes oscuros y de la capacidad de aprendizaje del animal para evadir estímulos dolorosos. Consiste en 3 sesiones realizadas en 2 días consecutivos, donde la primera sesión consiste en un entrenamiento en el que el animal es sometido a un choque eléctrico no dañino cuando entra al contenedor oscuro, guardando así en la memoria la asociación entre estimulo doloroso y los ambientes oscuros. Posteriormente, es evaluada la memoria a corto plazo, siendo sometido al mismo ambiente 5-10 minutos después y, finalmente, se evalúa la memoria a largo plazo, repitiendo el procedimiento a las 24 horas. Se cuantifica el tiempo que tarda el animal de experimentación para entrar al contenedor oscuro, siendo este llamado tiempo de latencia de entrada, el cual es un indicador de la capacidad motora y de memoria del animal, ya que un mayor tiempo de latencia figura mejor desempeño conductual y por ende, menos afección de la memoria.[55]

Otra prueba importante para la evaluación conductual en roedores es la prueba de campo abierto, la cual consiste en evaluar la actividad locomotora espontánea bajo la necesidad de explorar, cuando el animal es sometido a un ambiente nuevo. Esta prueba es utilizada también para la evaluación de la memoria espacial y se asocia con procesos ventrales y dorsales que permiten evaluar la capacidad del animal de identificarse a sí mismo en el entorno.[55]

Para esto se debe definir que es la actividad motora, esta hace referencia a la suma de todos los movimientos horizontales que el cuerpo del animal realiza desde su posición presente, hacía un área adyacente de sus alrededores. La cantidad total de movimientos es determinada por distintos factores, siendo el principalmente evaluado el estado locomotor en el que se encuentre. Otros factores que pueden influir son el factor genético del animal, experiencias previas que haya tenido, estado emocional en el que se encuentra el roedor, al igual que el propio ambiente al cual se le coloca, ya que este último puede generar miedo o ansiedad y contribuir con la inactividad.[55, 61]

La prueba consiste en evaluar como el animal de experimentación se mueve en un ambiente abierto (Caja de metal o plástico de medidas variables), en 2 sesiones, en la primera se le permite explorar hasta que se acostumbre al nuevo ambiente, esto

se puede producir en un periodo de 2-10 minutos, pero se ha reportado que se necesitan de al menos 2-3 minutos, siendo usualmente la evaluación a los 5 minutos. [55, 62, 63]

Posteriormente, se vuelve a evaluar al roedor 24 h después, sesión donde se pueden evaluar varios aspectos como son. [62, 63, 64]

- Actividad motora total o locomoción horizontal: Es el número de veces que el roedor cruzó y con ello, interrumpió el paso del rayo de luz infrarrojo, demostrando un movimiento.
- Levantamientos: Es el número de veces en las que el animal de experimentación cambia de postura sedestante a una postura vertical respecto al piso.
- Tiempo en zona de interés: Se delimitan dos zonas, una cercana al centro de la cámara (zona de interés) y otra en la zona periférica; de manera normal, los roedores pasan la mayor parte de la prueba recorriendo las partes cercanas a los muros (tigmotáxia), pudiendo incluso intentar escalarlos, denotando una capacidad motriz funcional, sin embargo, cuando su capacidad motriz ha disminuido, se mantendrá mayor tiempo en la zona de interés, tiempo que se mide.
- Distancia recorrida total: La cantidad total de la distancia recorrida es una medida directa de la capacidad de movimiento de los animales de experimentación.[55, 62]

Con los antecedentes sobre la EA, así como del **compuesto 3f**, se analizó la posibilidad para realizar un protocolo con el objetivo de contribuir en el conocimiento de la enfermedad, así como del efecto del **compuesto 3f** en un modelo *in vivo* de EA.

4. Planteamiento del problema

La EA es una enfermedad sumamente incapacitante para el paciente, sus familiares y personas cercanas, siendo una de las enfermedades más prevalentes en el mundo y causa un gasto económico >1% del PIB mundial, cada 3.2 segundos hay un nuevo caso diagnosticado de este trastorno tanto a nivel mundial como en México, igualmente alrededor del 8% de los adultos mayores la padecen en todo el mundo. Actualmente son pocos los tratamientos efectivos y no hay tratamiento curativo.[3, 4, 65]

Los fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de esta enfermedad se basan en un solo blanco farmacológico, y recordando que la etiopatogenia de la EA es multifactorial, podría resultar mejor tener una sola molécula para varios blancos (*multitarget*). Debido a lo anterior, se han realizado varias investigaciones que permiten la evaluación de moléculas con otros farmacóforos diferentes a los que poseen moléculas aprobadas por la FDA para el tratamiento de la EA. Por lo que se ha buscado evaluar un compuesto derivados de benzotiazolisotiurea como molécula *multitarget* encontrando que esta podría modificar el curso natural de la EA.

5. Justificación

Los tratamientos actuales para la EA se basan en 2 grupos de fármacos, los inhibidores de AChE y los bloqueadores no competitivos del receptor NMDA. Sin embargo, estos han resultado ser un tratamiento mayormente sintomático y no han mostrado resultados favorables para retrasar el progreso de la enfermedad.

Actualmente, la búsqueda y desarrollo de nuevas opciones terapéuticas es un foco de atención en la investigación de la EA, esto con el fin de resolver los problemas en salud pública mundial generados por su creciente incidencia aunado al incremento en la esperanza de vida. Por lo que, desarrollar protocolos enfocados en la búsqueda de nuevos compuestos capaces de actuar en dianas etiopatogénicas de la EA y evaluar sus efectos terapéuticos es de gran interés hoy en día.

En el grupo de estudio del laboratorio de biofísica de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional se han realizado estudios previos en los cuales se han generado compuestos derivados de benzotiazolilisotiureas (**compuesto 3f**) y se han realizado ensayos *in sílico* que han mostrado resultados favorables en acoplamiento con βA y AChE, dos dianas terapéuticas de relevancia en la EA, que los proponen como candidatos prometedores con acción *multitarget*.

Debido a lo anterior, se decidió continuar con la evaluación del **compuesto 3f** para valorar su efecto en un modelo *in vivo* de ratas Wistar inducido por administración intracortical de βA_{1-42}.

6. Hipótesis

El tratamiento con el **compuesto 3f** disminuirá la actividad de AChE y la cantidad de βA y con ello mejorará el déficit cognitivo en el modelo animal inducido por administración intracortical de βA_{1-42}.

H_0 El grupo administrado con **compuesto 3f** no presentará diferencias estadísticamente significativas en la actividad de AChE y la cuantificación de βA en hipocampo y corteza, respecto al grupo administrado con solución salina al 0.9%.

H_a: El grupo administrado con **compuesto 3f** presentará diferencias estadísticamente significativas en la actividad de AChE y la cuantificación de βA del hipocampo y corteza, respecto al grupo administrado solución salina al 0.9%.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración por 21 días del **compuesto 3f** sobre el deterioro cognitivo, la actividad enzimática de AChE y la cuantificación de βA en un modelo de EA inducido por la administración intracortical de βA.

7.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar y administrar βA_{1-42} intracortical mediante cirugía estereotáxica.
2. Administrar el **compuesto 3f** por vía intraperitoneal a un grupo de animales de experimentación inducidas con EA con βA_{1-42} intracortical.
3. Evaluar el deterioro cognitivo a través de la prueba de evitación pasiva y prueba de campo abierto.
4. Cuantificar la actividad de AChE en presencia de βA_{1-42} puro y en las muestras de hipocampo y corteza por el método Bonting-Featherstone.
5. Cuantificar las proteínas totales por el método Bradford y la expresión proteica de βA_{1-42} en hipocampo y corteza por el método ELISA.

8. Metodología

8.1 Animales de experimentación

Se ocuparon 32 ratas Wistar macho, con peso de 200 ± 80 g, fueron mantenidas en jaulas de acrílico de 31 X 59 X 20.5 cm con 6 mm de espesor de acrílico en un área acondicionada del laboratorio de Biofísica y Biocatálisis de la Escuela Superior de Medicina, en jaulas separadas con 2 ratas por cada una. Las ratas se mantuvieron con ciclos luz/obscuridad de 12/12 h (8:00pm-8:00am de luz), a temperatura ambiente, la comida (RatChow5012, Purina) y agua se dieron *ad libitum* y se aclimataron durante una semana.

Los cuidados de los animales de experimentación se hicieron siguiendo los lineamientos de la Declaración de Helsinki y con la Norma Mexicana en la materia (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, SAGARPA) mismos que fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-01/01-06-2015) de la ESM-IPN. Todos los animales se manipularon y realizó eutanasia de acuerdo con las consideraciones del punto final humanitario.

8.2 Formación de oligómeros de βA_{1-42}

Se incubaron 250 µg de péptido βA_{1-42} humano (Calbiochem ® cat: PP69-.25 mg β-Amyloid Peptide (1-42), Human. Lot:2681394) diluidos en 100 µL de agua miliQ dentro de un vial a 37º C durante 24 h con agitación constante, posteriormente se guardó a -20°C.

8.3 Estandarización de la cirugía estereotáxica

Se realizó la estandarización de la cirugía, donde los animales de experimentación fueron anestesiados con pentobarbital sódico a dosis de 50 mg/Kg (PiSA agropecuario) vía I.P., se colocó y fijó al animal en el aparato estereotáxico, se realizó disección por planos hasta observar la sutura sagital y visualizar adecuadamente el punto Bregma. Se realizó craneotomía bilateral de aproximadamente 2 mm de diámetro en las coordenadas AP -3.2 ML 1.8 y DV 1.7, región S1Tr de la corteza obtenidas del atlas de Paxinos y Watson (1980); utilizando una aguja de 30 G (Thermo Dental Needle) y jeringa Hamilton de 10 µL. Se realizó administración con 5 µL de eosina Y en solución alcohólica (0.5% p/v) a una

velocidad de infusión de 0.5 µL/min, se mantuvo la aguja en el sitio durante 2 min para evitar reflujo. Posteriormente, se realizó una segunda administración con pentobarbital sódico 60 mg/Kg (PiSA agropecuario) vía I.P. para el sacrificio y posterior extracción del encéfalo para fijación por inmersión en 50 mL de paraformaldehído 4% en PBS (1X pH 7.4) por 72 h, para después realizarse los cortes histológicos y se observaron a microscopia óptica a 4X y 20X. [66]

8.4 Grupos de experimentación

Se organizó un esquema de trabajo (figura 7) para el que se generaron aleatoriamente cinco grupos de ratas (n=8), dividiéndolos de la siguiente manera. Control (**GC**): Grupo intacto. Grupo βA + Solución Salina (SS) 0.9% (**GBASS**): administrado con 2.5 µL de βA_{1-42} protofibrillar 553 µM intracortical bilateral en S1Tr + 1 mL/Kg de solución salina al 0.9% I.P. durante 21 días. Grupo βA + Galantamina (**GBAG**): administrado con 2.5 µL de βA_{1-42} protofibrillar 553 µM intracortical bilateral en S1Tr + 2 mg/Kg Galantamina diluido en 1 mL SS al 0.9% I.P. durante 21 días. Grupo βA + **compuesto 3f** (**GBA3f**): administrado con 2.5 µL de βA_{1-42} protofibrillar 553 µM intracortical bilateral en S1Tr + 0.74 mg/Kg (relación mol a mol con galantamina diluido en 1 mL de SS al 0.9%) I.P. durante 21 días. El **compuesto 3f** fue donado por el Dr. Alejandro Cruz del laboratorio de investigación básica de UPIBI IPN.

Una vez pasados los 21 días de administración peritoneal por grupo, se realizaron las pruebas conductuales, concluidas las pruebas, se realizó eutanasia de los animales de experimentación con pentobarbital sódico a dosis de 80 mg/Kg, posteriormente se realizó extracción del hipocampo y la corteza, los cuales fueron almacenados a -80°C hasta su uso para las pruebas bioquímicas.

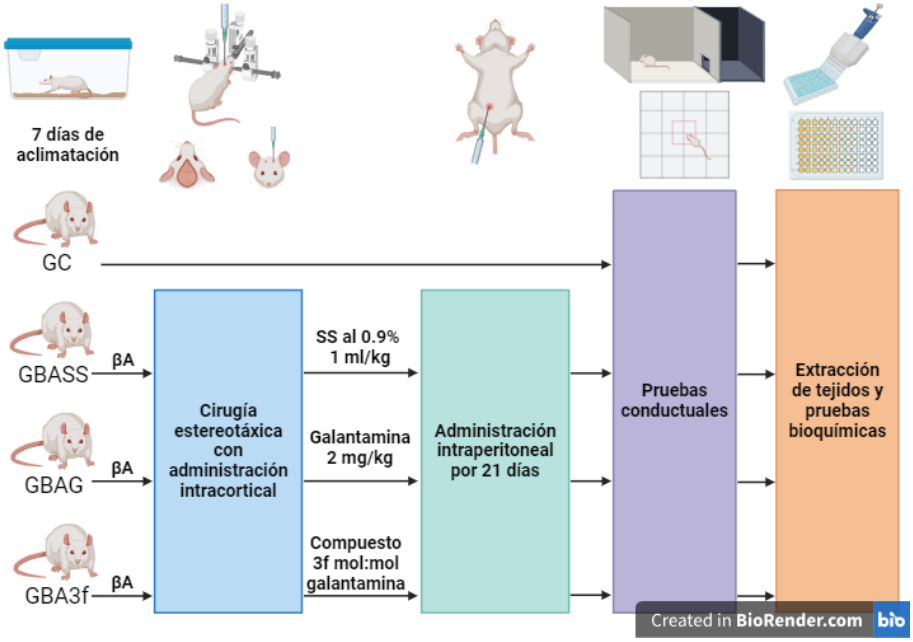


FIGURA 8 ESQUEMA DE TRABAJO

* GC: Grupo control. GBASS: Grupo βA + Solución salina al 0.9%. GBAG: Grupo βA + Galantamina. GBA3f Grupo βA + Compuesto 3f. βA: Beta amiloide. SS: Solución salina

8.5 Administración intracortical de βA_{1-42}

Los animales de experimentación fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina 60 mg/Kg (Ketamin-Pet Aranda®) y xilazina 10 mg/Kg (PiSA agropecuario) vía I.P.[67] Se colocó y fijó al animal en el marco estereotáxico (Stoeleting ®) y se realizó la administración con la misma técnica que la estandarización. Se administraron 2.5 µL de βA_{1-42} protofibrillar 553 µM bilateral a una velocidad de infusión de 0.5 µL/min, se mantuvo la aguja en el sitio durante 2 min para evitar reflujo. Después de la administración bilateral se suturó la herida quirúrgica en un solo plano utilizando Nylon 3-0 (Surgycal®), y se administró 5 mg/Kg de Gentamicina tópica en la herida quirúrgica, más 5 mg/Kg intramuscular (I.M.) dosis únicas. Se mantuvieron en aislamiento postquirúrgico en jaulas individuales durante 2 días con las condiciones mencionadas, los días restantes se mantuvieron 2 ratas por jaula.

8.6 Evaluación del deterioro cognitivo

Pasados 21 días de administración intraperitoneal de cada compuesto por grupo, se realizó la prueba de evitación pasiva. Consistió en tres fases, las cuales se

realizaron en un horario de 9:00-13:00 horas, en un ambiente libre de estímulos luminosos y sonoros distractores.

I. **Entrenamiento**: Los animales de experimentación fueron colocados en la cámara iluminada, donde fueron expuestos a un estímulo luminoso por veinte segundos, posteriormente se apertura la entrada que dirige a la cámara oscura. Se midió el tiempo para cruzar al compartimento oscuro (latencia de entrada). Al entrar la rata a la cámara oscura se cerró la compuerta y se administró una descarga eléctrica de 1 mA con duración de tres segundos. Finalmente, se apertura nuevamente la puerta y se midió el tiempo para regresar a la cámara iluminada (latencia de salida). Posterior a su salida el roedor fue regresada a su caja.
II. **Corto plazo**: Se dejó reposar durante cinco minutos al animal de experimentación en su jaula después del entrenamiento. Pasado este tiempo se repitió el procedimiento colocando a la rata en la cámara iluminada y se aperturó la entrada después de veinte segundos de estímulo luminoso. Se levantó la puerta y se midió el tiempo tomado para cruzar a la cámara obscura (latencia de entrada); se midió el tiempo que permaneció dentro de ella en caso de que entrara (latencia de salida), en esta ocasión no se administró descarga eléctrica.
III. **Largo plazo**: Se dejó descansar por 24 h al animal de experimentación pasado la prueba de corto plazo para volver a realizar la evaluación. Se colocó a la rata en la cámara iluminada por veinte segundos, se abrió la puerta y se midió el tiempo para entrar a la cámara obscura. Así mismo, se midió el tiempo que permaneció dentro de la cámara obscura, igualmente no se administró descarga eléctrica.

En cualquiera de los ensayos se permitió permanecer hasta 300 seg en la cámara iluminada para dar por terminado el ensayo.

8.7 Evaluación de motricidad

La evaluación de la motricidad se realizó por medio de la prueba de campo abierto[65], esta fue realizada en cajas de acrílico opalino de medidas de 100 x 100 x 100 cm, que se divide en 100 cuadrados de 10 x 10 cm, se realizaron 2 sesiones, la primera fue para habituación, en la cual se colocó al animal de experimentación en el centro de la caja para dejarle deambular libremente en esta durante un período de 300 s, después de este período el animal de experimentación es regresado a su jaula, éstos parámetros registrados no son tomados en cuenta para al análisis estadístico.

Posteriormente, pasadas 24 h se vuelve a realizar el ensayo bajo las mismas condiciones, en esta sesión se registró y evaluó por medio del software OMNIALVA

OpenFieldTest, Cd. De México, los siguientes parámetros: 1. Actividad motora total, 2. Número de levantamientos, 3. Distancia recorrida total (cm) y 4. Tiempo en zona de interés (definida por el periodo de tiempo que el animal de experimentación se mantiene entre los cuadrantes 3-8 y de C-H (figura 8). Los ensayos se realizaron durante los horarios de 9:00-13:00 h.

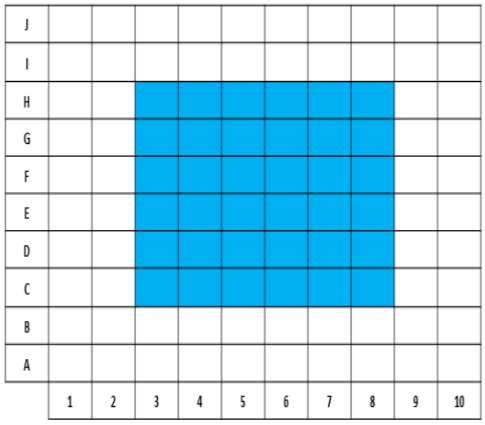


FIGURA 9 REPRESENTACIÓN DE LOS CUADRANTES DEL CAMPO ABIERTO

*La zona azul representa la zona de interés.

8.8 Obtención de las muestras de hipocampo y corteza

Se realizó anestesia con pentobarbital sódico 80 mg/Kg, una vez inducidas, fueron perfundidas con PBS 7.4 pH 1X mediante punción cardiaca. Finalmente, se hizo una incisión con bisturí quirúrgico para exponer el encéfalo, este se desprendió cuidadosamente y se colocó en cajas Petri en baño de hielo y se obtuvo la corteza y el hipocampo de ambos hemisferios, guardándose las muestras en viales de 1.5 ml, donde se almacenaron a –80°C hasta su utilización.

8.9 Cuantificación de actividad de AChE en hipocampo y corteza

Para determinar la actividad de AChE se empleó el método de Bonting-Featherstone. Primero se realizó una curva de ACh en donde se emplearon concentraciones de 1.4, 1.9, 5.3, 10.5 20.6 y 25.8 mM, en un volumen final de 250 µL de buffer de fosfatos 0.1 M 8.0 pH, posteriormente se agregó 20 µL de hidroxilamina alcalina (solución 1:1 de clorhidrato de hidroxilamina al 14% p/v más hidróxido de sodio, 14% p/v) se mezcló la solución y de cada una de esta se colocaron 42 µL en una placa de 96 pozos por triplicado, donde se añadió 125 µL

de solución ácida de cloruro de hierro III ($FeCl_3$) [79 mM y 12.8%v/v de HCl], para formar un complejo café-violáceo, el cual, se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 542 nm en un lector de placas (Multiskan-EX Thermo Scientific). Se gráfica la absorbancia vs la concentración de Ach empleada.

Una vez obtenida la curva de ACh, se evaluó la actividad de AChE pura (Sigma-Aldrich, C3389 Acetilcolinesterasa from *Electrophorus electricus* electric *eel*) empleando el mismo método descrito para la curva de ACh con las mismas concentraciones, sólo que la AChE fue adicionada antes de agregar la hidroxilamina alcalina, es decir se adiciona la ACh, buffer y AChE se deja incubar a 37 °C por una hora y transcurrido este tiempo se adiciona la hidroxilamina alcalina, y se continúa con el mismo proceso.

Posteriormente, se realizó una prueba para la cuantificación de la actividad de AChE en los tejidos de hipocampo y corteza. Debido a que la cantidad de corteza obtenida era mayor en comparación a la cantidad de tejido hipocampal, fue esta seleccionada para estandarizar el método empleando 121 mg de tejido, se homogenizó en 250 µL buffer de fosfatos al 0.1 M pH 8.0 y se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min a 4° C, obteniendo el sobrenadante, del cual se emplearon 10 y 20 µl.

Posteriormente, se realizó una segunda prueba, en la cual, se realizó el mismo método empleando 5 y 8 mg de tejido hipocampal, se homogenizó en 250 µL buffer de fosfatos al 0.1 M pH 8.0 y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4° C, obteniendo el sobrenadante, del cual se emplearon 20 µl.

Debido a que la cantidad de muestra de hipocampo obtenida es poca, se emplearon entre 8 y 50 mg de hipocampo y corteza respectivamente para evaluar la actividad de AChE en estos. Estas muestras fueron homogenizadas y centrifugadas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Se utilizó una sola concentración de ACh de 5.3 mM en un volumen de 12 µL los cuales se diluyeron en 188 µL de buffer de fosfatos 0.1 M 8.0 pH y se le colocó 50 µL de sobrenadante de la muestra de hipocampo o corteza homogenizada respectivamente, se incubaron a 37°C por 1 h en agitación constante, se realizó un segundo centrifugado a 3000 rpm durante 15 min a 4°C el sobrenadante fue separado y se le adicionaron 20 µL de hidroxilamina alcalina (solución 1:1 de clorhidrato de hidroxilamina al 14% p/v e hidróxido de sodio) y finalmente se colocaron 42 µL de esta mezcla en una placa de 96 pozos por triplicado, adicionando 125 µL de solución de cloruro de hierro III ($FeCl_3$) 79 mM, para formar un complejo café-violáceo y se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 542 nm en un lector de placas (Multiskan-EX Thermo Scientific).

8.10 Cuantificación de actividad del complejo AChE-βA

Se empleó el método de Bonting-Featherstone para evaluar el cambio en la actividad de AChE en la formación de complejos de AChE- βA_{1-42}. Se empleó péptido βA_{1-42} humano (Calbiochem ® cat: PP69-.25 MG β-Amyloid Peptide (1-42), Human. Lot:2681394).

Concentraciones de ACh [2.8698, 5.2613 y 10.5225 o 10.52, 20.57 y 25.83 mM], se hicieron reaccionar con 50 µL de la solución de complejos AChE-βA [0.064 nM-20 µM] diluido en buffer de fosfatos 0.1 M 8.0 pH hasta alcanzar un volumen final de 250 µL, se incubaron a 37°C por 1 h en agitación constante posteriormente se agregó 20 µL de hidroxilamina alcalina a todos los tubos (solución 1:1 de clorhidrato de hidroxilamina e hidróxido de sodio), finalmente se colocaron 42 µL en una placa de 96 pozos por triplicado, agregándose 125 µL de solución de cloruro de hierro III ($FeCl_3$) [79 mM], para formar un complejo café-violáceo y se cuantifico la absorbancia a una longitud de onda de 542 nm en un lector de placas (Multiskan-EX Thermo Scientific).

8.11 Cuantificación de proteínas por la prueba de Bradford

Se realizó la cuantificación de proteínas en hipocampo y corteza prefrontal de los 5 grupos, empleando una dilución de la muestra 1:100, a la cual se agregaron 100 µL del reactivo de Bradford (CAYMAN CHEMICAL) y se leyeron las absorbancias a 590 nm. Los resultados se expresaron en mg de Proteína/ mg de Tejido y se compararon con la curva patrón correspondiente (5.6, 7.5, 10.1, 13.5, 18, 24, 32 µg/ml Prot).

8.12 Cuantificación de βA por la técnica ELISA

Para la cuantificación de βA, se preparó un homogenizado de hipocampo y corteza, con buffer de radioinmunoprecipitación (RIPA por sus siglas en inglés *radioimmunoprecipitation assay buffer*) que contenía tris-HCl 10 mM, tritón X-100 al 1%, EDTA 1mM y 0.1% p/v de inhibidor de proteasas y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Se realizó la cuantificación de proteínas en el homogenizado de tejido hipocampal y cortical con buffer RIPA y posteriormente fue cuantificada el βA mediante el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), se empleó un volumen de homogenizado que contenía 100 µg de proteína y se diluyó en buffer de bicarbonatos 0.1 M, pH 9.6, para alcanzar un volumen final de 100 µL, se colocó cada muestra por duplicado en una placa de 96 pozos de alta unión a proteínas

(Costar 3590, Corning® 96 *Well EIA/RIA Assay Microplate*) y se dejó incubar por toda la noche a 4°C posteriormente, se realizaron 3 lavados de 2 min cada uno a temperatura ambiente con PBS 0.1 M pH 7.4 – tween 20 al 0.05% v/v (PBST) y 3 lavados de 2 min cada uno a temperatura ambiente con PBS 0.1 M pH 7.4, se realizó bloqueo con albumina de suero bovino al 6% p/v en PBST durante 2 h a 37°C, se repitió un ciclo de lavados, para incubar después con el anticuerpo anti βA_{1-42} acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (*Beta Amyloid Antibody* MOAB-2 NBP2-13075: Novus Biological), finalmente se realizó otro ciclo de lavados, se reveló con 50 µL de dihidroclorido o-fenilenadiamina (OPD) al 2.7 mM: que contiene 1.2 mL de H2O bidestilada, 0.6 mL de PBS, 1 mL H2O2, 0.6 mL de buffer de citratos 0.05 M pH 5.2 y enseguida se agregó al pozo 30 µL de ácido sulfúrico al 2.5 N y se cuantificó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (Multiskan-EX Thermo Scientific).

8.13 Análisis estadístico

Se graficó el promedio de cada experimento ± el error estándar. Se le realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk con el software SigmaPlot 15.0. Para determinar si existe diferencia significativa entre los grupos de estudio se empleó el análisis estadístico por medio de la prueba ANOVA de 1 vía con una α=0.05 y una β=0.8 y prueba *POST HOC* de Tukey con el software GraphPad Prism 9.0.

En caso de no pasar las pruebas de normalidad y varianza, se realizó una estadística cualitativa por la prueba de Kruskal-Wallis.

9. Resultados

9.1 Estandarización de la cirugía estereotáxica

Los cortes histológicos mostraron que los cerebros de los animales de experimentación administrados con eosina Y, fueron analizadas con microscopia óptica (figura 9), en donde se observó que la eosina Y administrada se depositó en la corteza y periferia de la región CA1 del hipocampo.

La figura 9A muestra el trayecto de la lesión generada en ambos hemisferios por la acción mecánica de la aguja al incidir en el tejido cerebral, igualmente se puede observar la zona de depósito de la eosina Y comprobando que la administración se realizó en S1Tr.

En la figura 9B se realiza un acercamiento a la lesión generada en el hipocampo derecho, mostrando los bordes irregulares ocasionado por el depósito de la eosina en la zona de administración.

Con esto se corroboró que el βA se administró en la región S1Tr de la corteza cerebral ya que fueron las mismas coordenadas empleadas para la eosina Y.

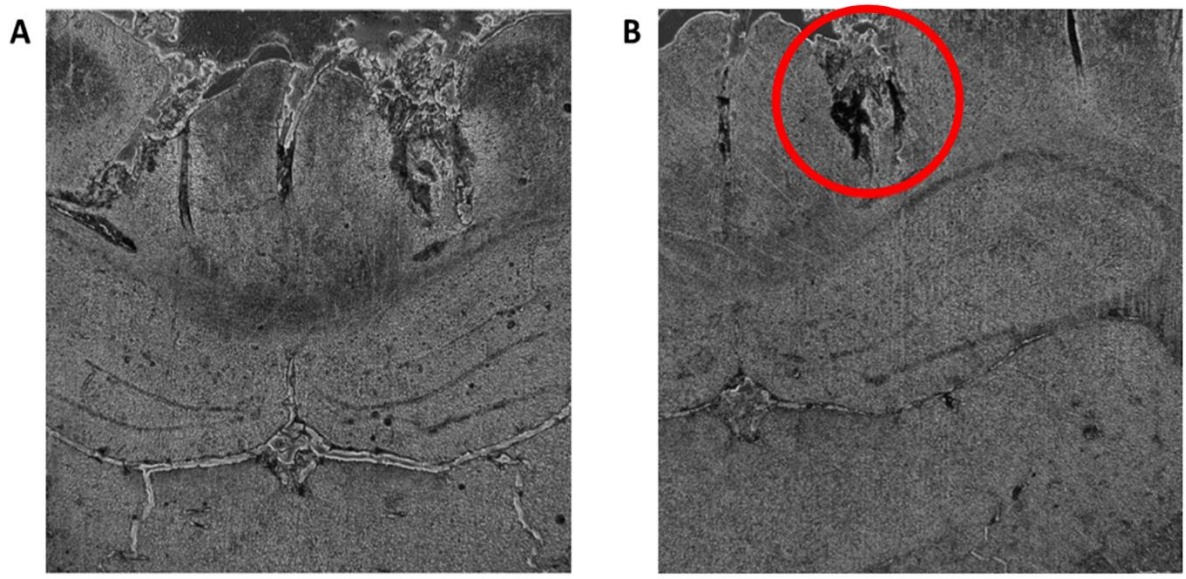


FIGURA 10 CORTES HISTOLÓGICOS DE CEREBRO DE RATAS MEDIANTE ADMINISTRADAS ESTEREOTÁXICA CON EOSINA Y A 4X

A. Tinción con eosina Y en la zona de punción de la corteza cerebral, obsérvese la cercanía al hipocampo.
B. Lesión en la zona de incisión de la cirugía estereotáxica, el círculo rojo indica zona S1Tr de la corteza.

9.2 Prueba de evitación pasiva

Al realizar la prueba de evitación pasiva se observó (figura 10), que el grupo GBASS, no hubo diferencia significativa en el tiempo de latencia en la prueba a corto plazo en comparación del GC, siendo que presentó un aumento del 13.5% (*p*=0.89) en el tiempo de latencia, con una media de tiempo de latencia (MTL) *de 260*.9, igualmente, este mismo grupo evidenció un aumento de 62.9% (*p*=0.50) en el tiempo de latencia (MTL=232.0) en la evaluación de la memoria a largo plazo. Sin embargo, se observa que el tiempo de latencia es menor en comparación con los grupos GBAG y GBA3f.

El grupo GBAG presentó una mejor conservación de la memoria a corto y largo plazo en comparación a los grupos GC, GBASS y GBA3f, describiendo un aumento del 30.5% (MTL=300.0, *p*=0.44) en el corto plazo y un aumento del 84.9% (MTL=263.3, *p*=0.28) en el largo plazo respecto al GC. En el grupo GBA3f, igualmente se observó una mejoría en la memoria a corto plazo del 30.5% (MTL=300.0 *p*=0.37) y un aumento en la memoria a largo plazo de 60.1% (MTL=228.1, *p*=0.51) respecto al control. Sin embargo, la memoria a largo plazo presentó resultados similares al grupo GBASS, siendo una disminución del 1.6% respecto al GBASS.

Se realizó análisis por la prueba Kruskal-Wallis de una vía para la cual se obtuvo una P=0.327 (P>0.05) en la prueba a corto plazo, indicando que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Igualmente, para la prueba de memoria a largo plazo, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis de una vía, para la cual, se obtuvo una P=0.2992 (P>0.05), indicando que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

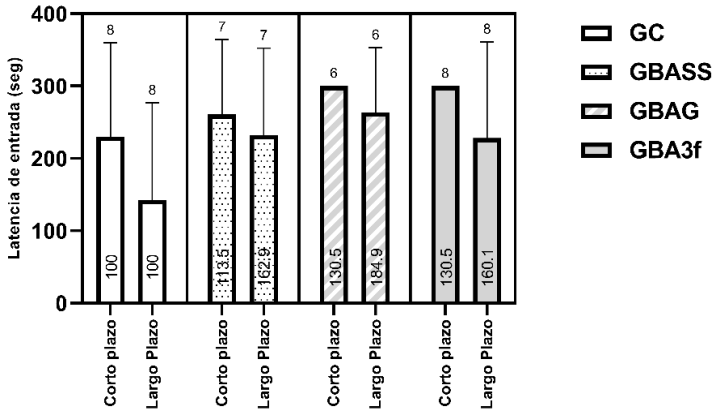


FIGURA 11 PRUEBA DE EVITACIÓN PASIVA

Kruskal-Wallis de 1 vía. Corto plazo P=0.327. Largo plazo P=0.2992. GC con n=8, GBASS n=7, GBAG n=6, GBA3f n=8

9.3 Prueba de campo abierto

Se evaluó la actividad motriz de las ratas para descartar un daño en corteza motora ocasionado por la cirugía estereotáxica, sin embargo, esto solo se pudo realizar en los grupos GBASS, GBAG y GBA3f.

En la figura 11A se observa una mayor actividad motora total en el grupo GBAG, presentando un aumento del 19.6% con una media de 80.3 en comparación con el grupo GBASS; mientras que el grupo GBA3f fue el que menor actividad motora total presentó, observándose una disminución del 32.9% con una media de 67.0 de actividad motora total. Se analizaron los datos por medio de ANOVA de 1 vía, para lo cual, se obtuvo una P>0.05 (P=0.086) y se concluye que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en la actividad motora total.

En el número de levantamientos (figura 11B), el grupo GBASS presentó una menor cantidad (media de 434) en comparación con los grupos GBAG y GBA3f; el grupo GBAG obtuvo la mayor cantidad de levantamientos, siendo que presentó un aumento del 384.4% (media de 484.4) respecto al grupo GBASS; el grupo GBA3f, tuvo menor cantidad de levantamientos en relación con el grupo GBAG, y un aumento del 68.6% (media de 168.6) en el número de levantamientos respecto a GBASS. Se realizó el análisis por medio de la prueba Kruskal-Wallis para lo cual se obtuvo una P=0.476 y se determina que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

En la figura 11C se realiza una comparación entre el tiempo que se mantuvo el animal de experimentación explorando en la zona de interés, entre los grupos de estudio mostraron poca diferencia, siendo que el grupo GBASS fue el que menor tiempo en zona de interés obtuvo en contraste con los dos grupos (media de 113.8 segundos), mientras que el grupo GBAG presentó un tiempo mayor en zona de interés, con un aumento del 18.9% (media de 170.68 segundos) en contraste con el grupo GBASS. El grupo GBA3f presentó un aumento del 6.3% (media de 132.7 segundos) en comparación al grupo GBASS. El análisis se realizó por medio de ANOVA de 1 vía, en la cual, se obtuvo una P>0.05 (P = 0.5593), demostrándose que no existe diferencia significativa en el porcentaje en zona de interés entre los 3 grupos.

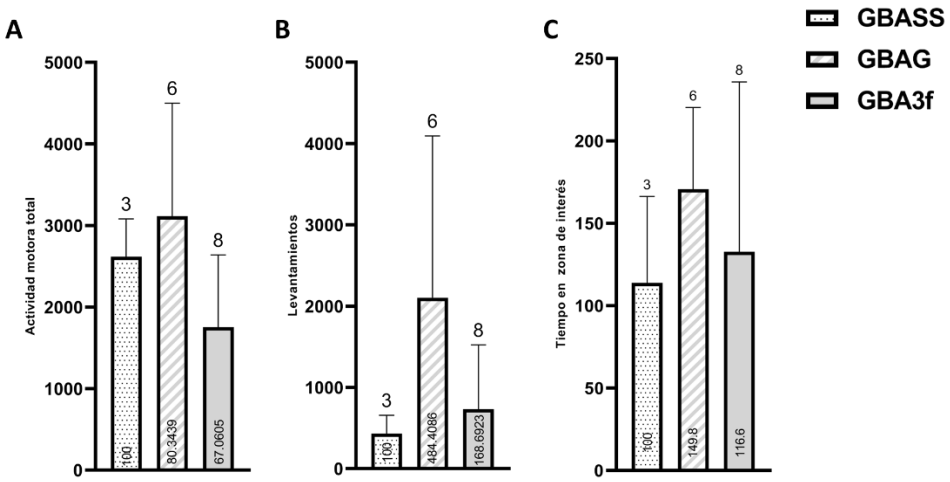


FIGURA 12 PRUEBA DE CAMPO ABIERTO

A. Actividad motora total en 300 segundos, ANOVA de 1 vía P=0.086 B. N. de levantamientos en 300 seg, Prueba de Kruskal-Wallis P = 0.47 C. Tiempo en zona de interés (segundos), Prueba ANOVA de 1 vía P = 0.5593. GBASS n=3, GBAG n=6, GBA3f n=8

Los resultados obtenidos por la actividad motora total, el número de levantamientos y el porcentaje en zona de interés, muestran que no existen cambios significativos. Sin embargo, debido a la falta del grupo sin cirugía no se podría determinar exactamente si estos cambios son por la administración o por los compuestos evaluados.

9.4 Actividad de acetilcolinesterasa en hipocampo y corteza

Al realizar la cuantificación de ACh por el método de Bonthing-Featherstone se obtuvo una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de Ach, como se muestra en la figura 12A, obteniéndose una R^2=0.9995 con la siguiente ecuación Absorbancia=0.0279 [ACh] - 0.0006.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de ACh no hirdolizada por medio de la obtención de la absorbancia obtenida tras la hidrolisis producida por la actividad de AChE, cantidad que fue restada a la absorbancia de la concentración de ACh inicial, para tener la absorbancia que corresponde a la ACh hidrolizada. Se graficó la concentración de ACh en el eje de las abscisas con la absorbancia correspondiente

a la ACh hidrolizada en el eje de las ordenadas, obteniéndose una curva que describe una hipérbola, en la cual se puede observar que la actividad de AChE aumenta con la concentración, esto al observar un aumento progresivo de la ACh convertida (figura 12B).

Después de obtenidos estos resultados se estandarizó la cantidad de muestra de cerebro que podría utilizarse para determinar la actividad de AChE. Por lo tanto, se evaluó la actividad de AChE en 121 mg de corteza, realizándose dos curvas con distinta cantidad de volumen de sobrenadante, 10 y 20 µL respectivamente, se compararon los resultados con una cinética enzimática utilizando AChE pura, se obtuvo que la actividad de AChE fue ligeramente mayor en el ensayo con 10 µL en comparación a la utilización de AChE pura y el ensayo con 20 µL, en el ensayo con 20 µL, se obtuvo menor actividad en comparación con la AChE pura y los 10 µL (figura 12C).

Posteriormente, se realizó una segunda prueba, donde se evaluó la actividad de AChE empleando 5 y 8 mg de tejido hipocampal (figura 12D). Del homogenizado de estas muestras se utilizaron 10 µL de sobrenadante, donde se obtuvo que, en la prueba con 8 mg de tejido, la actividad fue menor respecto a la prueba con 5 mg y mucho menor en comparación a la AChE pura.

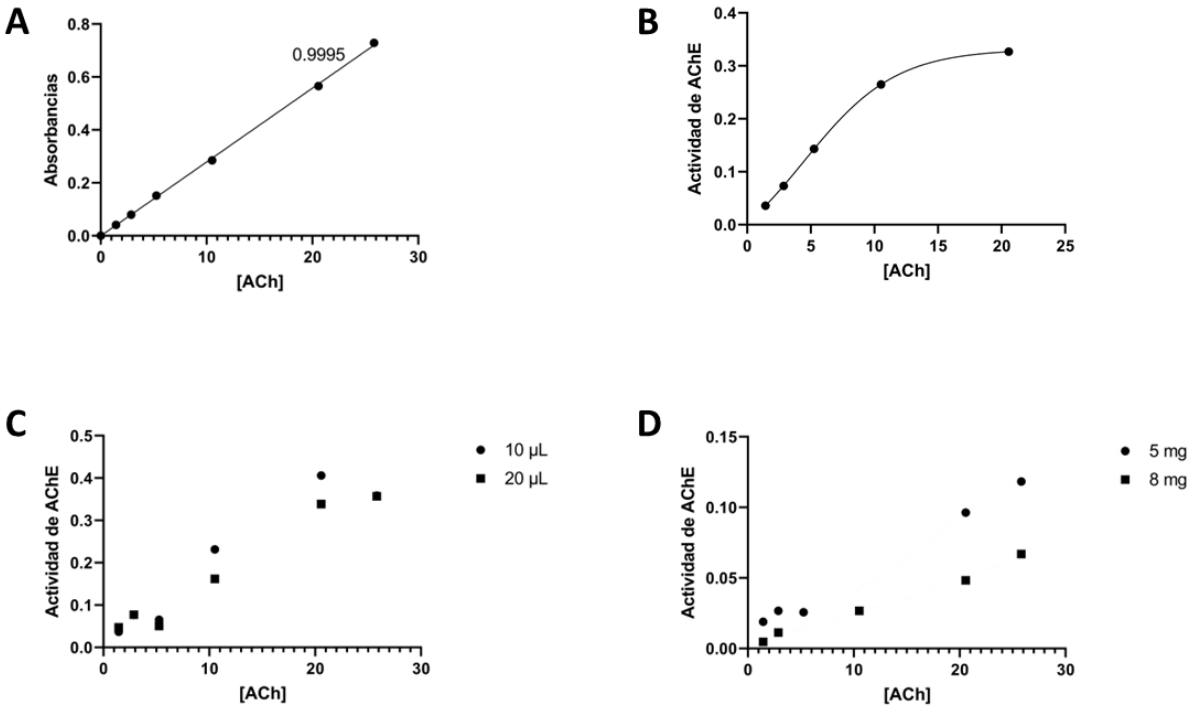


FIGURA 13 ACTIVIDAD DE ACHE

A. Curva de ACh ascendente [0, 1.4, 1.9, 5.3, 10.5 20.6 y 25.8 mM] B. Actividad de AChE pura [0.02U/vial] C. Actividad de AChE en muestra de corteza [121 mg] D. Actividad de AChE en muestra de hipocampo [5 y 8 mg]

Finalmente, se realizó la prueba en el tejido hipocampal de los animales de estudio de los grupos propuestos, empleando una sola concentración de ACh cercana a la constante de Michaelis de 7.7 (kM).

Se evaluaron los datos obtenidos de la actividad de AChE y se observó que GBASS presentó un aumento del 24.8% (media de $7.48x10^{-5}$ de ACh hidrolizada/100µg de proteína) en la actividad de AChE en comparación con GC, siendo esta diferencia no estadísticamente significativa, mientras que el GBAG fue el que obtuvo mayor actividad en comparación con los otros tres grupos, describiendo un aumento de 108.3 % ($1.248x10^{-4}$ de ACh hidrolizada/100µg de proteína) respecto al GC. El grupo GBA3f presentó la menor actividad de AChE, observándose una disminución 29.3% ($4.2348x10^{-5}$ de ACh hidrolizada/100µg de proteína) respecto a GC, sin embargo esta no es estadísticamente significativa.

Se realizó análisis estadístico por ANOVA de 1 vía, para lo cual, se obtuvo una $P<0.05$ ($P=0.0208$) GC y GBAG, por lo que hay una diferencia estadísticamente significativa, mientras que el resto de los grupos no presentaron diferencia estadísticamente significativa con una $P>0.05$ ($P=0.6202$).

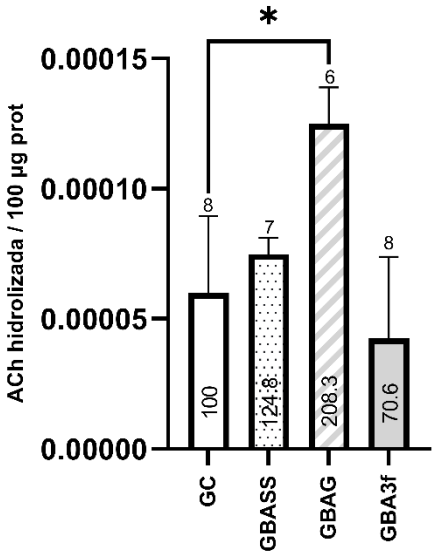


FIGURA 14 ACTIVIDAD DE ACHE EN MUESTRA DE HIPOCAMPO

ANOVA de 1 vía P<0.05 (P=0.015). GC con n=8, GBASS n=7, GBAG n=6, GBA3f n=8

Para la cuantificación de la actividad de AChE en corteza (figura 14), se realizó por el mismo método descrito para la cuantificación en hipocampo, en donde se observó que GC obtuvo la menor actividad de AChE (media de 0.026 de ACh hidrolizada/100µg de proteína), en comparación con los otros grupos. El grupo GBASS mostró un incremento de la actividad de AChE respecto al GC del 31.7% (media de 0.034 de ACh hidrolizada/100µg de proteína), mientras que GBAG presentó un aumento del 21.6% (media de 0.031 de ACh hidrolizada/100µg de proteína) en la actividad de AChE respecto GC. Finalmente la mayor actividad de AChE se observó en el grupo GBA3f respecto a los demás grupos, destacando el aumento de la actividad de AChE respecto al grupo GC del 71.9% (media de 0.044 de ACh hidrolizada/100µg de proteína).

Se analizó la estadística por ANOVA de 1 vía, para lo cual se obtuvo una P>0.05 (P=0.6534), por lo que se acepta la hipótesis nula, donde podemos concluir que no existe diferencia estadísticamente significativa.

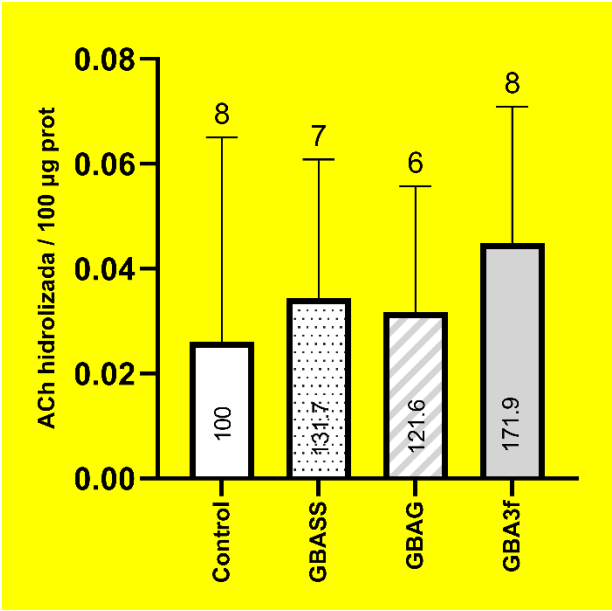


FIGURA 15 ACTIVIDAD DE ACHE EN CORTEZA

GC con n=8, GBASS n=7, GBAG n=6, GBA3f n=8

Comparando los resultados de la cuantificación de la actividad de la acetilcolinesterasa obtenidos en hipocampo y en corteza prefrontal, se puede observar una mayor actividad en corteza prefrontal, demostrando que la actividad de esta área es mayor en comparación del hipocampo, concordando en cómo está

distribuida la densidad de las neuronas colinérgicas en el cerebro, siendo que hay una mayor cantidad de neuronas colinérgicas en el área de la corteza.[62]

9.5 Actividad del complejo acetilcolinesterasa- βA

En la figura 15 se presenta en el eje de las abscisas las concentraciones ascendentes de ACh (2.8, 5.2, 10.5, 20.5 y 25.8 µM) que fueron puestas a reaccionar con el complejo AChE- βA_{1-42} [0.064 nM-20 µM] y en el eje de las ordenadas la ACh hidrolizada por AChE. Los resultados muestran que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de ACh hidrolizada por la AChE y la hidrolizada cuando se encuentra formando el complejo AChE- βA_{1-42}.

Los resultados obtenidos sugieren que la actividad de AChE, se incrementa, pero no fue significativo entre la AChE sola y cuando está en los complejos AChE- βA_{1-42}.

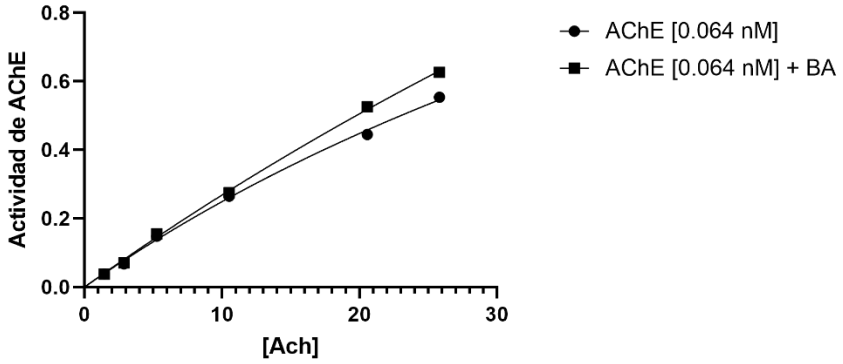


FIGURA 16 ACTIVIDAD DE ACHE EN COMPLEJOS ACHE-BETA-AMILOIDE

Curva de actividad de AChE y del complejo AChE-βA_{1-42} [0.064 nM-20 µM] con ACh a diferentes concentraciones, 2.8, 5.2, 10.5, 20.5 y 25.8 µM.

9.6 Cuantificación de βA por medio de la técnica ELISA

Se realizó la cuantificación de βA por medio de la técnica ELISA en hipocampo y corteza prefrontal de los animales de experimentación, posteriormente se analizaron los resultados y finalmente fueron graficados en la figura 16.

En la cuantificación de βA realizada en corteza prefrontal se observó que el grupo GBASS presentó una disminución de 8.15% (media de 1.40 µg de βA/100 µg de proteína) en la cuantificación de βA respecto a GC (media de1.52 µg de βA/100 µg

de proteína), mientras que GBAG presentó la mayor cantidad de βA, describiendo un aumento del 34.6% (media de 2.05 µg de βA/100 µg de proteína) respecto a GC y GBA3f fue el grupo con la menor cantidad de βA (media de 1.24 µg de βA/100 µg de proteína) mostrando una disminución del 18.4% respecto al GC.

Se realizó análisis estadístico por ANOVA de 1 vía, al no pasar la prueba de normalidad, se decidió realizar análisis por medio del método Kruskal-Wallis para lo cual, se obtuvo una P>0.05 (P=0.305), observando que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos para la cuantificación de βA en la corteza prefrontal.

Posterior al análisis de las muestras hipocampales por la técnica ELISA, se encontró que GC mostró una mayor cantidad de βA en comparación con los demás grupos (media de $2.9x10^{-4}$ µg de βA/100 µg de proteína), GBASS presentó un aumento de 16.1% (media de 2.4x10-4 µg de βA/100 µg de proteína) respecto a GC. El grupo con menor cantidad de βA fue GBAG (media de $1.3x10^{-4}$ µg de βA/100 µg de proteína) vs GC, y finalmente GBA3f presentó una disminución de 19.6% (media de $2.3x10^{-4}$ µg de βA/100 µg de proteína) respecto a GC.

Se realizó análisis estadístico por ANOVA de 1 vía, para lo cual, se obtuvo una P>0.05 (P=0.404), concluyendo con aceptar la hipótesis nula y rechazando la hipótesis alternativa, por lo que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos para la cuantificación de βA en hipocampo.

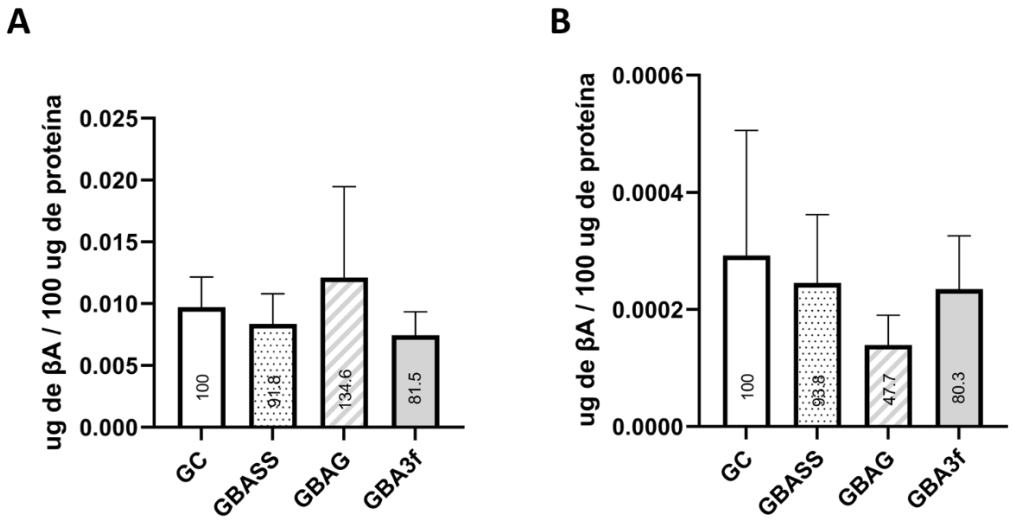


FIGURA 17 CUANTIFICACIÓN DE BETA-AMILOIDE

Cuantificación de βA en corteza prefrontal. Kruskal-Wallis P>0.05 (P=0.305) B. Cuantificación de βA en hipocampo. ANOVA de 1 vía P>0.05 (P=0.404)

10. Discusión

La EA es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por un déficit en el sistema colinérgico y por la formación de placas amiloides resultado de la agregación del péptido βA en el cerebro. Su diagnóstico se basa en los hallazgos clínicos, pruebas neuropsicológicas, pruebas de imagen y se hace una confirmación *postmortem* mediante las pruebas histológicas de tejido cerebral. El tratamiento actual se basa en 5 fármacos aprobados por la FDA, entre estos la galantamina, un alcaloide terciario con un perfil selectivo reversible que actúa como un inhibidor competitivo de la AChE. Estimula la proliferación en hipocampo por la activación de los receptores muscarínicos M1 y regula la supervivencia de las nuevas células por la activación de los receptores nicotínicos α7.[1, 11, 29, 30]

En este estudio se evaluó el **compuesto 3f**, un compuesto que ha demostrado en pruebas *in silico* e *in vitro* (Rosales M., *et al*, 2022) capacidad de acoplamiento *multitarget* a dianas terapéuticas de EA, efecto inhibitorio de AChE y capacidad antiagregante de βA. Por lo tanto, en este estudio se evaluó un modelo de EA inducido por administración de βA intracortical, siendo administrado por 21 días vía intraperitoneal. Se utilizó a la galantamina como fármaco control y con ello evaluarlo como un posible candidato de nuevo tratamiento.[38]

La inyección intracortical es un método ampliamente utilizado para la administración de fármacos en estudios en animales, incluyendo modelos de EA, epilepsia, depresión, entre otros. Este modelo se apoya de generar lesión mecánica en el sitio de administración resultando en neuroinflamación, estrés oxidativo, daño neuronal y desregulación de limpieza metabólica, procesos fisiopatológicos que imitan a los producidos por la propia enfermedad. Sin embargo, este mismo modelo tiene la limitante de no poder replicar el origen multifactorial de la EA, siendo que minimiza otros factores etiológicos distintos a la βA, como pasa con tau, la cual pierde peso en este modelo.[48, 69]

Para llevar a cabo el modelo, se utilizó el modelo de administración intracortical de βA, en el que se estandarizó las coordenadas de la administración, siendo adecuada para la evaluación de cambios neurodegenerativos locales y la difusión por las vías neuronales del péptido βA y sus consecuentes cambios en la conducta y cambios en las pruebas bioquímicas. Posteriormente, se realizó la administración de βA en los grupos de animales de experimentación, después se administraron por vía I.P. con el compuesto respectivo para cada grupo y siguiendo con la realización de pruebas de conducta.[69]

La galantamina ya ha sido ampliamente probada en distintos estudios, incluyendo su efecto reductor en la formación de placas amiloides y su efecto en la reducción de trastornos neurodegenerativos evaluados en las pruebas de conducta en roedores. Igualmente, se ha observado efecto en la neuroinflamación al reducir la producción de citocinas proinflamatorias, aumentar la limpieza por la microglía y astrocitos, además de tener un efecto antiapoptótico en el cerebro. Llegando a estos efectos al presentar regulación en los receptores de muscarínicos 1, nicotínicos α4 y α7.[70, 71, 72]

La prueba de evitación pasiva mostró que, tanto el **compuesto 3f** como la galantamina, presentan una tendencia a preservar la memoria a corto y a largo plazo, sin embargo, los datos no fueron estadísticamente significativos. Esto fue contrario con los resultados obtenidos por Bhattacharya S. et al 2014, los cuales realizaron un estudio con ratones transgénicos 5XFAD administrados con galantamina vía oral por 7 semanas, observado un mantenimiento de los valores de latencia de entrada cuando se administra galantamina. Igualmente, Dimitrova y Getova-Spassova en 2006, realizaron un estudio en ratas en un modelo de hipoxia inducido por nitrato sódico con administración I.P. de galantamina, observando una mejoría en la memoria de corto y largo plazo ante las pruebas de evitación pasiva y, con ello, atribuyendo el efecto a una potenciación alostérica de ACh mediada por activación de receptores nicotínicos.[61, 73]

En la prueba de campo abierto se obtuvo que existe una mayor capacidad motriz en los grupos administrados con el **compuesto 3f** y la galantamina, destacando la galantamina que fue la que mejores resultados demostró, siendo constante con los datos obtenidos por Bhattacharya S. et al 2014. En el grupo GBASS mostró un discreto aumento no significativo en la actividad motora total en comparación con los dos grupos, recordando que este parámetro evalúa la capacidad motriz de los roedores, esto se interpretaría en el sentido que, los grupos con la enfermedad expresa tienen una mayor conservación de la capacidad motriz en comparación con los grupos tratados con galantamina o el **compuesto 3f**, se ha teorizado que es debido a una muestra no homogénea en cantidad de animales de experimentación presentada en este grupo, se compuso por 3 sujetos, lo cual ocasiona que los resultados no puedan ser comparables estadísticamente. Se sugiere realizar un futuro estudio donde se utilice una muestra homogénea entre los grupos. [74]

El **compuesto 3f** mostró una reducción de la actividad de la AChE, concordante con los datos obtenidos previamente en los estudios *in silico* e *in vitro*, demostrando así que el grupo adamantadina mejora las interacciones de **3f** con AChE, mejorando el efecto del **compuesto 3f** como un inhibidor de la AChE, postulándolo como un posible nuevo fármaco con acción en la misma enzima. Igualmente, es posible que el compuesto produzca modulación al actuar con los receptores NMDA uniéndose por su estructura de adamantino, siendo que es una estructura contenida en la memantina, la cual produce modulación de estos receptores.

Sin embargo, en este estudio el grupo administrado con la galantamina presentó una tendencia al aumento en la actividad de AChE, debido a que galantamina actúa como un inhibidor competitivo de AChE, se esperaría que la actividad de la AChE disminuyera, se hipotetizó que el acoplamiento entre βA y AChE podría estar afectando y aumentando la actividad de AChE, ya que se ha reportado que el βA puede formar complejos con AChE y aumentar su actividad.

Esto se ha mencionado por Dinamarca M. et al en 2010, donde se realizó un experimento *in vitro*, en el cual observaron los cambios en la actividad de AChE producido por el complejo AChE- βA, posteriormente realizaron estudios *in vivo* para corroborar estos datos, se evidenció este aumento de la actividad, en los cuales se obtuvo que la formación de complejos AChE-βA ocasiona el aumento de la actividad hidrolítica de la AChE, sugiriendo que la interacción entre estos afecta la unión de la AChE con la galantamina, impidiendo a la galantamina producir su efecto. Además, al formarse estos complejos es posible que los inhibidores de AChE ya no puedan interaccionar en el sitio activo de la enzima. Para lo cual, se sugiere realizar más experimentos en donde se evalúe a la galantamina en el contexto de la formación de complejos AChE-βA.

En cierta forma, estos resultados podrían explicar porque los inhibidores de AChE no llegan a revertir los daños producidos por el βA. Es importante mencionar que en la literatura no se encontraron reportes que muestren la actividad de AChE después de la administración intracortical de βA_{1-42}.

11. Conclusión

La administración intraperitoneal del **compuesto 3f,** después de una única administración intracortical de βA, no mostró cambios significativos en las pruebas conductuales. Mientras que, a las pruebas bioquímicas se obtuvo una tendencia a la disminución de la actividad de acetilcolinesterasa en comparación con la galantamina, sin embargo, no hubo cambio significativo en la formación de βA, con ello aceptando la H_0 y rechazando la H_a. Concluyendo así que, **el compuesto 3f** no fue capaz de producir una mejora en el déficit cognitivo en el modelo animal inducido por administración intracortical de βA_{1-42}.

12. Perspectivas

Las coordenadas utilizadas inicialmente fueron con el fin de administrar el péptido βA en el hipocampo, sin embargo, posteriormente se comprobó que la administración se realizaba en la corteza S1Tr, esto por medio de la visualización de cortes histológicos en parafina, así como su análisis en atlas estereotáxico. Por lo tanto, dicha administración tiene el inconveniente de no generar el daño directo en hipocampo, retrasando así la síntesis y propagación de βA, siendo esta una de las posibles razones por las cuales los resultados obtenidos en la cuantificación de βA por el método ELISA no mostraron cambios. Debido a lo anterior se sugiere la realización de un nuevo protocolo en el cual se utilicen unas nuevas coordenadas en las cuales se administre en la región CA1 del hipocampo.

Además, la administración en corteza podría afectar las pruebas conductuales y de motricidad, ya que la administración estaba generando el mayor daño en la corteza sensitivo-motora de los animales. Otro factor importante que podría influir en los resultados obtenidos en las pruebas conductuales es que los animales se transportaron de un laboratorio a otro con el fin de poner a los animales en las condiciones propicias para realizar las pruebas, sin embargo, este trayecto ocasiona estrés y el cambio abrupto de las condiciones ambientales de los animales, influyendo esto en los resultados, ya que esas pruebas se ha demostrado que son altamente sensibles a estos cambios. Se sugiere que, en la realización del protocolo nuevo, se utilice una habitación condicionada donde se incluya de inicio los recursos y aparatos para la realización de las pruebas, con ello evitando los cambios bruscos de esta.

Finalmente, en la técnica ELISA para la cuantificación de βA, no se logró una muy buena correlación a concentraciones altas, por lo tanto, para la realización de un posterior protocolo, se sugiere una estandarización precisa de la técnica, así como la utilización de algún otro método de cuantificación, como western blot o técnicas de inmunohistología.

Comentado todo lo anterior, se propone la realización de otro protocolo donde se evalúe el **compuesto 3f** y se realicen los cambios sugeridos para corroborar si el 3f puede ser un candidato a nuevo fármaco para el tratamiento de la EA.

12. Bibliografía

1. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, Nixon RA, Jones DT. *Alzheimer disease. Nat Rev Dis Primers*. 2021 May 13;7(1):33. doi: 10.1038/s41572-021-00269-y.
2. Gulisano W, Maugeri D, Baltrons MA, Fà M, Amato A, Palmeri A, D'Adamio L, Grassi C, Devanand DP, Honig LS, Puzzo D, Arancio O. *Role of Amyloid-β and Tau Proteins in Alzheimer's Disease: Confuting the Amyloid Cascade. J Alzheimers Dis.* 2018;64(s1):S611-S631. doi: 10.3233/JAD-179935.
3. WHO. Alzheimer Disease International. World Alzheimer Report. 2019. Revisado el día 18 de mayo del 2024 en https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2021/
4. Sosa A. Las demencias en México, avances, rezagos y retos. Academia Nacional de Medicina de México. 2019. Revisado el día 18 de mayo del 2024 en https://www.anmm.org.mx/actas2019/SO-21-agosto-2019.pdf
5. Gulisano W, Maugeri D, Baltrons MA, Fà M, Amato A, Palmeri A, D'Adamio L, Grassi C, Devanand DP, Honig LS, Puzzo D, Arancio O. *Role of Amyloid-β and Tau Proteins in Alzheimer's Disease: Confuting the Amyloid Cascade. J Alzheimers Dis*. 2018;64(s1):S611-S631. doi: 10.3233/JAD-179935.
6. Cummings JL, Tong G, Ballard C. *Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. J Alzheimers Dis.* 2019;67(3):779-794. doi: 10.3233/JAD-180766.
7. Erdogan M, Kilic B, Sagkan RI, Aksakal F, Ercetin T, Gulcan HO, Dogruer DS. Design, synthesis and biological evaluation of new benzoxazolone/benzothiazolone derivatives as multi-target agents against Alzheimer's disease. Eur J Med Chem. 2021 Feb 15;212:113124. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.113124.
8. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, Villemagne VL, Aisen P, Vendruscolo M, Iwatsubo T, Masters CL, Cho M, Lannfelt L, Cummings JL, Vergallo A. *The Amyloid-β Pathway in Alzheimer's Disease. Mol Psychiatry.* 2021 Oct;26(10):5481-5503. doi: 10.1038/s41380-021-01249-0.
9. Cho Y, Bae HG, Okun E, Arumugam TV, Jo DG. *Physiology and pharmacology of amyloid precursor protein. Pharmacol Ther.* 2022 Jul;235:108122. doi: 10.1016/j.pharmthera.2022.108122.
10. Andrade-Guerrero J, Santiago-Balmaseda A, Jeronimo-Aguilar P, Vargas-Rodríguez I, Cadena-Suárez AR, Sánchez-Garibay C, Pozo-Molina G, Méndez-Catalá CF, Cardenas-Aguayo MD, Diaz-Cintra S, Pacheco-Herrero M, Luna-Muñoz J, Soto-Rojas LO. *Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. Int J Mol Sci*. 2023 Feb

13;24(4):3754. doi: 10.3390/ijms24043754. PMID: 36835161; PMCID: PMC9966419.

11. Long JM, Holtzman DM. *Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies.* Cell. 2019 Oct 3;179(2):312-339. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001. E
12. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. *Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. Int J Nanomedicine*. 2019 Jul 19;14:5541-5554. doi: 10.2147/IJN.S200490.
13. Hampel H, Vassar R, De Strooper B, Hardy J, Willem M, Singh N, Zhou J, Yan R, Vanmechelen E, De Vos A, Nisticò R, Corbo M, Imbimbo BP, Streffer J, Voytyuk I, Timmers M, Tahami Monfared AA, Irizarry M, Albala B, Koyama A, Watanabe N, Kimura T, Yarenis L, Lista S, Kramer L, Vergallo A. *The β-Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. Biol Psychiatry.* 2021 Apr 15;89(8):745-756. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.02.001.
14. Ossenkoppele R, van der Kant R, Hansson O. *Tau biomarkers in Alzheimer's disease: towards implementation in clinical practice and trials.* Lancet Neurol. 2022 Aug;21(8):726-734. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00168-5.
15. Busche MA, Hyman BT. *Synergy between amyloid-β and tau in Alzheimer's disease. Nat Neurosci.* 2020 Oct;23(10):1183-1193. doi: 10.1038/s41593-020-0687-6.
16. Hernández F, Ferrer I, Pérez M, Zabala JC, Del Rio JA, Avila J. *Tau Aggregation. Neuroscience.* 2023 May 10;518:64-69. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.04.024.
17. Ashrafian H, Zadeh EH, Khan RH. *Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation*. Int J Biol Macromol. 2021 Jan 15;167:382-394. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.192.
18. Liang SY, Wang ZT, Tan L, Yu JT. Tau Toxicity in Neurodegeneration. Mol Neurobiol. 2022 Jun;59(6):3617-3634. doi: 10.1007/s12035-022-02809-3.
19. Chen ZR, Huang JB, Yang SL, Hong FF. Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. Molecules. 2022 Mar 10;27(6):1816. doi: 10.3390/molecules27061816.
20. Oswald MJ, Han Y, Li H, Marashli S, Oglo DN, Ojha B, Naser PV, Gan Z, Kuner R. *Cholinergic basal forebrain nucleus of Meynert regulates chronic pain-like behavior via modulation of the prelimbic cortex.* Nat Commun. 2022 Aug 25;13(1):5014. doi: 10.1038/s41467-022-32558-9. PMID: 36008394; PMCID: PMC9411538.
21. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM. *Alzheimer's disease. Lancet.* 2021 Apr 24;397(10284):1577-1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.

22. Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B. *Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences*. Acta Neuropathol. 2008 Jan;115(1):5-38. 10.1007/s00401-007-0312-8.
23. Yi JH, Whitcomb DJ, Park SJ, Martinez-Perez C, Barbati SA, Mitchell SJ, Cho K. *M1 muscarinic acetylcholine receptor dysfunction in moderate Alzheimer's disease pathology. Brain Commun.* 2020 May 12;2(2). doi: 10.1093/braincomms/fcaa058.
24. Dwomoh L, Tejeda GS, Tobin AB. *Targeting the M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. Neuronal Signal*. 2022 Apr 21;6(1):NS20210004. doi: 10.1042/NS20210004.
25. Janíčková H, Rudajev V, Zimčík P, Jakubík J, Tanila H, El-Fakahany EE, Doležal V. *Uncoupling of M1 muscarinic receptor/G-protein interaction by amyloid β(1-42)*. Neuropharmacology. 2013 Apr;67:272-83. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.11.014. Epub 2012 Nov 30. PMID: 23206502.
26. Jiang S, Li Y, Zhang C, Zhao Y, Bu G, Xu H, Zhang YW. *M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. Neurosci* Bull. 2014 Apr;30(2):295-307. doi: 10.1007/s12264-013-1406-z.
27. Inestrosa NC, Dinamarca MC, Alvarez A. *Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease.* FEBS J. 2008 Feb;275(4):625-32. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06238.x.
28. Inestrosa NC, Alvarez A, Dinamarca MC, Pérez-Acle T, Colombres M. *Acetylcholinesterase-amyloid-beta-peptide interaction: effect of Congo Red and the role of the Wnt pathway. Curr Alzheimer Res*. 2005 Jul;2(3):301-6. doi: 10.2174/1567205054367928.
29. Zueva, I. V., Vasilieva, E. A., Gaynanova, G. A., Moiseenko, A. V., Burtseva, A. D., Boyko, K. M., Zakharova, L. Y., & Petrov, K. A. (2023). *Can Activation of Acetylcholinesterase by β-Amyloid Peptide Decrease the Effectiveness of Cholinesterase Inhibitors?. International journal of molecular sciences,* 24(22), 16395. https://doi.org/10.3390/ijms242216395
30. Muñoz FJ, Inestrosa NC. *Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid beta-peptide aggregates is dependent on the type of Abeta peptide and the AChE concentration present in the complexes*. FEBS Lett. 1999 May 7;450(3):205-9. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00468-8.
31. Dinamarca MC, Sagal JP, Quintanilla RA, Godoy JA, Arrázola MS, Inestrosa NC. *Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the Abeta peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener.* 2010 Jan 18;5:4. doi: 10.1186/1750-1326-5-4.
32. De Gregório E, Mendes GC, Somensi LB, Freire CG, Lopes LF, Lima KR, Carrazoni GS, Neves BS, Picua SS, da Silva LM, Mello-Carpes PB, Bonini JS, da Silva WC. *Neuroprotective effects of strength training in a*

neuroinflammatory animal model. BMC Neurosci. 2022 Apr 11;23(1):22. doi: 10.1186/s12868-022-00708-w.

33. Leng F, Edison P. *Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? Nat Rev Neurol*. 2021 Mar;17(3):157-172. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y.
34. Dhapola R, Hota SS, Sarma P, Bhattacharyya A, Medhi B, Reddy DH. *Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. Inflammopharmacology.* 2021 Dec;29(6):1669-1681. doi: 10.1007/s10787-021-00889-6.
35. Dimitrova DS, Getova-Spassova DP. *Effects of galantamine and donepezil on active and passive avoidance tests in rats with induced hypoxia. J Pharmacol Sci.* 2006 Jul;101(3):199-204. doi: 10.1254/jphs.fpe05006x.
36. Singh A, Kumar A. *Microglial Inhibitory Mechanism of Coenzyme Q10 Against Aβ (1-42) Induced Cognitive Dysfunctions: Possible Behavioral, Biochemical, Cellular, and Histopathological Alterations. Front Pharmacol.* 2015 Nov 9;6:268. doi: 10.3389/fphar.2015.00268.
37. Celik Topkara K, Kilinc E, Cetinkaya A, Saylan A, Demir S*. Therapeutic effects of carvacrol on beta-amyloid-induced impairments in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease*. *Eur J Neurosci.* 2022 Nov;56(9):5714-5726. doi: 10.1111/ejn.15565.
38. Breijyeh Z, Karaman R. *Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment.* Molecules. 2020 Dec 8;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789.
39. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE. *Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development.* Acta Pharmacol Sin. 2017 Sep;38(9):1205-1235. doi: 10.1038/aps.2017.28.
40. Pathak N, Rathi E, Kumar N, Kini SG, Rao CM. *A Review on Anticancer Potentials of Benzothiazole Derivatives*. Mini Rev Med Chem. 2020;20(1):12-23. doi: 10.2174/1389557519666190617153213.
41. Rosales-Hernández MC, Mendieta-Wejebe JE, Padilla-Martínez II, García-Báez EV, Cruz A. *Synthesis and Biological Importance of 2-(thio)ureabenzothiazoles*. Molecules. 2022 Sep 19;27(18):6104. doi: 10.3390/molecules27186104.
42. Tariq S, Kamboj P, Amir M. *Therapeutic advancement of benzothiazole derivatives in the last decennial period. Arch Pharm (Weinheim)*. 2019 Jan;352(1):e1800170. doi: 10.1002/ardp.201800170.
43. Rosales Hernández MC, Fragoso Morales LG, Correa Basurto J, Olvera Valdez M, García Báez EV, Román Vázquez DG, Anaya García AP, Cruz A. *In Silico and In Vitro Studies of Benzothiazole-Isothioureas Derivatives as a Multitarget Compound for Alzheimer's Disease. Int J Mol Sci*. 2022 Oct 26;23(21):12945. doi: 10.3390/ijms232112945. PMID: 36361729; PMCID: PMC9658106.

44. *Lamya H. Al-Wahaibi, Ali A. El-Emam, Hanan M. Hassan, Y. Sheena Mary,* Y. Shyma Mary, Renyer A. Costa, Emmanoel V. Costa, Victor L. Tananta & Amal A. El-Masry (2023). *DFT Studies and Acetylcholinesterase Inhibition Capacity Analysis of an Adamantane-Isothiourea Derivative via Docking and MD Calculations. Polycyclic Aromatic Compounds. 2023 44;3.* https://doi.org/10.1080/10406638.2023.2209254
45. Dembitsky VM, Gloriozova TA, Poroikov VV. Pharmacological profile of natural and synthetic compounds with rigid adamantane-based scaffolds as potential agents for the treatment of neurodegenerative diseases. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Sep 3;529(4):1225-1241. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.123. Epub 2020 Aug 7. PMID: 32819589.
46. *Bayley JP, Devilee P. Advances in paraganglioma-pheochromocytoma cell lines and xenografts. Endocr Relat Cancer. 2020 Dec;27(12):R433-R450. doi: 10.1530/ERC-19-0434. PMID: 33112800.* Dodart JC, May P*. Overview on rodent models of Alzheimer's disease. Curr Protoc Neurosci*. 2005 Nov. doi: 10.1002/0471142301.ns0922s33.
47. McLarnon JG, Ryu JK. *Relevance of abeta1-42 intrahippocampal injection as an animal model of inflamed Alzheimer's disease brain. Curr Alzheimer Res*. 2008 Oct;5(5):475-80. doi: 10.2174/156720508785908874.
48. Sarasa M. Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer. Rev Neurol. 2006 Mar 1-15;42(5):297-301.
49. Facchinetti R, Bronzuoli MR, *Scuderi C. An Animal Model of Alzheimer Disease Based on the Intrahippocampal Injection of Amyloid β-Peptide (1-42). Methods Mol Biol.* 2018;1727:343-352. doi: 10.1007/978-1-4939-7571-6_25.
50. Saki G, Eidi A, Mortazavi P, Panahi N, Vahdati A. Effect of β-asarone in normal and β-amyloid-induced Alzheimeric rats. Arch Med Sci. 2020 Apr 25;16(3):699-706. doi: 10.5114/aoms.2020.94659.
51. Cetin F, Dincer S. *The effect of intrahippocampal beta amyloid (1-42) peptide injection on oxidant and antioxidant status in rat brain*. Ann N Y Acad Sci. 2007 Apr; 1100:510-7. doi: 10.1196/annals.1395.056.
52. Christensen R, Marcussen AB, Wörtwein G, Knudsen GM, Aznar S. *A beta(1-42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT(2A) levels*. Exp Neurol. 2008 Mar;210(1):164-71. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.10.009.
53. Ghafarimoghadam M, Mashayekh R, Gholami M, Fereydani P, Shelley-Tremblay J, Kandezi N, Sabouri E, Motaghinejad M. *A review of behavioral methods for the evaluation of cognitive performance in animal models: Current techniques and links to human cognition. Physiol Behav.* 2022 Feb 1;244:113652. doi: 10.1016/j.physbeh.2021.113652.
54. Moosavi M, SoukhakLari R, Moezi L, Pirsalami F. *Scopolamine-induced passive avoidance memory retrieval deficit is accompanied with hippocampal*

MMP2, MMP-9 and MAPKs alteration. Eur J Pharmacol. 2018 Jan 15;819:248-253. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.12.007.

55. Dobryakova YV, Gurskaya O, Markevich VA. *Participation of muscarinic receptors in memory consolidation in passive avoidance learning*. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2014;74(2):211-7.
56. Sweeney JE, Höhmann CF, Moran TH, Coyle JT. *A long-acting cholinesterase inhibitor reverses spatial memory deficits in mice. Pharmacol Biochem Behav.* 1988 Sep;31(1):141-7. doi: 10.1016/0091-3057(88)90325-5.
57. Dobryakova YV, Ivanova OY, Markevich VA. *Administration of muscarinic antagonists induce changes in passive avoidance learning and in synaptic transmission in the CA1 area of the hippocampus. Acta Neurobiol Exp (Wars*). 2018;78(2):132-139.
58. Kostadinova II, Danchev ND, Vezenkov LT, Tsekova DS, Rozhanets VV. *Effect of Original Peptide Derivatives of Galantamine on Passive Avoidance in Mice. Bull Exp Biol Med*. 2020 Dec;170(2):200-202. doi: 10.1007/s10517-020-05032-z.
59. Gentsch C, Lichtsteiner M, Feer H*. Genetic and environmental influences on reactive and spontaneous locomotor activities in rats. Experientia*. 1991 Oct 15;47(10):998-1008. doi: 10.1007/BF01923335.
60. Deacon, Robert MJ. *Digging in mice: marble burying, burrowing, and direct observation reveal changes in mouse behavior. Mood and anxiety related phenotypes in mice: characterization using behavioral tests*. 2009: 37-45. Sweeney JE, Bachman ES, Coyle JT.
61. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. *The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. Methods Mol Biol*. 2019;1916:99-103. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_9.
62. Srinivasan J, Schmidt WJ. *The effect of the alpha2-adrenoreceptor antagonist idazoxan against 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: multiple facets of action? Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004 Jun;369(6):629-38. doi: 10.1007/s00210-004-0929-2.
63. *Effects of different doses of galanthamine, a long-acting acetylcholinesterase inhibitor, on memory in mice. Psychopharmacology (Berl).* 1990;102(2):191-200. doi: 10.1007/BF02245921.
64. Eratne D, Loi SM, Farrand S, Kelso W, Velakoulis D, Looi JC. *Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. Australas Psychiatry.* 2018 Aug;26(4):347-357. doi: 10.1177/1039856218762308.
65. Sotoudeh N, Namavar MR. *Optimisation of ketamine-xylazine anaesthetic dose and its association with changes in the dendritic spine of CA1 hippocampus in the young and old male and female Wistar rats*. Vet Med Sci. 2022 Nov;8(6):2545-2552. doi: 10.1002/vms3.936.

66. Seibenhener ML, Wooten MC. *Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice.* J Vis Exp. 2015 Feb 6;(96). doi: 10.3791/52434.
67. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, Khachaturian ZS. *The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. Brain*. 2018 Jul 1;141(7):1917-1933. doi: 10.1093/brain/awy132.
68. Oda Y, Nakanishi I. *The distribution of cholinergic neurons in the human central nervous system. Histol Histopathol*. 2000 Jul;15(3):825-34. doi: 10.14670/HH-15.825. PMID: 10963126.
69. Samotaeva IS, Tillmanns N, van Luijtelaar G, Vinogradova LV. *Intracortical microinjections may cause spreading depression and suppress absence seizures. Neuroscience.* 2013 Jan 29;230:50-5. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.013.
70. Wu Z, Zhao L, Chen X, Cheng X, Zhang Y. *Galantamine attenuates amyloid-β deposition and astrocyte activation in APP/PS1 transgenic mice. Exp Gerontol.* 2015 Dec;72:244-50. doi: 10.1016/j.exger.2015.10.015.
71. Marco-Contelles J, do Carmo Carreiras M, Rodríguez C, Villarroya M, García AG. *Synthesis and pharmacology of galantamine. Chem Rev.* 2006 Jan;106(1):116-33. doi: 10.1021/cr040415t.
72. Koola MM. *Galantamine-Memantine combination in the treatment of Alzheimer's disease and beyond. Psychiatry* Res. 2020 Nov;293:113409. doi: 10.1016/j.psychres.2020.113409.
73. Bhattacharya S, Haertel C, Maelicke A, *Montag D. Galantamine slows down plaque formation and behavioral decline in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease.* PLoS One. 2014 Feb 21;9(2):e89454. doi: 10.1371/journal.pone.0089454.
74. Marucci G, Buccioni M, Ben DD, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. *Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. Neuropharmacology.* 2021 Jun 1;190:108352. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108352.