



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO

Campus Chapultepec

**Escuela de Químico Farmacéutico Biólogo
Incorporado a UNAM**

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN
ANTICOLINESTERÁSICA DE UN COMPUESTO ACETILADO
DERIVADO DEL *p*-AMINOFENOL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA:
Q.F.B. IO STEPHANIE ZAMUDIO VEGA



Director de tesis interno: Dr. Javier Alfredo Carballo Perea
Director de tesis externo: Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara

MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE M. JAVIER ALFREDO CARBALLO PEREA
VOCAL Q.F.B. PATRICIA MELCHOR MACIAS
SECRETARIO Q.F.B. ISIDRO HINOJOSA LÒPEZ
1er SUPLENTE M. AGUSTIN PALMA DE LA CRUZ
2do SUPLENTE M. VICTOR MANUEL SÀNCHEZ HIDALGO

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS: ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL (ESM-IPN) Y EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA (CICATA).

DIRECTOR DE TESIS INTERNO

DIRECTOR DE TESIS EXTERNO

M. JAVIER A. CARBALLO PEREA

DR. JOSÉ. G. TRUJILLO FERRARA

SUSTENTANTE.

Q.F.B. IO STEPHANIE ZAMUDIO VEGA

Dedicatorias

A mi **madre Gina**, Tu me enseñaste que la fuerza y el éxito vienen de uno mismo, pero no son nada cuando no tenemos de cerca a nuestros seres amados para compartirlos. Gracias por darme la vida en todos los aspectos. Con todo mi amor para una guerrera de la vida, mi madre.

A mi **abuelita Chelito** Hoy gracias a tu gran amor y a tus cuidados estoy terminando un ciclo más en la vida; y que es el más importante, la realización de un gran sueño de 4 generaciones y el ejemplo de una 5ta generación. A mi Abuelita con todo mi amor.

A **Bernardo** por ser un gran padre en todos los aspectos. Eres una de las personas que hizo posible el comienzo y el cierre de este ciclo de mi vida. Gracias por tu amor y tus enseñanzas. A un gran hombre que me recordó siempre “No pain No game”.

A mi **esposo**, mi compañero, mi complemento, mi confidente, y mi amigo. Desde que entraste a mi vida me has hecho apoyado en todos los sentidos y me brindaste tu corazón sin condiciones, te amo.

A mi **hija Isilien**, tú me recuerdas a diario que el impulso al éxito se debe a las personas que amamos.

A mi **tía Myrna** por ser mi guía espiritual, mi madrina, mi madre, mi amiga, mi confidente y mi compañera de vida en el éxito y en el fracaso.

A mis tíos **Marielena y Ersis** por siempre estar en los momentos más importantes para mí. Su apoyo, amor, comprensión y felicidad que me han brindado son incondicionales. Los veo como mis segundos padres, los quiero mucho.

A **Emma Gibson y Juan pablo**, son unas personas maravillosas, que brindan su corazón sin condiciones, ni tabús. Ustedes forman parte de mi vida, y aunque no estoy cerca de ustedes físicamente, ustedes siempre están en mi corazón. Gracias por su cariño y apoyo.

A **Adolfo Morales** por que desde que lo conocí me abrió su corazón sin conocerme, y me apoyó sin ningún recelo o condición. Gracias por todo su amor y apoyo, lo quiero mucho.

Agradecimientos:

Al Dr. José Trujillo por ver en mí el éxito y confiar en mis capacidades. Gracias por darme la mano cuando más la necesitaba y darme el impulso para seguir adelante.

A la Dra. Delia Quintana por guiarme constantemente en la realización del trabajo.

Al Dr. José Correa Basurto por orientarme en el proceso del conocimiento.

Al Dr. Javier Carballo y a la Dra. Patricia Melchor por su apoyo, comprensión, paciencia y orientación antes, durante y después del desarrollo del trabajo.

Al Dr. Agustín Palma por sus enseñanzas, que me han permitido abrirme paso en mi vida laboral.

Al Mtro. Victor M. Sánchez Hidalgo por ser un gran amigo y un gran maestro.

Al Mtro. Alberto Guevara por tener confianza en mí. Gracias por tu amistad, tus enseñanzas y tu apoyo siempre.

Al Mtro. Isidro Hinojosa por incitarme a ser mejor cada día.

Al Médico Marvin por su amistad y su gran apoyo en todo momento.

Al Ing. Químico Gilberto por todo su apoyo y su amistad.

Al Mtro. Noé por ser una maravillosa persona y brindarme su amistad.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Breve reseña histórica	1
1.2. Diseño racional de fármacos	3
1.2.1. Relación estructura química-actividad biológica de los fármacos	3
1.3. Receptores	12
1.3.1. Descripción y localización	12
1.3.2. Fármaco-receptor	13
1.3.3. Fuerzas de unión en la interacción fármaco-receptor	14
1.3.4. Interacción fármaco-receptor	16
1.3.5. Docking	17
1.3.5.1. Método de reconocimiento molecular o docking	18
1.4. Inhibidores enzimáticos	20
1.5. Antagonistas y agonistas	23
1.6. Sistema nervioso	23
II. ANTECEDENTES	25
2.1. Neurotransmisión colinérgica	25
2.2. Acetilcolina	26
2.2.1. Receptores de Acetilcolina	27
2.2.1.1. Receptores nicotínicos	33
2.2.1.2. Receptores muscarínicos	34
2.2.2. Acetilcolinesterasa	36
2.2.3. Butirilcolinesterasa	41
2.2.4. Semejanza entre las colinesterasas	42
2.3. Enfermedad de alzheimer	43
2.3.1. Antecedentes	43
2.3.2. Hipótesis colinérgica	47
2.3.3. Tratamiento de la enfermedad de alzheimer	47
2.3.3.1. Terapéutica colinérgica de la enfermedad de alzheimer	48
2.3.3.2. Agonistas colinérgicos	49
2.4. Inhibidores de la Acetilcolinesterasa	50
2.4.1. Fármacos: Inhibidores de Acetilcolinesterasa	52
A.- Inhibidores pseudo-irreversible (unión no covalente)	52

B.- Inhibidores irreversibles	54
C.- Inhibidores tipo-análogos de estados de transición	54
D.- Inhibidores Reversibles	55
2.5 Antecedentes químicos	58
III. JUSTIFICACIÓN	62
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	64
V. HIPÓTESIS	70
VI. OBJETIVO	71
6.1. Objetivo general	71
6.2. Objetivos particulares	71
VII. DESARROLLO EXPERIMENTAL	72
7.1. Material y reactivos	72
7.1.1. Docking	72
7.1.2. Síntesis	72
7.2. Metodología	73
7.2.1. Docking	73
7.2.2. Síntesis y purificación de las maleamidas y maleimidias acetiladas de aminofenol	75
7.2.2.1. Síntesis de Acido (2Z)-4-[(4'-hydroxifenil)amino]-4-oxobut-2-enoico	75
7.2.2.2. Síntesis de 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)fenil acetato	77
7.2.2.3 Síntesis de Acido (2Z)-4-[(4'-acetoxifenil)amino]-4-oxobut-2-enoico	79
7.2.3. Pruebas biológicas	81
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	82
8.1. Docking	82
8.1.1. Interacción de la Acetilcolina con Acetilcolinesterasa	85
8.1.2. Interacción Neostigmina con Acetilcolinesterasa	86
8.1.3. Interacción de los compuestos acetilados con la Acetilcolinesterasa	86
8.1.4. Análisis del Docking	91
7.2. Síntesis	92
7.2.1. Caracterización por Espectrometría Infrarroja	97
7.2.2. Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear	99
7.3. Pruebas biológicas “ <i>in vivo</i> ”	111
IX. CONCLUSIONES	113
X. REFERENCIAS	114

I. INTRODUCCIÓN.

I.1 BREVE RESEÑA HISTÓRICA.

El hombre aun antes de tomar una completa conciencia de su entorno buscaba aliviar sus enfermedades basándose en sus creencias, las cuales manifestaban a través de plegarias, ofrendas, ritos y danzas hacia los dioses como un castigo hacia su comportamiento. Cuando se dá un pleno desarrollo social, el hombre toma conciencia de sus acciones, se establecen las primeras civilizaciones y a su vez los primeros agentes terapéuticos naturales conjuntándolos con sus actividades mágicas o religiosas.

Los primeros fármacos son originarios del reino vegetal, descubriéndose sus efectos paliativos o desagradables, como por ejemplo: la acción purgante de la cáscara sagrada, la analgésica del opio o la paralizante del curare, sus inicios van desde la época prehistórica, hasta llegar a las civilizaciones grandes como los egipcios, mayas, etc. (sin olvidar que los egipcios ya tenían un conocimiento parcial de fármacos de origen animal). En la Edad Media se observa el uso de minerales a través de ensayo y error, a la par surgen los productos iatroquímicos al florecer la alquimia; sin embargo, no hubo un gran crecimiento científico, ya que todavía no se establecía la anatomía y la fisiología como disciplinas. De esta época se obtienen los fármacos clásicos como la quinina, los mercuriales, la belladona, la digital, el opio, etc. Todo esto constituye la protofarmacología; ó en otras palabras, el desarrollo de infusiones o extracto de productos naturales y minerales con similitud a la forma o al color del órgano afectado, como una técnica terapéutica.

Posteriormente surgió la Opoterapia que consistió en purificar los extractos con actividad farmacológica para obtener de esta manera el “principio activo”; a su vez, dió paso a la hormoterapia, esta consideraba a las hormonas como el principio activo de los extractos de las glándulas; sin embargo, al purificar los extractos vegetales se obtuvieron otros principios activos de diversas familias químicas (alcaloides, saponinas, etc.). Conforme se desarrolla la síntesis orgánica da paso al estudio de la Farmacología, la cual busca moléculas con actividad farmacológica basándose en el método científico y usando aparatos más precisos. Uno de los propósitos más ambiciosos de la Farmacología es encontrar la relación entre la estructura molecular de compuestos orgánicos y la función biológica que cumplen.^[1]

Cuando la Revolución Francesa rompe moldes del pensamiento clásico, permite que la observación y el empirismo entren como parte de las ciencias es así, que el primer

descubrimiento en el campo de las hormonas, fuera el de la adrenalina, por el químico estadounidense de origen japonés Jokichi Takamine (1854-1922), que logra aislarla y cristalizarla en forma pura a partir de extractos de las secreciones de la médula de las glándulas suprarrenales.

Los trabajos de Adolf Windaus (1876-1959) sobre los esteroides y su profunda relación con las vitaminas abrieron el campo de las hormonas sexuales. Estas investigaciones tuvieron una gran incidencia en la posibilidad de sintetizar la cortisona. Por el año de 1899 se sintetizó por primera vez la aspirina y en 1903 se sintetizó el veronal.

Antes de la Segunda Guerra Mundial solo eran conocidos los agentes anti-ChE¹ “irreversibles”, cuyo fármaco representativo era la Fisostigmina. Durante este periodo Schrader, de I. G. Farbenindustrie, desarrolló algunos organofosforados anti-AChE altamente tóxicos para usarse como insecticidas agrícolas; sin embargo, se usaron con fines bélicos. La toxicidad extrema de estos compuestos se debe a la inactivación irreversible de la acetilcolinesterasa (AChE²), (En la actualidad existen una gran variedad de fármacos que inhiben la AChE ó agentes anticolinesterásicos, permitiendo la acumulación de Acetilcolina (ACh³) en los espacios sinápticos), esto equivale a una estimulación excesiva de los receptores colinérgicos. La distribución generalizada de las neuronas colinérgicas en el organismo ha permitido aplicar este conocimiento en diferentes áreas, las cuales van desde insecticidas agrícolas, agentes tóxicos “gases nerviosos” usados en la guerra química (Segunda Guerra Mundial) hasta los agentes terapéuticos.^[2]

Es así como la síntesis de nuevos fármacos se vuelve un campo atractivo pero a su vez delicada, tanto en el ámbito moral como en el legal. Es por eso, que en la actualidad la comunidad científica pone más empeño en desarrollar moléculas cada vez más eficaces y seguras (con un mayor índice terapéutico). Por una parte, se tienen que diseñar y/o identificar nuevas moléculas biológicamente activas y por otra se deben desarrollar aquellas moléculas interesantes farmacológicamente, de forma que su uso posteriormente sea seguro y eficaz.

Todo ello, conlleva a que el descubrimiento y el desarrollo de nuevos fármacos se vuelva costoso, complejo y por encima de todo, resulte un proceso que se deba realizarse en equipo; es decir, requiere un flujo continuo de información, de comunicación entre químicos y farmacólogos, fundamentalmente en estos momentos, debe además incluir necesariamente conceptos procedentes de otras áreas como la biología molecular, la bioquímica, la medicina, la química orgánica, la genética y la bioinformática.

¹ Anti-colinesterásicos (anti-ChE).

² Del inglés, Acetylcholinesterase

³ Del Inglés, Acetylcholine

En la actualidad el proyecto genoma humano, ha demostrado que muchas de las enfermedades graves como la diabetes, el asma y la enfermedad de Alzheimer tienen componentes genéticos, por lo que la biología molecular está tratando de producir proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales como fármacos; a su vez la biología molecular aporta diversas técnicas para identificar las “**dianas**” cuya modificación por medios farmacológicos resultará ser relevante terapéuticamente. Así como hay grandes avances, se estima que de cada 10,000 compuestos químicos sintetizados como candidatos a ser fármacos, solo uno alcanzará, etapas de investigación clínica y solo uno de cada 100,000 superará los ensayos clínicos y logrará registrarse como fármaco con ventana terapéutica segura, y de cada 10 medicamentos registrados solo 3 recuperarán la inversión inicial.^[3]

1.2 DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS.

1.2.1 RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FÁRMACOS.

Comprender la relación tan estrecha que existe entre la estructura molecular y el reconocimiento que tendrá esta misma por los receptores, dando por consiguiente una respuesta biológica, permitirá desarrollar fármacos utilizando la tecnología más sofisticada para realizar búsquedas sistemáticas a gran escala con el propósito de encontrar sustancias cada vez con mayor potencial medicinal y menor toxicidad.

En las investigaciones científicas es posible que se enfoquen de dos formas, en el primero se busca encontrar al compuesto más activo de una serie sintetizada y estudiada; en el segundo se describe matemáticamente la correlación y las consecuencias o hipótesis a nivel bioquímico, farmacológico, etc., de los posibles compuestos más activos de una serie sintetizada. Como resultado de lo descrito anteriormente, es difícil generalizar los cambios de actividad que resultan de introducir algún grupo funcional en la molécula en estudio, ya que no resuelven el verdadero problema de la relación estructura actividad. La razón a todo esto, es que existen diferentes tipos de acción farmacológica donde la estructura juega un papel primordial, mientras que en otros se admite que el origen de esa acción es una propiedad física; es decir, la introducción de un grupo metilo puede actuar en doble sentido, según su actividad farmacológica. Por lo tanto la constitución de un fármaco puede tener más relevancia sólo a nivel de su acción con el receptor.^[4-5]

Ariens pionero en esta rama de la química, distingue dos fragmentos en la estructura de los fármacos: *el quimiofuncional*, que contribuye a la unión del fármaco con el receptor y *el bifuncional*, responsable de la actividad biológica. Los fragmentos bifuncionales a su vez se clasifican según su función dentro de la molécula en:

1. Porciones portadoras
2. Porciones vulnerables
3. Porciones críticas y no críticas
4. Grupos bioisómeros
5. Grupos haptofóricos y farmacofóricos

El grupo Haptofórico asiste en la unión fármaco-receptor, y el grupo Farmacofórico es el responsable de la acción biológica véase **Fig. 1**. Por otra parte Ariens establece la diferencia entre *las partes esenciales y las no esenciales* del fragmento bifuncional. Las primeras están asociadas a una gran especificidad estructural, ya que son partes activas que interaccionan con los receptores, por consiguiente no soportan grandes modificaciones químicas. En las partes no esenciales, las modificaciones químicas son posibles.^[6]

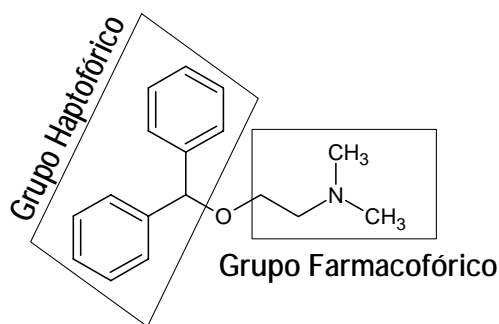


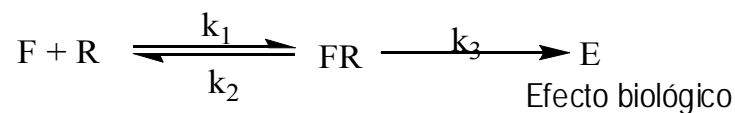
Figura 1: Fragmentos bifuncionales de la difenhidramina

La anterior clasificación permite pasar a los aspectos estereoquímicos que justifican el concepto de receptor; ya que permite interrelacionar de manera lógica la estructura-actividad. Como Ehrlich lo visualizó, los receptores son la extensión lógica de la teoría de acción de fármacos basada en la analogía de la llave y la cerradura. Esto es evidente, al observar las diferencias entre la actividad biológica de estereoisómeros ópticamente activos (Productos cuya diferencia consiste en ser uno la imagen especular del otro). Este hecho pone al descubierto que una parte de la molécula del fármaco necesita una estructura complementaria al receptor para provocar una acción biológica.

Por otro lado, existen tres características de un fármaco que indican que estos en la célula se concentran en áreas pequeñas y específicas (que son los llamados “receptores”), los cuales son:

- a. Alta dilución a la cual los fármacos retienen su actividad.
- b. Gran especificidad química de los fármaco, principalmente desde el punto de vista estérico
- c. Alta especificidad biológica de los fármacos.

En pocas palabras la estructura tridimensional de las moléculas juega un papel importante en la selectividad de su acción biológica. En 1937, A.J. Clark demostró que el complejo fármaco-receptor obedece a la ley de acción de masas, lo que permite interpretar los datos cuantitativos como resultado de formación de enlaces entre el fármaco y el receptor específico de dicho fármaco. Esto se representa mediante la siguiente ecuación: ^[1]



Donde:

k_1 = Constante de la velocidad de adsorción

k_2 = Constante de velocidad de disociación

k_3 = Constante de velocidad de producción del efecto

Esta ecuación tiene relación con la actividad enzimática, a partir de una primera etapa de unión enzima-sustrato. La mayoría de los receptores son enzimas; por lo tanto, son blancos de algunos fármacos; un claro ejemplo es la unión de los insecticidas organofosforados con la acetilcolinesterasa. En este contexto el concepto de receptor puede abarcar; como consecuencia de la interacción fármaco-receptor, los siguientes casos:

- A. Un cambio en la conformación y distribución de cargas en el fármaco que lo hace más reactivo y capaz de experimentar un cambio químico; de esta forma el fármaco se metaboliza.
- B. El cambio en la conformación y distribución de cargas en el fármaco activa al receptor. Estos cambios en el receptor inducen a su vez cambios conformacionales y de distribución de cargas en el sitio activo del receptor y en los receptores vecinos, iniciando la subsiguiente respuesta fisicoquímica que culminará en el efecto biológico.
- C. La ausencia de cambios en el fármaco o receptor (NO HAY EFECTO), a estos receptores se les conoce como receptores silenciosos o indiferentes. ^[7]

La interacción entre producto-receptor tiene una adaptación mutua en cuanto a forma y distribución de cargas, que permite afirmar:

- 1) Entre mayor sea el grado de complementariedad entre fármaco y receptor, mayor será la especificidad y la actividad biológica del producto.
- 2) La unión que se da entre fármaco-receptor, es igual a la que se da en moléculas sencillas y/o a las que sirve para estabilizar una estructura proteica (ej. Electroestáticas, de puente de hidrógeno, de dipolo-dipolo, de transferencia de
- 3) El enlace covalente representa una unión irreversible entre el fármaco y el receptor, por ser un enlace que contiene una gran energía.
- 4) Puede existir una interacción entre las partes no polares del fármaco y del receptor como consecuencia de una afinidad hidrofóbica, por lo que las moléculas de agua quedan desplazadas y aumenta la entropía del sistema.

En vista de todos los requerimientos estéricos que hacen la diferencia de la actividad biológica entre isómeros o entre diastereoisómeros, se admite que el receptor es de naturaleza proteica o lipoproteína y que forma parte de la membrana celular. Ariens (1801) en sus trabajos estableció la diferencia entre afinidad y la actividad intrínseca o eficacia de los fármacos. La primera define el grado de interacción fármaco-receptor (FR) para dar paso al complejo FR formado, teniendo presente la cantidad de fármaco cercano al receptor(es); por lo tanto, esto equivale farmacológicamente a la potencia de este mismo (Dosis necesaria para inducir un efecto determinado).^[8]

Por otro lado, la eficacia es la habilidad para producir en el receptor los cambios necesarios para producir un efecto biológico; es decir, la eficacia se observa después de la formación del complejo FR. Por lo anterior la importancia de los factores estéricos en la respuesta biológica, cualquiera que sea su mecanismo por el cual el fármaco y el receptor interactúan. El paso primordial para la formación del complejo FR es la cercanía a la cual debe estar el fármaco del receptor, y segundo paso, es el ajuste entre estos mismos; la parte crítica del fármaco, es la parte involucrada en el ajuste con su receptor, de esta manera si hay cambios notables en esta porción, habrá cambios en el ajuste y en la respuesta biológica.

La isomería óptica, geométrica y conformacional, juegan un papel importante en la respuesta farmacológica; ya que de manera general, se le atribuyen las diferencias en actividad biológica como:

- Diferencias en la distribución de los isómeros en el organismo.
- Diferencias en las interacciones isómeros-receptor específico.
- Diferencias en la adsorción de isómeros sobre otros receptores.

La isomería óptica permite conocer a grandes rasgos la presencia de un carbono asimétrico (carbono con 4 sustituyentes diferentes) en la molécula, esto da paso a los enantiómeros: una molécula es imagen en un espejo de la otra, por lo que no son superponibles, basándose en la relación de la mano derecha con la izquierda. **Véase Fig. 2**

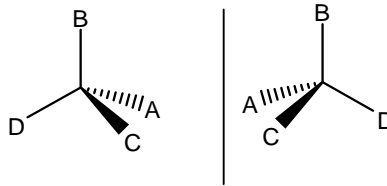


Figura 2: Imagen especular de 2 moléculas ópticamente activas

Se distinguen una de la otra por la rotación del plano de la luz polarizada que presentan; por lo tanto si desvía la luz hacia la derecha se llama *Dextrógiro* y si gira la luz hacia la izquierda es *Levógiro*. Las propiedades físicas de este tipo de isómeros son iguales: punto de fusión, solubilidad en solventes aquirales, reactividad química, este último se presenta si los compuestos con lo que va a reaccionar no presentan carbono asimétrico. Así mismo, no se observa diferencia entre la velocidad de penetración cuando es por difusión pasiva, pero si cuando hay transporte activo.

En cuanto a la respuesta biológica, ambos pueden tener actividad, pero la potencia será diferente. Una mezcla racémica (*productos de una reacción química, con actividad óptica debido a isomerismo, son encontrados en proporciones equivalentes, por lo tanto se cancela el giro de esta luz*) presenta una potencia promedio de los isómeros presentes en esta, y pueden presentar antagonismo farmacológico entre ellos.

Las diferencias entre los isómeros ópticos se explican a través de la teoría interacción FR o FE (fármaco-enzima) a nivel de 3 puntos llamada “Three-point attachment theory”⁴, mejor conocida como triada catalítica en Bioquímica y Farmacología. Los anterior indica que el receptor tienen a disposición grupos complementarios “A’, B’, C’ ” los cuales podrán acoplarse a uno de los isómeros. **Véase Fig. 3**

⁴ De los anglosajones.

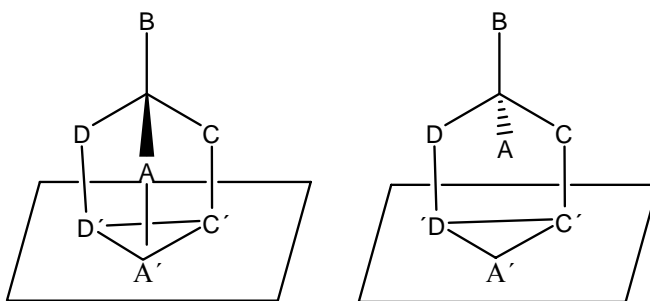


Figura 3: Interacción de 2 isómeros ópticos con un mismo receptor.

La naturaleza de los grupos ABCD unidos a un carbono asimétrico de un isómero farmacológicamente activo es importante, ya que permite definir la naturaleza del receptor involucrado en la respuesta biológica. El hecho de que varios isómeros tengan la misma actividad se debe a:

- a. El receptor solo tiene dos puntos de contacto.
- b. Los grupos unidos al carbono asimétrico no son los que intervienen en la unión con el receptor.

La isomería geométrica.- Es un estereoisomerismo especial, denominado isomerismo **E-Z**, que se refiere a la isomería que ocurre como resultado de la restringida rotación por un doble enlace o un sistema cíclico no plano y relativamente rígido. Este tipo de isomería no necesariamente imparte actividad óptica a los isómeros, si la estructura es asimétrica o disimétrica los isómeros geométricos pueden exhibir entonces actividad óptica. Las propiedades químicas y físicas son diferentes, puesto que los grupos funcionales de estos isómeros están separados por diferentes distancias.

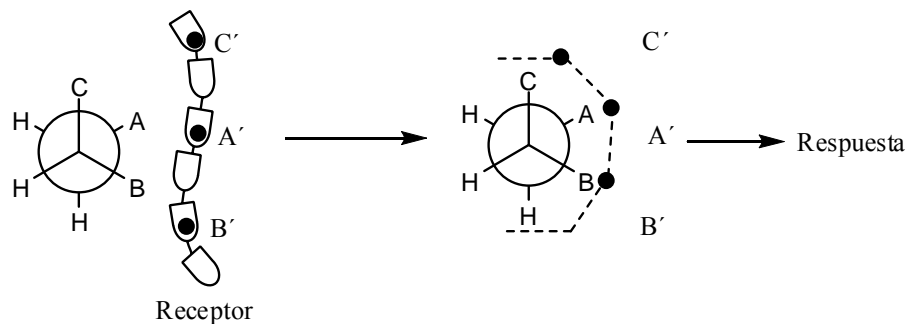
La isomería conformacional.- Resulta de las diferentes posiciones espaciales que pueden aparecer en una molécula como consecuencia de la rotación alrededor de enlaces sencillos y que puede originar una preponderancia de alguna de estas disposiciones como consecuencia de la existencia de barreras energéticas entre los diferentes isómeros. Por tal motivo pueden existir infinidad de conformaciones pero las energéticamente favorecidas se muestran a continuación en proyección Newman:



Considerando la repulsión estérica entre los grupos de la molécula, se deduce lo siguiente:

- Si no hay impedimento estérico entre sí, la forma alternada será la favorecida termodinámicamente y la forma eclipsada será la menos favorecida.
- Si la diferencia de energía entre ellas es suficientemente grande, estas formas podrán existir independientemente una de la otra.
- Si las barreras energéticas entre las conformaciones son bajas, existirá una libre rotación y habrá una interconversión de unas y otras.

Las barreras energéticas entre conformaciones son debidas a las interacciones de los átomos no unidos directamente, por lo que habrá conformaciones preferentes, donde los sustituyentes estarán lo más separado posible. Con respecto a lo anterior, si representamos esquemáticamente un receptor y el conformero apropiado o biológicamente activo, podemos suponer el siguiente proceso de adaptación estérica que tendría como consecuencia una respuesta biológica.



Otro conformero no se podrá ajustar y por consiguiente no habrá respuesta, con un supuesto antagonista ocurrirá lo mismo. La conformación activa que podríamos llamar farmacóforo, y que permite la interacción con el receptor no es necesariamente el conformero preferentemente o más estable al estado sólido o en solución. El conformero activo puede ser termodinámicamente inestable, pero la energía de unión con el receptor puede salvar la barrera de formación de dicho conformero. Esto se puede ver en la acetilcolina, la cual puede presentar

las 4 conformaciones descritas, pero se ha demostrado por resonancia magnética nuclear que en solución acuosa adopta una configuración sesgada o cisoide^[9] Véase Fig. 4.

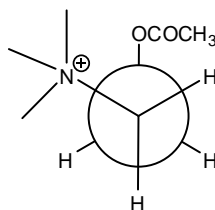


Figura 4: Representación de Newman de la ACh, configuración sesgada.

La flexibilidad conformacional permite explicar los efectos biológicos múltiples de los neurotransmisores de cadena abierta como la ACh, la cual se ha sugerido que interacciona con receptores muscarínicos (a nivel posganglionar del sistema parasimpático), y que es transformada por la acetilcolinesterasa en su conformación extendida (alternada), también interacciona con los receptores nicotínicos (a nivel preganglionar del sistema parasimpático y simpático), y que también es transformada por la AChE en su conformación más plegada (cisoide). El problema de la determinación de la conformación farmacológicamente activa (*conformación farmacofórica*), se ha tratado de resolver mediante síntesis de análogos conformacionalmente rígidos de las moléculas flexibles. Como resultado se le imparte a la molécula nuevas propiedades fisicoquímicas que se toman en cuenta al analizar los datos farmacológicos. En el caso de la ACh se han preparado análogos ciclopropánicos correspondientes de la ACh.^[10] Véase Fig. 5.

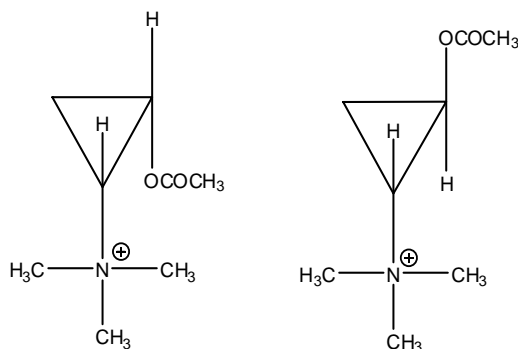
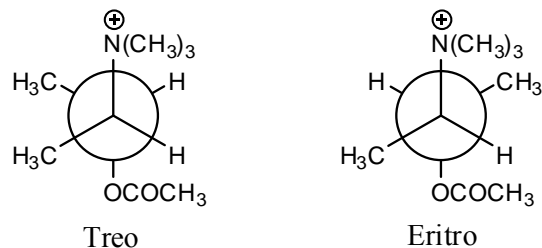


Figura 5: Conformación cisoide y transoide respectivamente de la ACh

El cambio estructural respecto a la ACh es fuerte (introducción de un ciclo de tres átomos), así la actividad de estos análogos comprueba que la conformación transoide de la ACh es la responsable de la actividad muscarínica; así mismo es fácilmente hidrolizada por la AChE.

Estas analogías, permiten aplicarlos al estudio de la actividad farmacológica de diastereoisómeros, tomando en cuenta que el isómero más activo será aquel que más rápidamente o fácilmente adopte la conformación que mejor se ajuste al receptor para dar una respuesta. Un ejemplo claro es el caso de los diastereoisómeros de la α,β -dimetilacetilcolina:



El racemato *eritro* tiene una actividad muscarínica mucho más alta que el racemato *treo*; ya que adopta fácilmente a la conformación transoide, determinando así su potencia. A la par se observa que el isómero *treo* está menos favorecida que el *eritro*, debido a la cercanía de los dos metilos, lo cual concuerda con la menor potencia muscarínica presentada por el isómero *treo*.^[10]

El concepto de isosterismo; introducido por Langmuir en 1919, es usado en la actualidad para el diseño de fármacos. Se define a los isómeros, a aquellos átomos o grupos de átomos en los que pueden considerarse idénticas las capas periféricas electrónicas, en lo que concierne a su forma, tamaño y polaridad. Podrán ser por lo tanto, monovalentes, divalentes, etc. **Ver Tabla 1.**

El concepto se ha visto ampliado al de bioisosterismo, en donde quedan incluidos aquellos grupos atómicos con propiedades estéricas, configuraciones electrónicas y actividades biológicas similares, aunque el número de electrones sea diferente, como por ejemplo: CO_2 y SO_2NR , los grupos -CO- y $\text{-SO}_2\text{-}$; los grupos $\text{-CO}_2\text{H}$ y $\text{.SO}_3\text{H}$; y los grupos $\text{-SO}_2\text{NH}_2$ y -P(O)(OH)NH_2 . Este concepto se ha usado mucho en el desarrollo de fármacos, en relación al modelo copiado, como el desarrollo de antagonistas de sustancias fisiológicas.^[12]

TABLA 1. GRUPOS ISÓSTEROS			
<i>Monovalentes</i>	<i>Divalentes</i>	<i>Trivalentes</i>	<i>Tetravalentes</i>
F-	-O-	-N=	=C=
OH-	-S-	-P=	=N=
NH ₂ -	-Se-	-As=	=P=
CH ₃ -	-Te-	-Sb=	=As=
Cl-		-CH=	

1.3 RECEPTORES.

1.3.1 DESCRIPCIÓN Y LOCALIZACIÓN.

La recepción de información por parte de una célula es una cuestión compleja. Para este propósito las células presentan un elaborado arreglo de proteínas de transmembrana (receptores), cuya función es adquirir información del espacio extracelular y transferir esta información al interior de la célula. Al respecto, los receptores de la superficie celular actúan como "antenas" de la célula; es decir, son cadenas polipeptídicas que atraviesan varias veces la membrana celular formando asas y cubriendo así una importante extensión. Los aminoácidos que conforman el sitio de unión se ubican en la cara extracelular.

Los receptores pueden ser detectados y medidos en forma indirecta por técnicas autoradiográficas o imagenológicas [PET] (estudios con radioligandos que permiten localizar sus sitios de unión), por técnicas inmunohistoquímicas (que localizan las proteínas del receptor) o por detección de su RNAm en técnicas de hibridización *in situ* (que permiten una localización selectiva de los cuerpos celulares que producen los RNAm). Además, los receptores humanos pueden ser transfectados en otras células para estudiar su comportamiento en un medio diferente. Los receptores pueden ubicarse en el telodendrion (autoreceptores), en el soma neuronal o sus dendritas (somatodendríticos) y en la célula postsináptica; algunos se ubican a nivel intracelular como los receptores de hormonas.^[13]

Los receptores tienen una selectividad y configuración de unión por un neurotransmisor o ligando particular en virtud de su conformación molecular (sitios de alta afinidad). Esto no implica que el ligando no pueda unirse a otros receptores con una menor afinidad (unión menos selectiva), produciendo efectos diversos o bloqueando la acción de otros ligandos. Para determinar la afinidad ligando-receptor se utilizan medidas como el $B_{máx}$, que se refiere a la capacidad máxima de unión en proporción directa con la densidad de receptores estimada, y la constante de disociación (K_d), la cantidad necesaria de un ligando natural para desplazar a un ligando marcado, previamente administrado, de la mitad de los receptores que ocupa. A nivel del sistema nervioso central (SNC), los receptores pueden ubicarse en la membrana presináptica (autoreceptores), en el soma neuronal o sus dendritas (somatodendríticos) y en la célula postsináptica; algunos se ubican a nivel intracelular como los receptores de hormonas. Los receptores atraviesan las membranas celulares estableciendo un punto de transmisión de la información proveniente del exterior a través de los neurotransmisores y otros ligandos. Por ligando se entiende toda molécula capaz de interactuar con un receptor determinado en virtud de su estructura. La unión del neurotransmisor con el receptor produce diferentes respuestas según

la localización del receptor (el área cerebral donde se encuentra, si es presináptico o postsináptico), el número (densidad) y la sensibilidad de los receptores y su asociación a canales. ^[14]

Existen varios tipos de receptores, algunos se encuentran unidos a canales iónicos, que al unirse el ligando al receptor permite la apertura del canal y por lo tanto la entrada de un ión. La despolarización es un buen ejemplo, ya que la corriente nerviosa se propaga a través del axón cuando el sodio (un ión) ingresa por un canal al interior de la célula cambiando su potencial eléctrico. Los canales iónicos están presentes en las membranas celulares en baja cantidad. Son utilizados por los neurotransmisores que conducen a rápidos cambios postsinápticos y regulan el flujo de información sensorial y la respuesta motora. Un simple cambio en la conformación del canal lo abre, permitiendo el flujo de millones de iones por segundo a través de la membrana plasmática. Existen canales iónicos ligados a los cambios de voltaje en la membrana, otros se encuentran unidos a ligandos intracelulares como el Ca^{2+} , AMPc, GMPc o ácido araquidónico y otros están regulados por la activación de receptores ligados a proteína G, que al descomponerse en la subunidad α o la subunidad $\beta\gamma$ los activa (Por ejemplo: G- α al canal de K^+ -Ach y G- $\beta\gamma$ al canal de K^+ -ATP). Otros receptores no se encuentran unidos a ningún canal, simplemente atraviesan la membrana celular y establecen contacto con proteínas que se encuentran en el interior de la célula (como la proteína G). La unión del ligando a estos receptores permite que ellos entren en contacto con la proteína G activándola y posteriormente, se lleva a cabo la transducción. Estos eventos terminan con la modulación de la expresión del material genético que se encuentra en el núcleo de las neuronas (denominado señalización hacia el núcleo). ^[15-17]

1.3.2 FÁRMACO-RECEPTOR.

Un fármaco al interactuar en un sistema biológico produce un efecto, el cual se define como el resultado final de las interacciones fisicoquímicas entre el fármaco y una molécula del sistema biológico. Un fármaco puede interactuar con una molécula pequeña (Por ejemplo la unión del Pb^{2+} con un agente quelante como tratamiento por envenenamiento con plomo), o con una macromolécula de los tejidos, llamado receptor. El concepto de receptor tiene su origen en dos líneas de experimentación que difieren entre sí, y que se realizaron en los primeros años del siglo XX. ^[18, 19]

“La mayoría de las respuestas del organismo ante un fármaco, se dan por la unión con sus receptores (interacción fármaco-receptor), dicha interacción produce modificaciones en el sistema, que desencadena un proceso bioquímico y fisiológico que caracteriza la respuesta o

reacción al fármaco”, Paul Ehrlich (1854-1915), propuso este concepto como una explicación al proceso inmunológico, en el cual los receptores se localizan en las células. Ehrlich imaginó un sistema de cerradura-llave estereoespecífico entre los anticuerpos y sus sustancias antígenas. A través de su estudio sobre la quimioterapia postuló la existencia de “cadenas laterales” específicas en células con una estructura química y estérica peculiar, las cuales solo se combinarían con anticuerpos de forma y composición química complementaria a estas; así mismo, dijo que las cadenas laterales eran esenciales para los procesos biológicos, por lo que podían diferir en forma y composición en los diferentes tipos de células. Ehrlich pensó que estas cadenas laterales estaban compuestas de algunos grupos químicos funcionales como $-SH$, $-NH_2$, etc., es así como Ehrlich llamó receptores a estos grupos funcionales. En la misma época J.N. Langley (1852-1926) y en base a sus estudios del efecto del curare (veneno Sudamericano) sobre nervios motores, encontró que este bloqueaba la transmisión de los impulsos nerviosos del nervio motor a los músculos esqueléticos, localizando el sitio de bloqueo en las terminaciones nerviosas finas del músculo. Más adelante en su investigación, estimuló químicamente al músculo aislado con nicotina, luego administró el curare y encontró que este bloqueaba la acción de la nicotina; pero todavía era posible estimular al músculo con impulsos eléctricos, lo que llevó a Langley a concluir, que tanto el curare como la nicotina actuaban sobre moléculas localizadas entre el músculo y el nervio motor; dándole de esta forma el nombre de sustancia receptora.^[20]

Estos dos pioneros en el estudio de los receptores, influyeron en varios campos de estudio, para identificar a los receptores como proteínas específicas o ácidos nucleicos, y que cada día se siguen identificando más.

1.3.3 FUERZAS DE UNIÓN EN LA INTERACCIÓN FÁRMACO-RECEPTOR.

Existen diferentes tipos de unión entre fármaco y receptor: covalentes, iónicos, puentes de hidrógeno, Fuerzas de Van der Waals, entre otros.

En la **unión covalente** la mayor parte del tiempo se mantienen unidos los átomos de moléculas orgánicas por compartir un par de electrones, esta unión tiene una energía de aproximadamente de 100 kcal^{-1} , lo que explica la irreversibilidad a temperaturas comunes, a menos que intervenga un agente catalítico (enzima). El resultado de esta interacción son complejos estables de larga duración. Dentro de este grupo los fármacos pueden ser agentes alquilantes, los cuales dan lugar a un intermediario catiónico reactivo (ión carbonio) que reacciona con los receptores; por lo

tanto el efecto del fármaco es el resultado de una alquilación de los receptores. Un ejemplo claro, es la inhibición de colinesterasa por fosfatos orgánicos y carbamatos.

En **la unión iónica** resulta de fuerzas culómbicas (atracción electrostática) entre iones cargados opuestamente, la energía de enlace se aproxima a 5 kcal mol^{-1} y la fuerza de atracción entre los iones disminuye de acuerdo al cuadrado de la distancia entre ellos. Las proteínas y los ácidos nucleicos tienen grupos aniónicos y catiónicos, pero solo un grupo pequeño de éstos está ionizado en los límites fisiológicos de pH. Los grupos aniónicos de las proteínas son carboxilos del Ac. glutámico, Ac. aspártico y hasta cierto punto los grupos sulfhidrilo de la cisteína; los grupos aniónicos aparecen en la lisina, arginina, histidina, glutamina y la asparagina, (grupo amido) así como en el $-\text{NH}_2$ terminal de las proteínas. ^[21, 22] Los fármacos pueden tener potencialmente grupos catiónicos o aniónicos, capaces de formar uniones iónicas con grupos receptores de carga contraria; así mismo, hay un carácter parcialmente iónico cuando el receptor ionizado interactúa con los átomos del fármaco no ionizado, por ejemplo los electrones que forman las uniones del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) son compartidos de forma desigual formando un dipolo, y cualquiera de sus polos puede ser atraído por un ion.

La **unión por puentes de hidrógeno** es una unión iónica que se origina en la capacidad de un protón para aceptar un par de electrones proveniente de átomos donadores de electrones, como el oxígeno o el nitrógeno, y formar entre ellos un puente de aproximadamente 3Å . La fuerza de unión es de $2\text{-}5 \text{ kcal mol}^{-1}$. El enlace por puente de hidrógeno estabiliza las estructuras terciarias de las proteínas, la unión se da entre residuos de aminoácidos que están muy separados en la cadena primaria; así mismo, los puentes de hidrógeno interno pueden afectar las propiedades físicas de las moléculas del fármaco, por ejemplo en el isómero orto del ácido hidroxibenzoico, al formarse el puente de hidrógeno intramolecular, se reduce la afinidad por el agua, disminuyendo su solubilidad; sin embargo, los isómeros meta y para, no forman puente intramolecular. Véase Fig.6

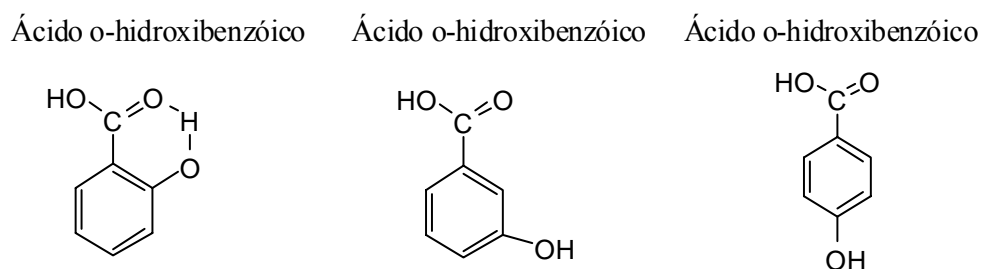


Figura 6: Puente de hidrógeno intramolecular en el isómero orto del ácido hidroxibenzoico.

La *unión por fuerzas de Van Der Waals* es una interacción muy débil entre dipolos o dipolos inducidos, frecuentemente entre átomos semejantes. Los átomos implicados en este tipo de uniones entre fármacos y receptores son los carbonos, por estar en mayor abundancia en las moléculas orgánicas. Las fuerzas de atracción se originan de distorsiones ligeras inducidas en las nubes de electrones que rodean cada núcleo cuando dos átomos se aproximan lo suficiente. La energía de unión es de solamente $0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$; sin embargo, este tipo de enlace es importante para determinar la especificidad de las interacciones fármaco-receptor, por lo que se consideran 2 aspectos importantes:

1. La suma de todas las interacciones que se producen entre los átomos, da como resultado una gran fuerza de unión, independientemente de que la fuerza individual sea débil.

2. La fuerza de unión depende de la distancia interatómica, y en base a las propiedades fisicoquímicas de la molécula, se puede observar el alto grado de selectividad entre una serie de fármacos íntimamente relacionados, a este fenómeno se le conoce como “Bondad de ajuste”. Aquella conformación del fármaco que permita la mayor cercanía a la superficie del receptor, se dice que tiene un ajuste efectivo comparado con otra molécula de conformación ligeramente distinta. No olvidar que la cercanía entre el fármaco y el receptor activa a la par otras atracciones por correlación electrónica, que permitirán o impedirán la aproximación perfecta a esta. ^[23, 24]

1.3.4 INTERACCIÓN FÁRMACO-RECEPTOR

Después de que se lleva a cabo la combinación de las diferentes fuerzas de unión entre el fármaco y el receptor, se produce una agitación térmica al azar, originando colisiones múltiples con la superficie, es entonces cuando se habla de que el fármaco está rodeado total o parcialmente por agua, mismo que sucede en las partes polares de los receptores. Por tanto, la unión fármaco-receptor ocasiona la expulsión de estas capas de agua intermedias, a esta interacción se la conoce como la formación de uniones hidrofóbicas. La atracción inicial que generalmente dirige al fármaco hacia su receptor son las fuerzas electrostáticas; así mismo, se piensa que la aproximación íntima entre el fármaco y el receptor debe ser de $1-3\text{\AA}$ para la formación de las uniones. Sin embargo, con la mayoría de los fármacos la unión a los receptores no es tan fuerte como para evitar por completo la disociación, como resultado se establece una interacción reversible que obedece la ley de masas (*Teoría de Ocupación Simple*). ^[25]

1.3.5 DOCKING.

Es la forma de medir las interacciones ligando-receptor y su energía de enlace. La obtención de un producto farmacológicamente activo, está dado por una serie de etapas, las cuales nos permiten plantear una aproximación complementaria del sujeto de estudio, con el objetivo de optimizar, dirigir y minimizar costos, producción y tiempo. Así mismo, el docking es una técnica que permite medir las interacciones ligando-receptor y su energía de enlace. La primer etapa consiste es la elección del sujeto de estudio, también conocido como molécula blanco, sobre la que activa o actúa el fármaco para lograr el efecto terapéutico deseado. Diversas investigaciones sobre los fármacos empleados en las últimas décadas han revelado que la acción terapéutica de éstos incide principalmente en proteínas; ya sea como receptores moleculares o como enzimas. Véase Fig.7

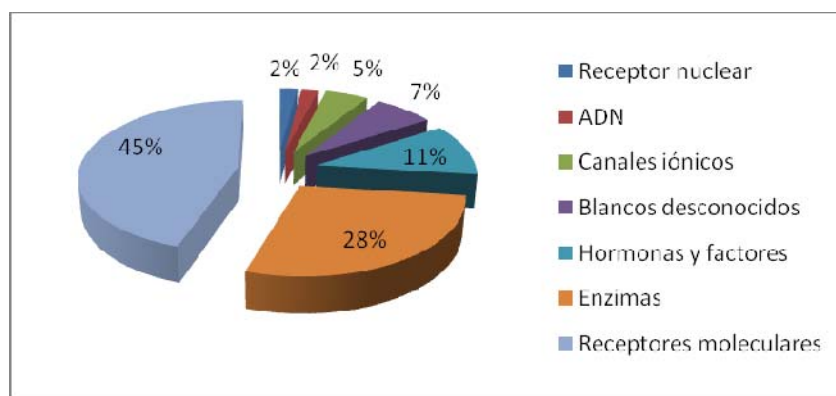


Figura 7. Distribución de moléculas blanco en un estudio sobre 485 fármacos de uso actual.

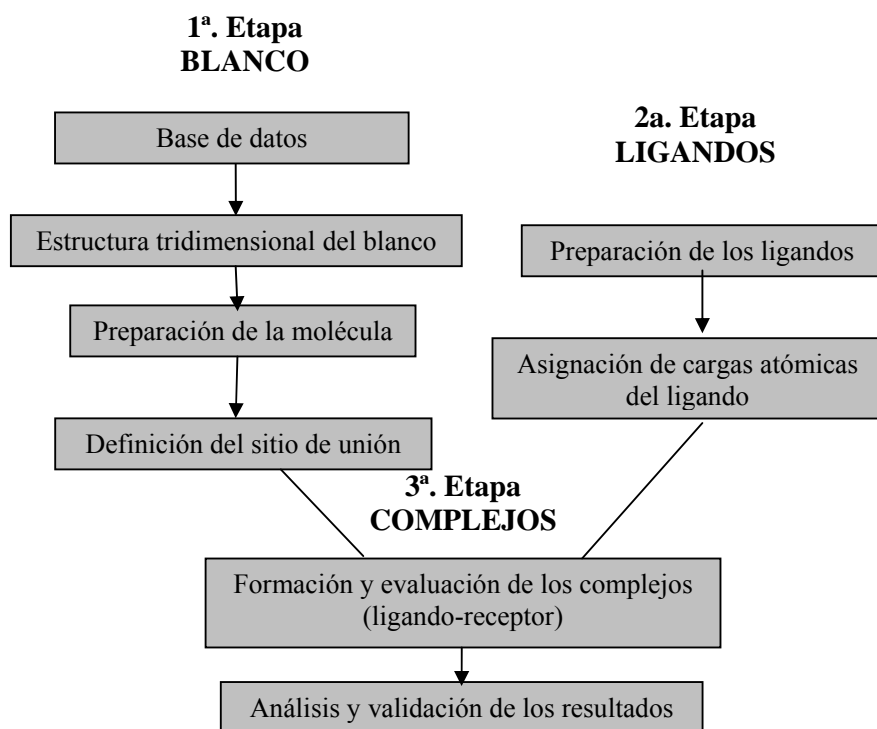
Por esta razón, en el diseño racional de medicamentos las proteínas pueden considerarse como la primera opción para fungir como moléculas blanco. Cuando se trabaja con proteínas, y particularmente con enzimas como blanco, deben considerarse tres factores importantes: selectividad molecular de la enzima, la afinidad o fuerza con que se fija el sustrato a ella, y la geometría del sitio de unión. La mayoría de los fármacos son inhibidores enzimáticos; por lo tanto, durante su desarrollo se busca que cumplan con estas características. Los ensayos masivos que se llevan a cabo en esta etapa, requieren de utilizar grandes bancos de datos para obtener, procesar y almacenar cantidades colosales de resultados experimentales. Por esta razón, en años recientes se ha optado por la simulación molecular por computadora, tal es el caso del docking.

La siguiente etapa es la identificación de moléculas líder, que son aquellos compuestos que muestran tener una actividad significativamente alta sobre el blanco seleccionado. Las moléculas líder que demuestran ser químicamente viables y poseer alta actividad biológica son caracterizadas estructuralmente y sometidas después a un proceso de optimización de su

potencia farmacológica, en este paso se generan derivados de las moléculas líder, y se determina su estructura tridimensional, así como la relación que existe entre la actividad biológica que manifiestan y algunas de sus propiedades moleculares; tarea que se lleva a cabo con el empleo de la técnica conocida como QSAR⁵. Los resultados obtenidos con esta técnica dirigen el diseño de nuevos compuestos con actividad farmacológica que se presume será mayor a la de los líderes previos.

1.3.5.1 MÉTODO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR O DOCKING.

Esta técnica es una alternativa a los ensayos masivos en los laboratorios y en el diseño de fármacos, tanto para llevar a cabo las etapas de identificación del sitio de unión con el blanco, como la de construcción y evaluación de los complejos moleculares resultantes; para esto se sigue una serie de pasos:^[26]



La tercera etapa es la parte más importante del método; ya que, consiste en un algoritmo de búsqueda que toma cada uno de los ligandos de la base de datos y los coloca dentro del sitio de unión en una gran cantidad de orientaciones, para lo cual existe un criterio basado en puntuajes. Finalmente, el programa genera las mejores orientaciones conforme al puntaje de su

⁵ Siglas en inglés para *Quantitative Structure-Activity Relationship*

orientación óptima. Antes de iniciar con la técnica es indispensable que la estructura tridimensional del blanco haya sido determinada previamente, por difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear. La fuente principal de esto, es el PDB⁶ (Protein Data Bank); sin embargo, es necesario hacer adecuaciones a estos archivos como: la adición de átomos de hidrógeno unidos a heteroátomos (mitad de los átomos totales de la proteína), remoción de moléculas de agua de la superficie protéica, modelado de regiones que no pudieron ser determinadas experimentalmente, Asignación; conforme al pH en la simulación, de cargas positivas, negativas y neutras a los átomos, sin olvidar las cargas parciales. El siguiente paso es la identificación de los posibles sitios de unión del receptor; ya sea computacional (búsqueda de cavidades con características de tamaño, hidrofobicidad y grupos funcionales) o experimentalmente a través de difracción de rayos X (se usa un solvente orgánico que difunda por el cristal de la proteína).^[21-23, 26] El tercer paso, es la optimización de compuestos a probar; los cuales se les hace el mismo acondicionamiento que los receptores y otras más como: La estructuración tridimensional de la molécula y asignación de cargas usando un algoritmo basado en cálculos de electronegatividad de los átomos involucrados en cada enlace químico. Como último paso, se hace la simulación de la formación de complejos, en donde se determina el número de contactos totales que pueden establecerse entre cada pareja de átomos del sitio de unión y del ligando, en una orientación particular de éste. El contacto que se considera, es aquel en el cual el ligando y el receptor se encuentran a una distancia menor o igual a la de un valor umbral (v.g. 5 Å), debida a la complementariedad de la forma geométrica del ligando con la cavidad del blanco. A pesar de la eficiencia de la técnica, no se puede calcular la naturaleza de los átomos que interactúan con este programa, para esto se usan otros programas como regularización de geometría o de simulación dinámica molecular, las cuales emplean ecuaciones matemáticas de la física clásica que determinan la energía de unión no covalente de la unión ligando-blanco como función de las distancias atómicas entre moléculas.

Finalmente, se requiere verificar *in vitro* e *in vivo* que los compuestos que muestran gran afinidad y selectividad por el blanco, no interfieren significativamente con otros procesos dentro del organismo, y que los productos de degradación del ligando tampoco resultan ser tóxicos o inactivos. Una de las limitaciones en la correlación de los parámetros fisicoquímicos con la actividad biológica es que la selectividad de los estereoisómeros ópticos para los receptores no podría ser prevista por simple correlación técnica. Los estereoisómeros, como ya antes se mencionó no muestran diferencias en sus propiedades fisicoquímicas en la ausencia de una superficie disimétrica, y por lo tanto los parámetros que predicen hidrofobicidad o arreglos electrónicos no difieren entre isómeros ópticos. Por lo anterior, cuando se habla de diastereoisomerismo y de isomerismo geométrico se habla de estereoselectividad en vez de

⁶ www.pdb.org

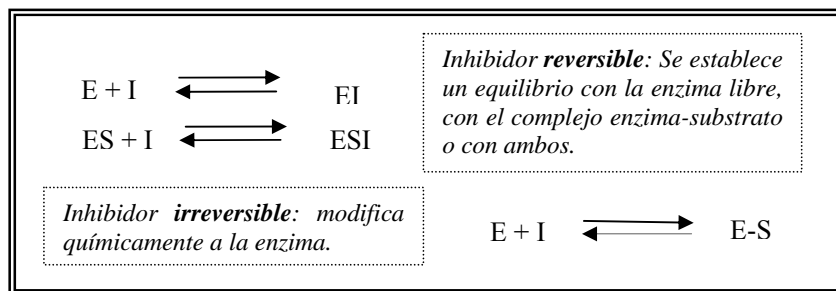
estereoespecificidad, esto se debe a que un estereoisómero da una respuesta biológica y el otro estereoisómero da una respuesta opuesta o simplemente no la da.

1.4 INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

Los fármacos (inhibidores) son capaces de disminuir la actividad enzimática a través de interacciones con el centro activo u otros centros específicos (alostéricos); en más del 50% de los casos, los fármacos ejercen su efecto al actuar sobre las enzimas para frenar la vía metabólica de la que forman parte, tal acción depende del tipo de inhibición, geometría y grupos funcionales de dichos inhibidores. Esta definición excluye todos aquellos agentes que inactivan a la enzima a través de desnaturalización de la molécula enzimática. De esta forma, se conocen dos tipos de *inhibidores enzimáticos*:^[27]

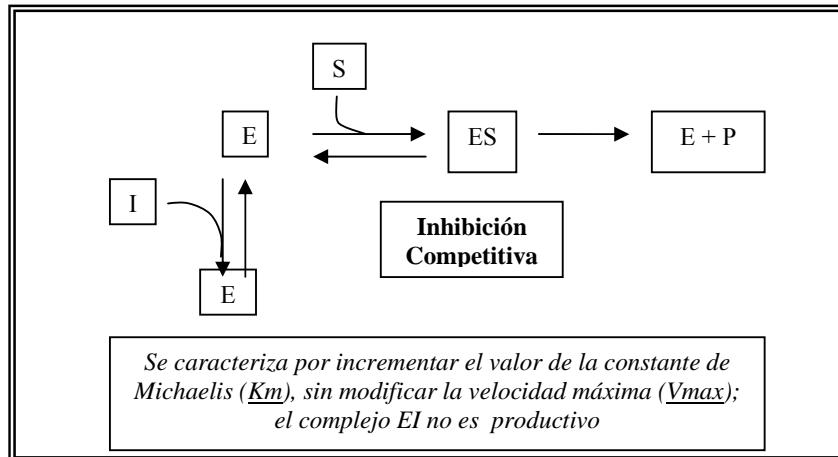
1. **Isostéricos**: ejercen su acción sobre el centro activo.
2. **Alostéricos**: ejercen su acción sobre otra parte de la molécula, causando un cambio conformacional con repercusión negativa en la actividad enzimática.

Los *inhibidores isostéricos* pueden ser de dos tipos según su mecanismo de acción: *irreversibles*; modifican covalentemente a las enzimas produciendo cambios permanentes en estas, de tal manera que su capacidad catalítica disminuye en función del tiempo de reacción; estos tipos de inhibidores pueden llegar a ser altamente tóxicos, *reversibles*; que a su vez pueden ser inhibidores competitivos, no competitivos y acompetitivos.

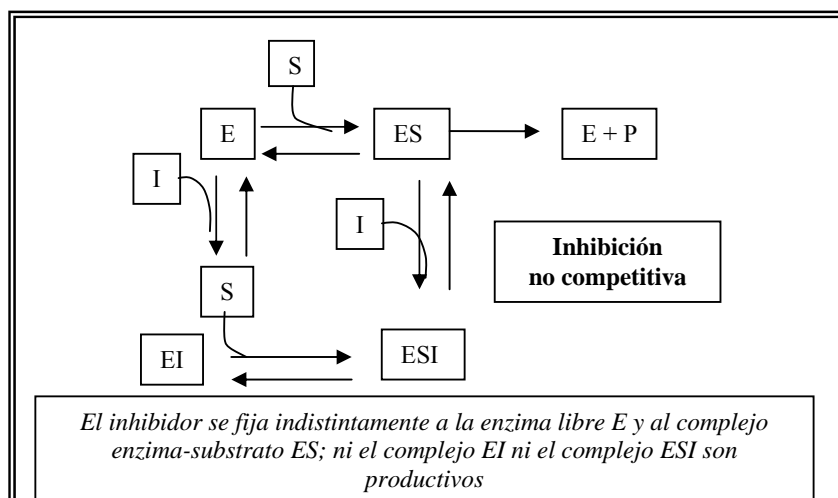


La mayoría de *inhibidores competitivos* tienen analogía estructural con el sustrato natural correspondiente a la enzima, por lo tanto al ser muy selectivos, los dos compiten por ocupar el sitio activo de la enzima, este tipo de inhibidores son llamados antimetabolitos. Su acción inhibitoria depende de la concentración del sustrato, de esta manera al aumentar la

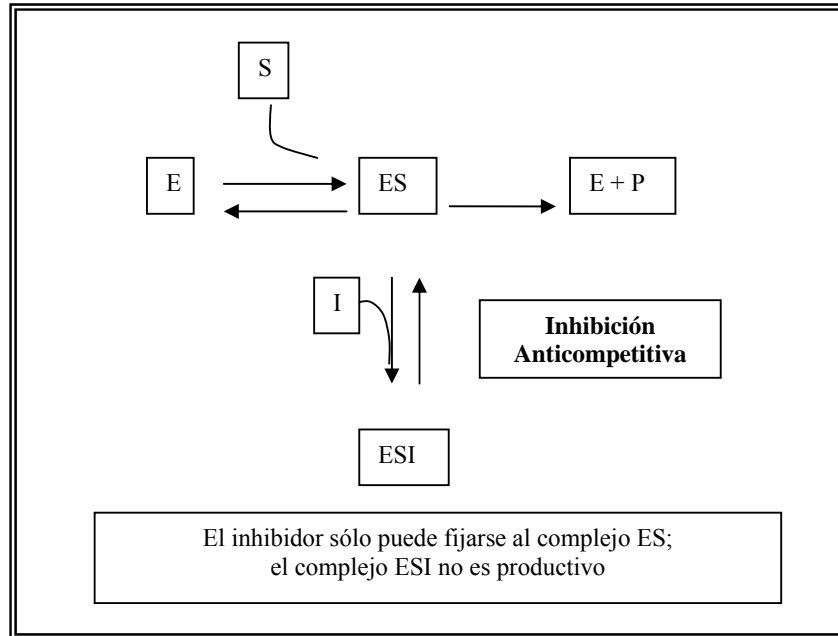
concentración de esta misma se revierte la inhibición. Ejemplos: Malonato y Oxalacetato. También se encuentran algunos antagonistas competitivos de distintas enzimas como las sulfas, las penicilinas, el metotrexate, el fluoruracilo, etc. La inhibición puede ser revertida al aumentar la concentración del sustrato en este tipo de inhibición



Los inhibidores no competitivos se combinan con la enzima libre o con el complejo enzima-sustrato (ES), la unión de ambos casos se realiza en un lugar diferente al sitio activo; en este tipo de inhibición no importa si aumenta la concentración del sustrato, de tal manera que no se revierte el efecto inhibitorio.



Los *inhibidores acompetitivos o anticompetitiva* se unen únicamente al complejo enzima-sustrato (ES) y forman un complejo inactivo enzima-sustrato-inhibidor, impidiendo la transformación ulterior del sustrato.



Cuando una vía metabólica es *inhibida reversiblemente*, permite concluir que el sustrato natural se acumulará en un periodo de tiempo determinado, revirtiendo la inhibición y a su vez el efecto farmacológico. Por tal motivo en el diseño racional de nuevos fármacos, se busca la obtención de inhibidores irreversibles, con lo cual la enzima continúe inactiva a pesar de la concentración del sustrato y a su vez no muestre una alta toxicidad. Con la anterior, se han diseñado los “antimetabolitos no clásicos”, donde no necesariamente tienen una estructura química similar al sustrato; sin embargo, se respeta la parte molecular que va a ocupar el sitio activo y a su vez en otra parte de la molécula pueda existir un grupo capaz de reaccionar covalentemente mediante grupos electrófilos, con los principales nucleófilos (R-SH, R-OH, R-NH₂) existentes intra o extra del sitio activo de la enzima. Estos medicamentos tienen la propiedad de incidir en el metabolismo celular, los *Inhibidores enzimáticos suicidas* (o inhibidores activados enzimáticamente) pertenecen a este grupo, ya que poseen complementariedad con el sitio activo de la enzima y a su vez son un pseudo-sustrato; es decir, el sustrato suicida se une al centro activo de manera específica al igual que el sustrato o los inhibidores competitivos, una vez unido al centro activo, la enzima transforma la molécula del inhibidor en una especie química muy reactiva que modifica covalentemente a la enzima, inactivándola. Por tanto tienen (a) la especificidad del inhibidor competitivo y (b) la potencia de los inhibidores irreversibles. ^[28]

I.5 ANTAGONISTAS Y AGONISTAS.

La perfecta unión entre un ligando y su receptor no puede garantizar que la respuesta farmacológica sea la deseada, ya que muchas moléculas muestran una capacidad diferente para iniciar una respuesta tras la formación del complejo fármaco-receptor, en base en esto los agentes farmacológicos se distinguen como: **agonistas**, agentes que se unen a su receptor y lo activa produciendo un efecto farmacológico, sea relajación, contracción, secreción o actividad enzimática; dentro de este grupo podemos encontrar a su vez a los *agonistas parciales*, los cuales no pueden producir una activación máxima de los receptores independientes de la concentración de ambos, debido a que presenta una eficacia menor a la de un agonista; *agonista inverso*, es el agente que al unirse al receptor lo protege de cambios conformacionales que impiden su activación por otro agonista y finalmente tenemos al **antagonista**, el cual atenúa el efecto de un agonista. Esta capacidad diferencial para traducir la respuesta es atribuible a cambios conformacionales en el receptor o a estados diferentes de asociación del receptor con complejos activos de proteínas. Por lo tanto, la definición de receptor debe incluir tanto sus propiedades únicas de reconocimiento como su función primaria para traducir la unión de ligandos dentro de la respuesta celular. [29]

I.6 SISTEMA NERVIOSO.

El sistema nervioso se divide en Sistema nervioso central (SNC) y Sistema nervioso periférico (SNP), el primero está formado por el Encéfalo y la Médula espinal, se encuentra protegido por tres membranas, las meninges. El segundo está formado por nervios, que recorren todo el cuerpo y por ganglios, éstos parten del encéfalo y de la médula; se diferencian en que son fibras aferentes y eferentes. **Los Nervios** son fibras formadas por varias redes de axones de las neuronas; conectan el sistema nervioso central con los efectores y con los órganos de los sentidos. **Los Ganglios** son grupos de cuerpos de neuronas que se encuentran fuera del sistema nervioso central. La acción integradora del sistema nervioso autónomo (SNA), es regulado por centros encefálicos (hipotálamo y tronco encefálico); así mismo, el SNP se encuentra dividido en Nervios sensitivos (craneales y espinales) y nervios motores (craneales y espinales), los de principal interés en este trabajo son los nervios motores espinales, en los cuales encontramos:

- **Motores somáticos** (*El Sistema Nervioso Somático*), formado por el conjunto de neuronas que regulan las funciones voluntarias o conscientes en el organismo; por lo

tanto, inervan los músculos esqueléticos. Estos nervios estimulan o no al músculo, pero no lo inhiben. Están relacionados con los estímulos ambientales.

- **Motores viscerales** (*El sistema nervioso autónomo*), formado por un conjunto de neuronas que regulan las funciones involuntarias o inconscientes en el organismo, por lo tanto controlan los músculos lisos, el cardíaco y las glándulas. Están formados por dos neuronas: una *preganglionar*; su pericarion está en el encéfalo o médula espinal y su axón (tipo B mielínica) sale del SNC como parte de los nervios craneales o raquídeos, y la *posganglionar*, segunda neurona fuera del SNC, ya que su pericarion y dendritas se localizan en un ganglio autónomo, donde forman sinapsis con una o más fibras preganglionares. Su axón es una fibra de tipo C amielínica. Véase Fig.8

Las motoneuronas somáticas sólo liberan ACh como neurotransmisor, mientras que las autónomas liberan ACh o noradrenalina. Cabe mencionar que las neuronas de ambos sistemas pueden llegar o salir de los mismos órganos si es que éstos tienen funciones voluntarias e involuntarias. A su vez el SNA se clasifica en ganglios simpáticos y ganglios parasimpáticos, sistemas que tienen funciones antagónicas. *El sistema Parasimpático* forma parte de la zona craneal y sacra. Aquí se establece la sinapsis entre las dos neuronas. Las fibras preganglionares del SNP establecen sinapsis con neuronas postganglionares en ganglios terminales, de esta forma se relaciona con la digestión, disminución de la frecuencia cardíaca, etc. *El sistema Simpático* (SNS) forma parte de la zona cervical, torácica y lumbar de la médula espinal. Es el sitio de sinapsis entre las neuronas simpáticas preganglionares y postganglionares, de esta forma se relaciona con las reacciones de lucha, aumento de la frecuencia cardíaca, etc.

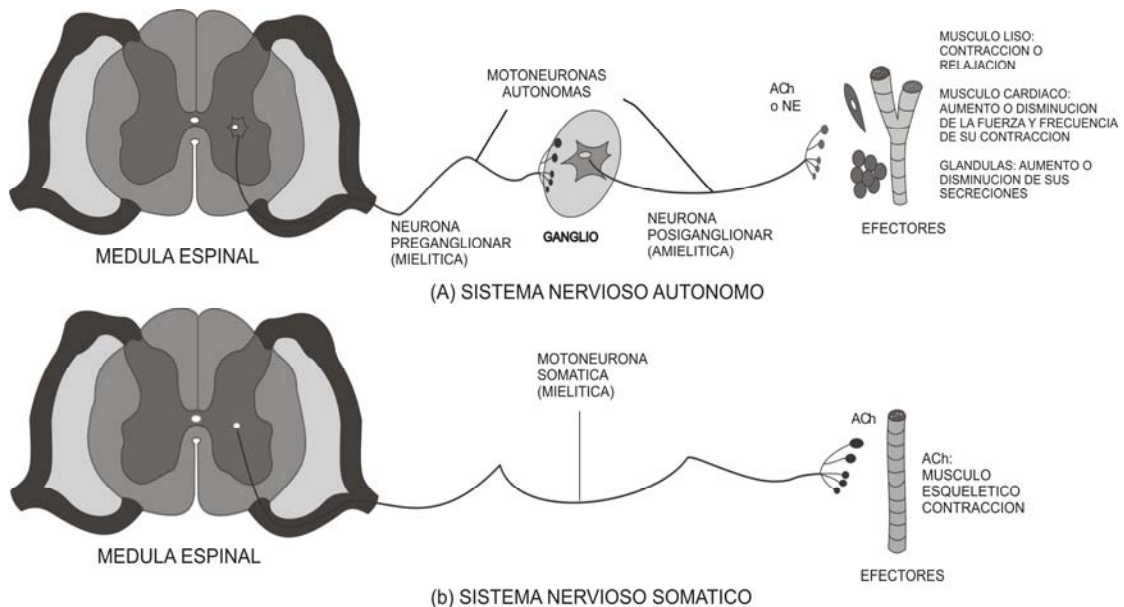
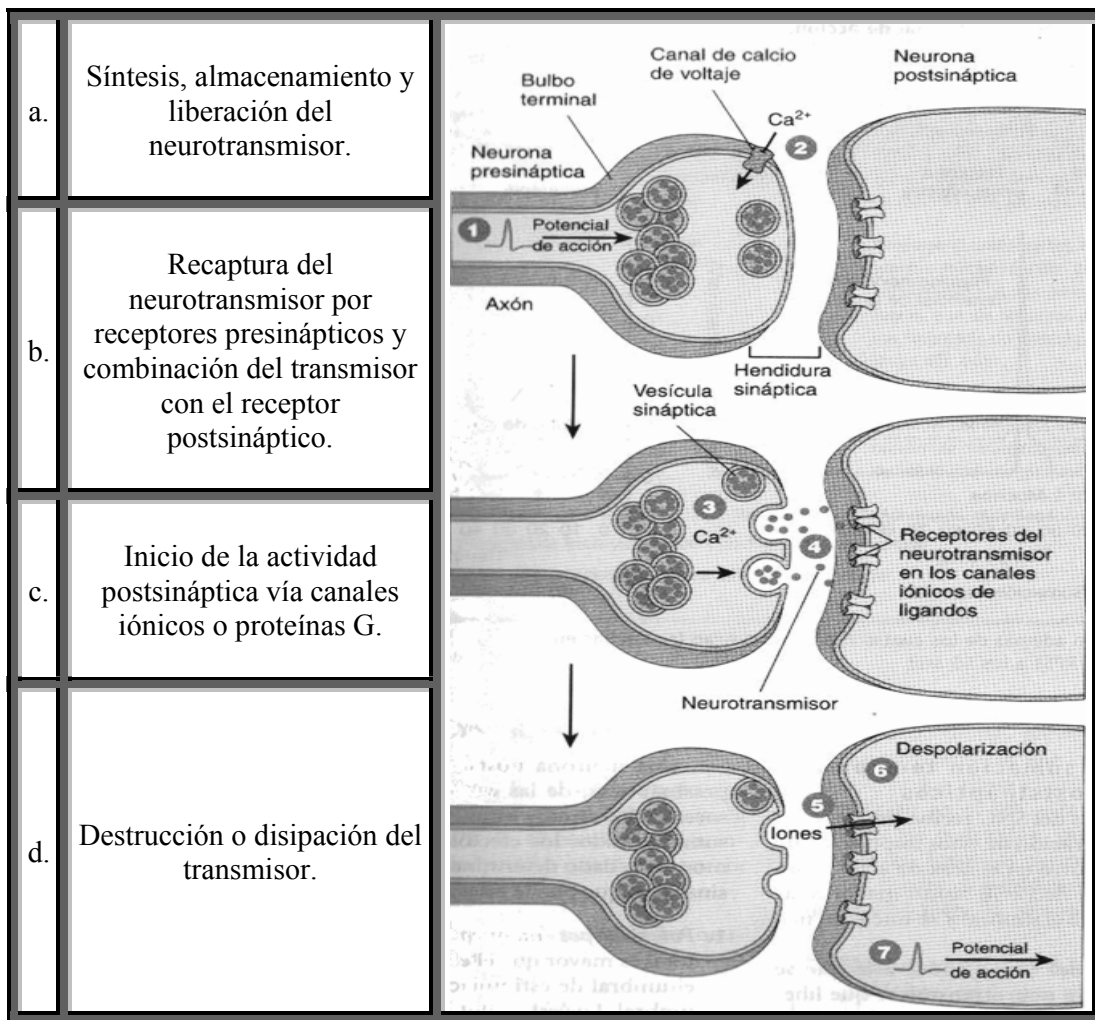


Figura 8: División del SNP.

II. ANTECEDENTES

2.1 NEUROTRANSMISIÓN COLINÉRGICA

Los neurotransmisores son liberados por impulsos nerviosos. La ACh es el neurotransmisor de todas las fibras parasimpáticas posganglionares; algunas simpáticas posganglionares, de los nervios motores del músculo estriado y dentro del sistema nervioso central (SNC) de las células piramidales de la corteza motora, ganglios basales y proyecciones del hipocampo al neocórtex. Desde el punto de vista general, la neurotransmisión se da en 2 pasos: *Conducción*; el impulso nervioso pasa a través del axón, y la *Transmisión*; que a su vez se subdivide en:^[30]



Lo anterior cobra importancia debido a la acción farmacológica relacionada con cada etapa individual del proceso general.

2.2 ACETILCOLINA (ACh)

Es una molécula de bajo peso molecular, Véase Fig.9 la cual se sintetiza en formación reticular del tallo cerebral, y se libera en neuronas del Sistema Nervioso Periférico (SNP) y algunas en el Sistema Nervioso Central (SNC). Es un neurotransmisor excitatorio en sinapsis como la unión neuromuscular; en donde actúa directamente para abrir canales de cationes de ligandos y es un neurotransmisor inhibitorio donde sus efectos en los canales iónicos ocurren indirectamente mediante receptores relacionados con la proteína G (por ejemplo: las neuronas parasimpáticas del nervio vago “X” que inervan el corazón, la ACh desacelera la frecuencia cardiaca a través de esta misma).^[31]

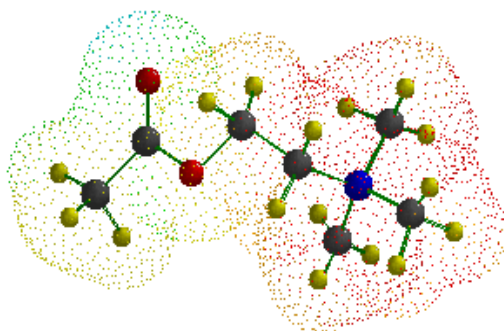
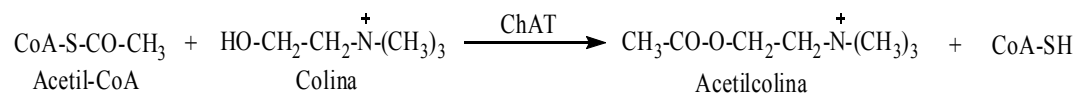


Figura 9: Electrodensidad de la ACh

Los estudios de la ACh iniciaron en EE.UU. por Hunt (1900-1906) y en Gran Bretaña por Dale en 1906-1914. Este último científico compartió el premio Nobel de Psicología y Medicina con el farmacólogo Germano Otto Loewi en 1914, quienes sintetizaron y descubrieron la transmisión química de los impulsos nerviosos. Seguido de este periodo, Bernard Katz (1911-2003) descubrió que el neurotransmisor ACh se localiza en las terminaciones nerviosas en forma de pequeños paquetes o cuantos, cada paquete se convierte en una muy breve señal, la cual ejerce su acción en el tejido blanco (fibra muscular).^[32] De esta forma la ACh es sintetizada en las neuronas presinápticas por la unión de Colina, recaptada por un transportador activo dependiente de Na⁺, más acetilCoA proveniente de la mitocondria por acción de la Acetilcolintransferasa (ChAT¹).



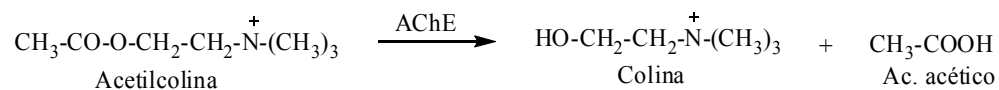
¹ Del inglés, Acetilcholintransferase.

En el humano se han encontrado 2 isoformas de ChAT Véase **Fig.10** codificadas por un solo gen, aunque entre ellas no se han establecido diferencias en cuanto a función fisiológica o mecanismos de regulación y difieren por 118 residuos en el extremo amino terminal. Se ha observado que la ChAT 82 kDa se encuentra en el núcleo, mientras que la ChAT 69 kDa, se ubica en el citoplasma. ^[33 y 34]



Figura 10: ChAT 82 kDa

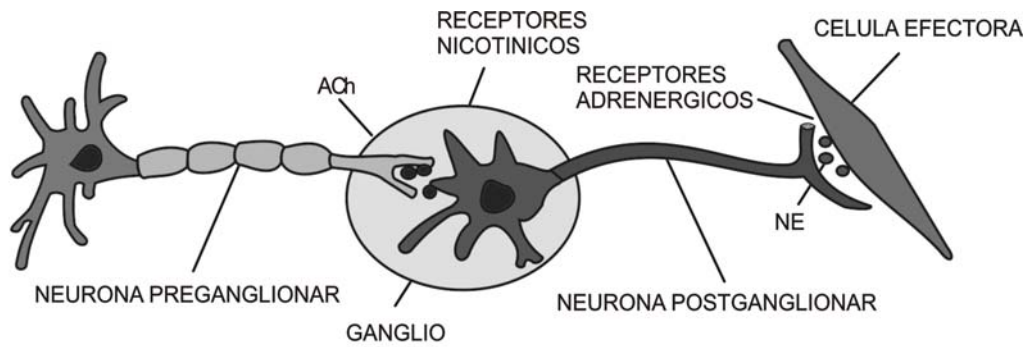
La ACh que es sintetizada, sobre todo en el citoplasma neuronal, es captada y almacenada en las vesículas que se hallan concentradas en las terminaciones nerviosas como ya se indicó. La liberación de esta, es desencadenada por la despolarización de las terminaciones nerviosas. La despolarización permite el ingreso de calcio que es necesario para que se produzca el proceso de liberación. La vesícula de almacenamiento se fusiona con la membrana neural y la ACh es liberada por el proceso de exocitosis. La ACh secretada difunde con rapidez a través de la hendidura sináptica hacia receptores ya sea nicotínicos o muscarínicos; esto a su vez, despolariza la membrana postsináptica y se genera un potencia de acción en la mayoría de las veces. Cuando el canal se cierra, la ACh debe ser destruida inmediatamente para evitar una estimulación continua sobre la fibra nerviosa postsináptica.. La inactivación de la ACh corresponde a la Acetilcolinesterasa (AChE), hidrolizándola en Ácido acético y Colina. ^[35]



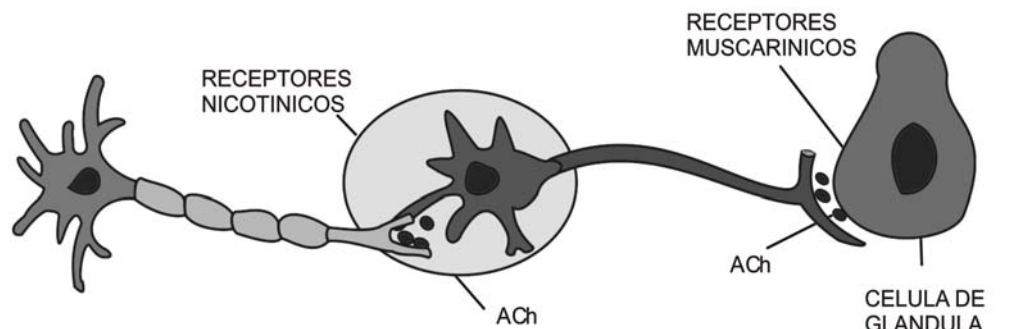
2.2.1 RECEPTORES DE ACETILCOLINA

Una vez en el espacio sináptico a ACh se une a 2 tipos de receptores: *muscarínicos* (M), por ser activados por la muscarina o *nicotínicos* (N), activados por nicotina. Estos a su vez difieren en localización, mecanismo de señalización y en la respuesta fisiológica o farmacológica que desencadenan.

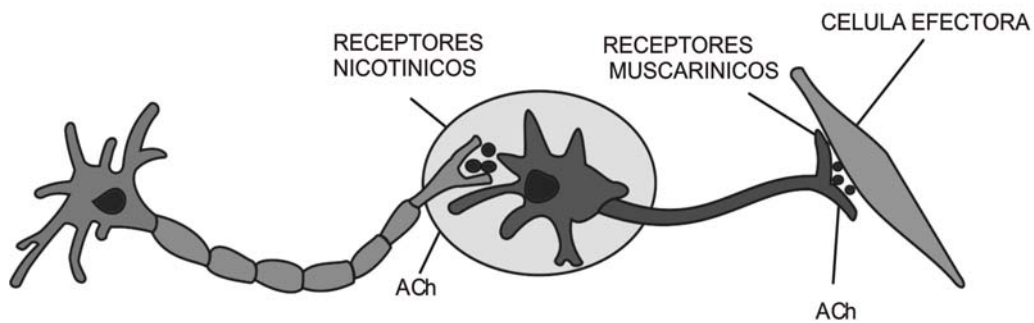
Schemiedeberg (1869) demostró que la muscarina estimula las terminaciones del nervio vago, Dixon (1907) trabajó con el corazón de una rana y observó que la excitación del nervio vago inducía la liberación local de un mediador químico; conocido como colina, sustancia presente en varios tejidos del organismo, el cual tienen una acción similar a la muscarina, pero de manera mucho más débil. Incluso el acetyl ester de colina (ACh) que tiene igual acción muscarínica es mucho más potente que la colina. Hunt (1900-6) encontró que la acetilcolina actúa como depresor en extractos suprarrenales. En el mismo año, Dale (1906-14) la identificó como una sustancia depresora presente en el extracto de cornezuelo, encontrando que las respuestas a la ACh imitaban todos los efectos de la estimulación del nervio parasimpático. Esta acción de la ACh es llamada muscarínica o parasintomimético. En cuanto a la organización del sistema nervioso colinérgico, la subtipificación de los receptores en este sistema se basó inicialmente en la actividad farmacológica de dos alcaloides: nicotina y muscarina. Esta clasificación se dio mucho antes de la determinación de las estructuras de estos antagonistas que se dan de forma natural. Las actividades diferentes de los antagonistas atropina en los receptores muscarínicos y *d*-tubocurarina en los receptores nicotínicos apoyaron el argumento de que existen múltiples clases de receptores para la ACh. Es así como se conoce que la ACh interactúa con dos tipos de receptor: el sitio nicotínico de las uniones neuromusculares y de los ganglios autónomos y el sitio muscarínico de los efectores parasimpáticos en el músculo liso y las glándulas. La ACh interactúa en estos sitios debido a la flexibilidad conformacional de su molécula, propiedad que no tienen la nicotina, ni la muscarina. Véase Fig. 11 y 12 Los derivados de la ACh que contienen sistemas de anillos (como la nicotina y la muscarina), y que además son estructuras mucho más rígidas, dan inferencias despreciables respecto a cuáles son los átomos y las distancias críticas para una acción farmacológica dada.^[36-38]



(a) SISTEMA NERVIOSO SIMPATICO: INERVACION DE CASI TODOS LOS EFECTORES



(b) SISTEMA NERVIOSO SIMPATICO: INERVACION DE LA MAYORIA DE LAS GLÁNDULAS SUDORÍPARAS



© SISTEMA NERVIOSO PARASIMPATICO

Figura 11: Localización y tipo de inervación de los receptores nicotínicos y muscarínicos.

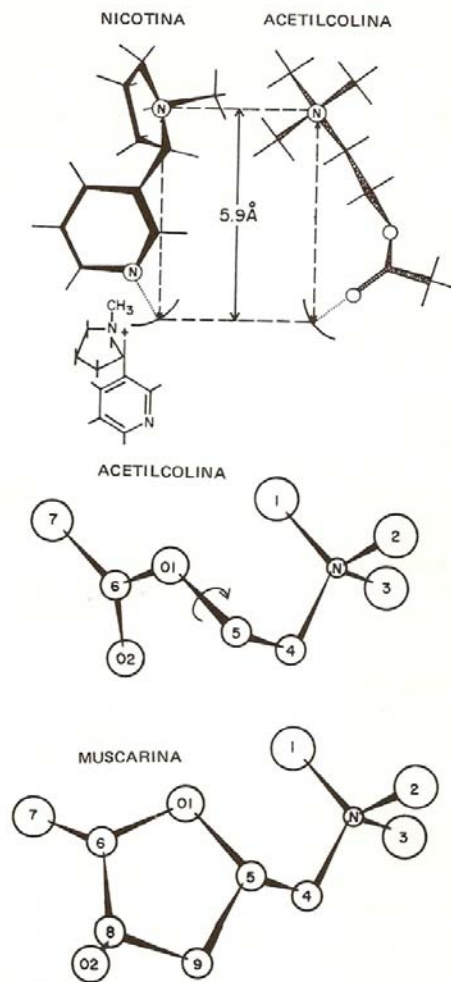
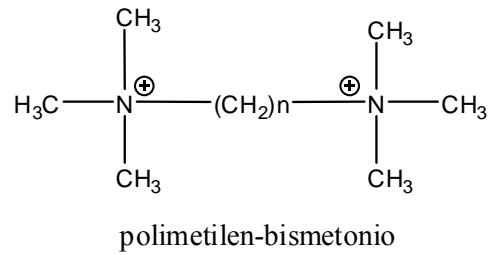


Figura 12: Estructuras moleculares de la ACh, Nicotina y Muscarina.

La estructura de los agentes bloqueadores de la nicotina tiene un patrón estructural común a la nicotina y acetilcolina respectivamente. En las estructuras encontramos un centro catiónico a la distancia de 5.9 Å al sitio nucleofílico, que actúan como aceptor del puente de hidrógeno; en la ACh y sus congéneres es el oxígeno del carbonilo y en la nicotina es el nitrógeno de la piridina. En la serie muscarínica el átomo de oxígeno a 4.4 Å del centro de carga positiva es el aceptor del puente de hidrógeno. Por lo tanto en la ACh es el oxígeno del éster y en la muscarina el oxígeno del anillo, además el metilo del anillo muscarínico refuerza esta interacción. Un ejemplo de fármacos antagonistas de ACh que tienen flexibilidad conformacional son la serie de polimetilen-bismetonio.^[39]



Estas moléculas simétricas, tienen dos grupos catiónicos separados por una cadena alifática simple, el número de átomos de la cadena es variable; por lo tanto la potencia de los efectos biológicos como bloqueo ganglionar y neuromuscular son variables.

Como ya se mencionó la ACh al ser liberada en las terminales de los nervios colinérgicos, e interactuar con los receptores de la membrana postsináptica, ocasiona el movimiento del Na^+ al interior de la célula y de K^+ hacia el exterior de esta. El resultado es una despolarización que si excede el valor del umbral, lleva a una despolarización propagada en el elemento postsináptico (otra célula nerviosa, una célula muscular o un electroplax de las anguilas eléctricas y rayas). Como ya se indicó, los receptores de ACh son los nicotínicos; los cuales pueden ser bloqueados por la tubocurarina (antagonista reversible), y los muscarínicos; pueden ser bloqueados por la atropina. Véase Fig.13 Este tipo de antagonismo dirigido hacia el receptor no afecta a la AChE, ya que los antagonistas y agonistas colinérgicos son cationes, los cuales se espera que interactúen con residuos aniónicos en las macromoléculas. [40, 41]

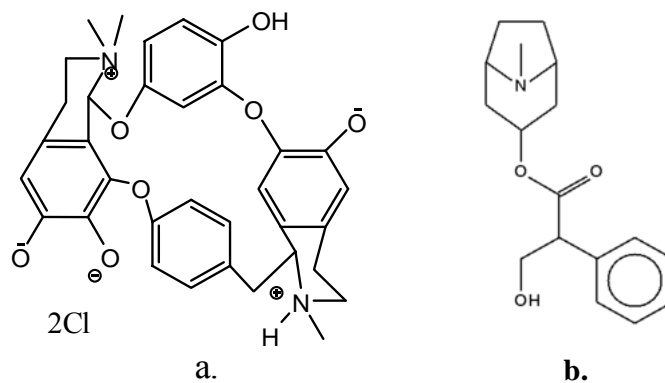
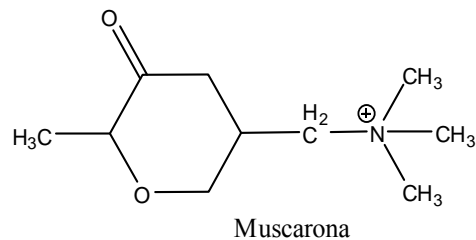


Figura 13: Antagonistas: a. nicotínicos (tubocurarina) y b. muscarínicos (atropina).

En trabajos posteriores, se han aislado y estudiado a los receptores colinérgicos de los órganos eléctricos (raya eléctrica: *Torpedo*), debido a su alto contenido de células electroplax (célula muscular modificada); para esto usaron antagonistas y agonistas con relación estructural a la ACh. Para los agonistas usaron la muscarona:



Este agonista interactúa específicamente con los sitios nicotínicos y no puede ser degradada por la AChE, pero sí por la tripsina, fosfolipasa C y la quimiotripsina, por lo tanto se sugirió que el receptor puede ser una fosfolipoproteína. En muchas investigaciones se prefiere trabajar con la anguila eléctrica *Electroforus* para estudiar a los receptores de ACh, debido a que cada una de las células electroplax son lo suficientemente grandes para poder registrar sus potenciales de membrana en un microelectrodo. El electroplax está innervado aproximadamente por 5×10^4 terminales colinérgicas, dando lugar aproximadamente a 10^9 - 10^{10} contactos sinápticos. La proteína receptora está presente en cantidad de 10-20 μg /g de tejido fresco aproximadamente.^[42-44]

Los *agentes anticolinesterasa* son un grupo de inhibidores de muy amplia aplicación, producen acumulación de Acetilcolina (ACh) en la hendidura sináptica y placa motora al frenar a la acetilcolinesterasa (AChE), enzima responsable de hidrolizar a la ACh. Durante la Guerra química se usaron insecticidas, como gases neurotóxicos, de acción inhibitoria irreversible de la AChE. En la actualidad se usan como agentes terapéuticos en Glaucoma, Miastenia grave (deficiencia congénita de la ACh) y recientemente en el tratamiento paliativo (*mejora los síntomas pero no proporciona la cura de tal enfermedad*) de la enfermedad de Alzheimer.^[45, 46]

2.2.1.1 RECEPTORES NICOTÍNICOS.

Los receptores nicotínicos (GMPc); cuya secuencia aminoacídica fue la primera en determinarse por Noda, se localizan en los ganglios autónomos parasimpáticos, simpáticos y en la placa terminal de los músculos esqueléticos inervados por los nervios motores. El receptor es una glucoproteína de membrana integral de peso molecular de aproximadamente 250 KDa, compuesta por 4 subunidades diferentes, denominadas α , β , γ y δ , con una relación de 2:1:1:1. El receptor está insertado en la membrana y se proyecta tanto al espacio extracelular así como al medio intracelular. Las unidades α contienen los sitios de unión con la ACh. Los receptores nicotínicos tienen una distribución pentamérica, Véase Fig.14 por lo que pueden estar formados por uno o más tipos de subunidades; aunque en el músculo solo existe un solo tipo de subunidad α_1 , en el SNC se encuentran por lo menos 8 diferentes (α_2 - α_9) y tres del tipo β (β_2 - β_4), aunque no todas las combinaciones de α y β producen receptores funcionales, el número de permutaciones funcionales posibles es suficiente para impedir una clasificación farmacológica de todos los subtipos.

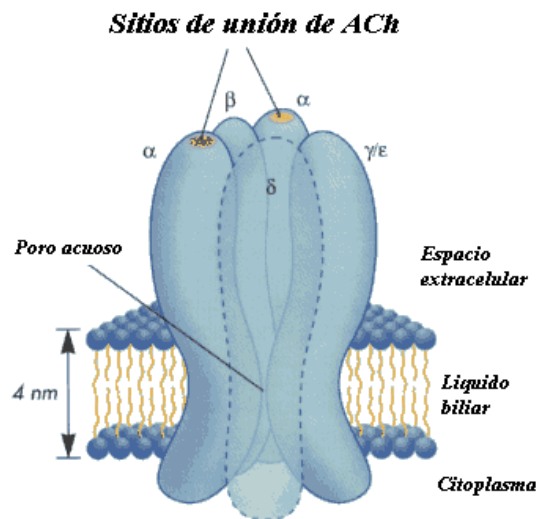


Figura 14: Distribución pentamérica de los receptores nicotínicos.

Los receptores nicotínicos pueden dividirse en subtipos de baja, alta y superalta afinidad. Sean N_N o N_M los receptores son canales iónicos activados por ligando, los cuales al abrirse permiten el paso de iones Na^+ o Ca^{2+} para producir un potencial postsináptico excitador (PPSE) o un potencial de placa terminal (PPT).^[47- 49] Véase **Tabla 2**

Tabla 2
LOCALIZACIÓN, EFECTOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS
RECEPTORES NICOTÍNICOS.

Receptor	Localización	Efecto	Mecanismo de acción
N _M	Placa Motora	Contracción muscular	Apertura de canales de Na ⁺ o Ca ²⁺
N _N	Ganglios vegetativos Médula suprarrenal SNC	Despolarización Secreción de catecolaminas Neuroprotección (α ₂ β ₂) Memoria	Apertura de canal de Na ⁺ o Ca ²⁺
	Presinápticos	Favorecen la liberación de ACh	

2.2.1.2 RECEPTORES MUSCARÍNICOS.

La muscarina, es una molécula activa del hongo *Amanita muscarina*, cuyo efecto es similar al esperado debido a la estimulación de los nervios parasimpáticos postganglionares. Estos receptores de la ACh se encuentran localizados en una gran proporción en el músculo liso del tubo digestivo y las vías urinarias, los bronquios, el iris, el músculo cardíaco y algunas glándulas exocrinas inervados por nervios colinérgicos postganglionares. Se han descubierto y clonado cinco subtipos (M₁, M₂, M₃, M₄, M₅) de receptores muscarínicos, los cuales han sido identificados en el cerebro humano:

- A. **M₁**: Se ubican principalmente en elementos postsinápticos localizados en tejido nervioso, se encuentran ligados al sistema intracelular fosfoinositol, la cual esta acoplada a la proteína Gq, que a su vez activa a la enzima fosfolipasa C(PLC); receptor primario. Consecuentemente induce la utilización del Dialciliglicerol (DGA) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) como segundos mensajeros. Estos dos a la par movilizan al Ca²⁺⁺ desde las reservas internas y Proteína cinasa C (PKC) respectivamente.
- B. **M₂**: Son los receptores más ampliamente distribuidos y se ubican en terminales axónicas presinápticas en tejido cardíaco. Por su localización usa el sistema del adenosín monofosfato cíclico, acoplado a la proteína G_i, la cual inhibe la adenilil ciclase y evita la formación del AMPc.
- C. **M₃ y M₅**: Se localizan en músculo liso. El M₃ también usa el sistema del adenosín monofosfato cíclico. El M₅ se desconoce su función fisiológica.

- D. **M₄**: Se localizan en el páncreas, músculo liso, en la corteza y el hipocampo. Este sistema también usa el sistema del adenosín monofosfato cíclico. Véase **Tabla 3**.

Cada subunidad funcional consiste en cuatro dominios helicoidales transmembranales (M1 A M4), los cuales forman la pared del canal iónico. Este canal iónico se abre por el cambio de conformación alostérica ocasionada por la unión con la ACh; así mismo, también es permeable al sodio y potasio. ^[50- 52]

Tabla 3
LOCALIZACIÓN, EFECTOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS
RECEPTORES MUSCARÍNICOS.

Receptor	Localización	Efecto	Mecanismo de acción
M ₁	Ganglios autónomos Estómago Presinápticos SNC	Despolarización Secresión de HCl Favorecen la liberac ión de ACh No definido	Formación de IP ₃ y DAG aumentando el Ca ²⁺ citosólico.
M ₂	Corazón SNC	Cronotrópico, inotrópico y dromotrópico negativo.	Inhibición de la adenilil ciclase y activación indirecta de canales de K ⁺
M ₃	Músculo liso Glándulas SNC	Contracción Secreción No definido	Semejante a M ₂
M ₄	Gsnглиos vegetativos Páncreas Endotelio Útero SNC	Vasodilatación Secreción	Semejante a M ₂
M ₅	SNC	No definido	Semejante a M ₁

2.2.2 ACETILCOLINESTERASA

En la actualidad las líneas de investigación encaminadas a la obtención de nuevos fármacos toman como fundamento la teoría que explican que existen compuestos que poseen en su molécula grupos similares al sustrato natural, lo cual les permite tener afinidad por los receptores, y si cuentan además con un grupo funcional capaz de reaccionar covalentemente, éstos se unen permanentemente al receptor. En este sentido, se han logrado grandes éxitos en la síntesis de inhibidores enzimáticos con aplicación terapéutica, debido a que más del 50% de los fármacos actúan en sitios activos de la enzima. ^[53, 54]

Sir Henry Dale (1914) descubrió que la enzima que degradaba los ésteres de colina (Ch), era esencial en la neurotransmisión en el sistema nervioso motor somático y autónomo; así mismo, la llamó AChE, la cual era blanco de acción de la fisostigmina (eserina), con el objetivo de aumentar la vida media de la acetilcolina; ya sea de los receptores muscarínicos o nicotínicos. Por lo tanto, en los siguientes 75 años los agentes inhibidores de AChE han sido usados como agentes con fines bélicos, y recientemente como agentes terapéuticos e insecticidas. La familia de las colinesterasas (ChEs) se subclasifican en acetilcolinesterasa (AChE) y en butirilcolinesterasa (BuChE), lo cual toman como base la especificidad de hidrólisis para la ACh o la butirilcolina (BuCh), respectivamente. Varios inhibidores han mostrado también ser selectivos para una enzima u otra. La AChE está asociada primariamente con los sistemas nerviosos y musculoesquelético, típicamente localizada en las uniones sinápticas, sin embargo también se localiza en plasma y eritrocitos, donde no se conoce su función, aunque es probable que hidrolice ésteres exógenos como lo hace la BuChE. La BuChE es sintetizada en el hígado y opera principalmente en el plasma. ^[55, 56]

Las formas homoméricas se encuentran como especies solubles en la célula, destinadas posiblemente a la exportación, o relacionadas con la forma exterior de la célula por medio de una secuencia intrínseca de aminoácidos hidrófobos o a un glicofosfolípido. La AChE es un polipéptido de 575 residuos con un peso molecular calculado de 6.56×10^4 Da, se encuentra entre las enzimas más eficientes, tienen habilidad para hidrolizar 6×10^5 moléculas de ACh por molécula de enzima por minuto, dando como resultado un tiempo de recambio de 150 μ s. Así mismo, es una enzima alostérica, del cual se sabe poco de su modulación por alosterismo, su estructura primaria completa fue deducida de un cDNA obtenido de *Torpedo californica*. ^[57]

Véase Fig.15 El establecimiento de la secuencia de aminoácidos y la clonación molecular mostraron que solo un gen codifica a las AChEs de los vertebrados. Sin embargo, se encuentran múltiples productos génicos que difieren sólo en sus terminaciones carboxilo y manifiestan especificidades idénticas hacia los inhibidores.

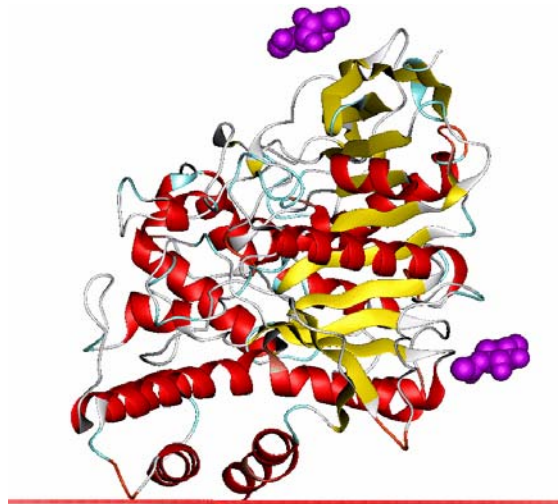


Figura 15: Acetilcolinesterasa; especie *Torpedo californica*. Tomada del OPM (*Orientations of database proteins in membranes*).

La AChE existe en diferentes formas cuaternarias clasificadas como asimétricas (A4, A8 y A12) y como globulares (monómeros: G1, dímeros: G2, tetrámeros: G4). Estas últimas a su vez se clasifican como formas G4 anfifílicas y G1 hidrofílicas dependiendo de sus propiedades hidrodinámicas que a su vez difieren de las diferentes subunidades que las forman. En el SNC se encuentran principalmente las isoformas G1 y G4; sin embargo, en la EA se incrementa la G1.

Existen dos clases generales de formas moleculares: oligómeros simples de subunidades catalíticas (monómeros, dímeros y tetrámeros) y asociaciones heteroméricas de subunidades catalíticas con subunidades no catalíticas, un ejemplo son las subunidades relacionadas con lípido o con una subunidad tipo colágena. Las especies que contienen estructuras tipo colágena consisten en tetrámeros de subunidades catalíticas, cada una de las cuales está unida por puentes disulfuro a cada una de tres bandas de la subunidad estructural del tipo colágena. Esta especie molecular, cuya masa molecular se aproxima a 10^6 Da es abundante en la áreas de unión del músculo estriado. Otra forma heteróloga es un tetrámero de subunidades catalíticas unidas por enlace disulfuro a una subunidad de 2×10^4 Da y enlazada a lípidos, al igual que la forma glucosfolipídica, ambas son proteínas de membrana.

La estructura tridimensional de la AChE deducida por difracción de rayos X, muestra un centro activo que es casi centrosimétrico en relación con cada subunidad, y que reside en la base de una garganta estrecha de cerca de 20\AA de profundidad.

En la base de la garganta se encuentran los residuos de la tríada catalítica: *Ser200*, *His440* y *Glu327*. Durante la hidrólisis enzimática sobre el éster, se forma un intermediario tetrahédrico entre la enzima y el sustrato, que entra en colapso hasta un conjugado enzimático acetilado con liberación concomitante de colina. El grupo acetilo es sensible al agua, y se genera acetato y enzima activa.^[58, 59] Véase Fig.16

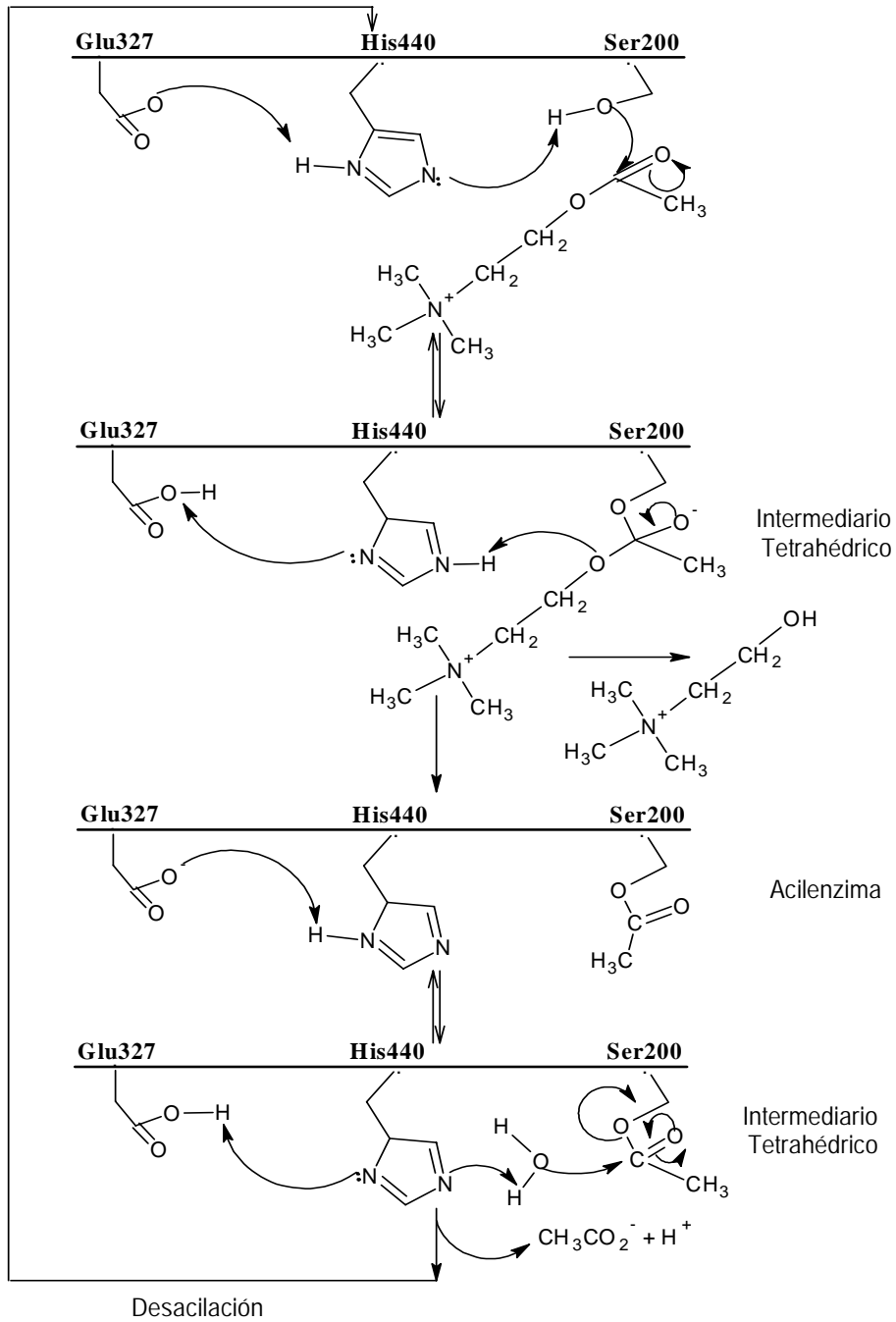


Figura 16: Mecanismo catalítico en el centro activo de la AChE.

Glu =Glutamato; His =histidina; Ser= serina.

El mecanismo catalítico es similar al de otras hidrolasas, en las cuales el grupo hidroxilo de la serina es buen nucleofílico, por medio de un sistema de relevo de carga que abarca al grupo carboxilglutamato, al imidazol de la histidina y al hidroxilo de la serina. En la actualidad se sabe que el sitio activo contiene por lo menos 5 sitios mayores de unión: a) un hueco oxaniónico (*OH*), Gli118-Gli119-Ala201, ubicado en la entrada de la garganta y que se encarga de dar estabilidad al intermediario tetrahédrico, que es liberado después de ser catalizada la hidrólisis de ACh; b) Un sitio esteárico (*SE*), que está comprendido por la triada catalítica Ser200-His440-Glu327, c) Un sitio aniónico (*sitio activo*) de unión del sustrato (*SA*), Trp84-Glu122-Phe201, que contiene un pequeño número de cargas negativas pero muchos residuos aromáticos, los cuales hacen que la entrada de la garganta sea hidrofóbica; tiene un radio aproximado de 4.5 a 7 Å, y posee la capacidad de abrirse y cerrarse permitiendo la entrada selectiva de moléculas (ACh e inhibidores), Véase Fig.17 se sabe que se encuentra a unos 7 Å de la base de la garganta la Phe-230 la cual tiene una interacción π -catión con el nitrógeno cuaternario de ACh, el edrofonio, el E2020 y tal vez de la tacrina; d) un sitio activo selectivo para unión de grupos aromáticos (*SASA*) ubicado cerca del sitio aniónico y esterático de la base de la garganta; sin embargo, aún no se conocen los residuos que lo integran, y que es importante para la unión de sustratos arilos y de otros ligandos aromáticos por interacciones π - π ; y e) un sitio de unión (*sitio activo*) de grupos acilo (*SUA*), Phe228 y Phe229, que se unen al grupo acilo de la ACh. Véase Fig.18 Junto a los cinco sitios activos, la enzima tiene un sitio aniónico periférico (*SAP*), Trp279-Tyr70-Tyr121-Asp72-Glu199-Phe290, localizado en el labio de la garganta y al que pueden unirse 9-aminoacridina, 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina (tacrina); particularmente el Trp279, está a una distancia mayor de 20Å del sitio. Un dato importante, desde el punto de vista estructural de la garganta, es la existencia de la His-287 en el labio de la misma, que por previas investigaciones, ha sido sustituido por cisteína en un proceso de mutagénesis, para determinar la importancia de este aminoácido en la actividad catalítica de la AChE. Se sabe que la His-287 juega un papel importante en la selección del sustrato (ACh y butirilcolina), e incluso, es el regulador de la entrada a la garganta tanto de sustratos como de los inhibidores que actúan en la base de ésta. Probablemente la His-287 sea el aminoácido que le confiere la capacidad de apertura y cierre a la garganta, así como también es probable que existan inhibidores que actúen a este nivel.

Existen ensayos que han evidenciado que el SAP está involucrado en el fenómeno de inhibición y activación de sustrato a través de la unión de un segundo sustrato. Esta función también puede involucrar modificación alostérica del sitio activo y con ello alteración del paso del sustrato y productos por bloqueo al acceso a la maquinaria catalítica. Recientes estudios *in vitro* han sugerido que además de su función catalítica, el SAP tiene un importante papel no catalítico al facilitar la formación de la proteína β -amiloide (PBA) [60-62]

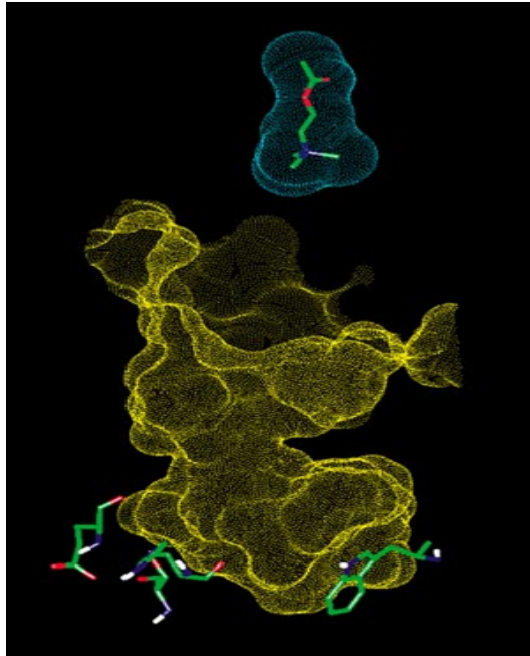


Figura 17: Representación de la aproximación de ACh a la garganta de la AChE

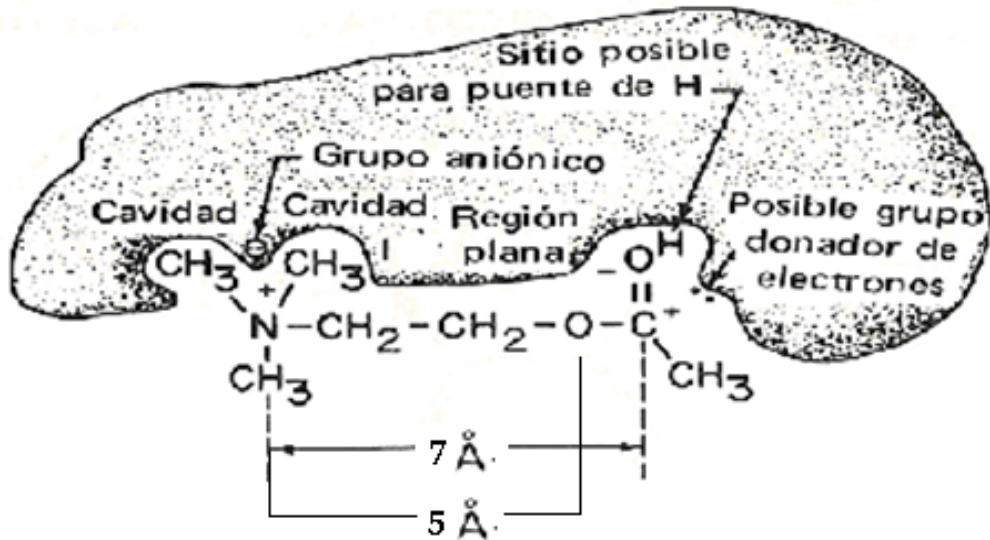


Figura 18: Interacción entre la ACh y la AChE

2.2.3 BUTIRILCOLINESTERASA (BChE).

La BChE es una enzima con una semejanza de 60% con la AChE, conservando el sitio activo, ubicado en la garganta de 20 Å de profundidad como existe en la AChE; sin embargo, en este sitio de la AChE los aminoácidos Phe-295 y Phe-297 cambian por Val y Leu en la BChE. El papel fisiológico de la BChE no es claro, se sabe que hidroliza ésteres exógenos (cocaína), ACh y su sustrato, butirilcolina. Se han demostrado que en los pacientes con enfermedad de alzheimer (EA), la BChE está incrementada en actividad y cantidad, lo que favorece la disminución de ACh en el espacio sináptico. Por lo que una propuesta terapéutica, no es sólo inhibir a la AChE, sino también a la BChE y esto no es difícil de lograr dada la alta semejanza estructural y funcional entre estas dos enzimas, particularmente en el sitio catalítico. [63, 64]

Normalmente la BChE en el SNC efectúa el 20% de la hidrólisis total de ACh, pero existen estudios que demuestran que en pacientes con EA, se puede incrementar hasta 40%. Es por eso que las nuevas tendencias en la investigación sobre la EA es la búsqueda de fármacos inhibidores de BChE, que también inhiben a la AChE como: tacrina, rivastigmina. Sin embargo hay inhibidores selectivos sobre la BChE como: cymserina y MF-8622. Lo anterior tiene la ventaja de que se podrían generar fármacos con mínimos efectos adversos dado que la BChE aún no tiene una función fisiológica definida. [65, 66]

Actualmente se cuenta con fármacos inhibidores de ambas enzimas, pero, la terapéutica sigue siendo paliativa ya que sólo se mejora la calidad de vida del paciente con EA o se retarda la incidencia de la enfermedad. Lo ideal sería prevenir el daño neuronal y en el último de los casos restituir la función neuronal perdida. La terapéutica más promisorio es diseñar fármacos que frenen el autoensamblaje proteico, inhibiendo así la producción de β -amiloide o inhibir a los genes que expresan tales proteínas. Sin embargo, se requiere de fármacos con características fisicoquímicas especiales. El síndrome de demencia por la disfunción colinérgica central es el hecho más aceptado en la EA, aún cuando existen investigaciones que no han podido establecer una correlación totalmente confiable entre la severidad clínica de la demencia y magnitud del déficit colinérgico. Como ya se ha mencionado, existen varios sistemas implicados en la patogénia y fisiopatología de la EA, sin embargo, el más estudiado es el colinérgico. En esta sección se revisarán brevemente y esquemáticamente las principales características de la neurotransmisión colinérgica, lo que nos ayudará a entender las aproximaciones terapéuticas que se han propuesto para tratar de incrementar la neurotransmisión colinérgica que en la EA está disminuida. [67, 68]

2.2.4 SEMEJANZA ENTRE LAS COLINESTERASAS.

Los fármacos que mejoran la función colinérgica, como es el caso de los inhibidores de acetilcolinesterasa tienen una gran semejanza estructural. Recientemente ha surgido la inquietud de usar inhibidores de butirilcolinesterasa considerando que es una enzima que incrementa en los pacientes con EA y que además no tiene funciones fisiológicas importantes. La AChE predomina en el sistema nervioso central (SNC), placa neuromuscular y en eritrocitos, mientras que la BChE es más abundante en suero, pero también se encuentra en el SNC, su función no es clara, aunque, cabe señalar que la enzima está incrementada en el SNC de los pacientes con EA, lo cual explica el éxito que tienen los inhibidores de BChE. Lo anterior ha motivado a diseñar fármacos que puedan inhibir a ambas ChEs y con esto evitar el uso de múltiples fármacos.

Como se mencionó anteriormente, en la base de la misma se encuentra la triada catalítica (Ser-200, His-440 y Glu-327), un sitio aniónico (Trp-84, Glu-122 y Phe-201) y otro que une a grupos acetilo (Phe-228 y Phe-229). En el labio de la garganta existe el sitio aniónico periférico (Trp-279, Tyr-70, Tyr-121, Asp-72, Glu-199 y Phe-290). Se sabe que también existe un sitio activo que une a ligandos aromáticos, ubicado cerca del sitio aniónico y esterático de la base de la garganta. La lista de inhibidores de las ChEs es amplia, sin embargo no son muy potentes (\cong μ M), son caros y además tienen alto grado de toxicidad.^[94-96] Entre la AChE y la BChE existe una gran semejanza tanto estructural como funcional. Sin embargo, la AChE es selectiva para la ACh mientras que la BChE tiene como sustratos la ACh, la butirilcolina entre otros. Una diferencia estructural entre las dos ChEs en la garganta, es que la AChE tiene Phe-295 y Phe-297 mientras que la BChE Val-290 y Leu-288. Estos últimos aminoácidos, además de incrementar la hidrofiliidad y disminuir la densidad electrónica en la BChE, permiten que exista un mayor espacio dentro de la base de la garganta; factor que puede estar implicado en el reconocimiento de sustratos y ligandos de mayor tamaño.^[69-71]

2.3 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

2.3.1 ANTECEDENTES.

Alois Alzheimer en 1906 descubrió la enfermedad de Alzheimer (EA) a través de estudios histopatológicos (estudios de los tejidos), La prevalencia de la enfermedad de Alzheimer aumenta con la edad, 5 a 10% entre los 60 y 65 años, 40 a 45% entre 85 y 90 años. En Europa la demencia presenta una incidencia del 10.7 por 1,000 habitantes al año, 13.1 por 1,000 en mujeres y 6.9 por 1,000 en hombres, con un crecimiento paralelo a la edad y en México la incidencia es en adultos mayores de 60 años manifestándose como demencia senil.

A nivel mundial, la incidencia va en aumento, por lo que el avance científico y tecnológico requiere de obtención de nuevas moléculas que aumenten la expectativa de vida. La edad es un factor muy importante en el padecimiento de EA, la prevalescencia y la incidencia se duplica aproximadamente cada 5 años, después de los 60 años. La prevalescencia aumenta en un 1 % aproximadamente entre 60-64 años, a 2 % en personas con 65-69 años, 4 % de 70-74 años, 8 % de 75 a 79, 10 % en 80-85 años y aproximadamente de 35-40 % sobre los 85 años. La incidencia se incrementa de un 2.5 % en personas con 75-79 años a un 5 % en personas con 80-85 años y aproximadamente a 10 % en personas con más de 85 años. Dentro de los cambios normales relacionados con la edad, los que pueden contribuir a incrementar los riesgos son la pérdida de neuronas, sinapsis y de los dominios dendríticos de neuronas, reducción en el número y medidas en los núcleos basales de Meynert, disminución en la acetilcolina cortical, las placas neuríticas, y raros “enredos” neurofibrilares confinados en el hipocampo. A nivel histopatológico la EA se caracteriza por pérdida de memoria, desorientación, alucinaciones, trastornos de conducta, un grave trastorno del lenguaje, deterioro cognoscitivo progresivo y finalmente la muerte, en base a esto y desde el punto de vista molecular se han dado grandes avances que explican la etiología y progresión de la EA. Sin embargo, el evento patogénico clave que conduce a la EA aún es incierto debido a que es multifactorial y el sistema nervioso central es muy complejo. Véase Fig.19^[72-74] La EA, es una enfermedad degenerativa del SNC. Se caracteriza por una serie de anomalías cerebrales que afectan de forma selectiva a regiones específicas, en particular la neocorteza, el área entorrinal, el hipocampo, el núcleo amígdalino, el núcleo basal de Meynert, el tálamo anterior y varios núcleos monoaminérgicos del tronco encefálico. Se observa una marcada degradación del sistema colinérgico y por alteraciones en la función de otros sistemas de neurotransmisores, tales como el glutamatérgico y el serotoninérgico. Las principales características neuropatológicas son: a) *Las placas seniles*: son un grupo de neuronas distróficas y células gliales que rodean un núcleo de proteína β -amiloide (β A) localizadas en la neocorteza, hipocampo, amígdala y núcleo basal de Meyner. Los cambios

histológicos se asocian con la pérdida neuronal colinérgica que llega a la corteza y al hipocampo proveniente de regiones basales. Y b) *Los ovillos neurofilamentosos*: El núcleo basal de Meynert revela una predilección por la pérdida neuronal, formación de ovillos (degeneración neurofibrilar). **Véase Fig.20**

Existen múltiples factores asociados a la EA, sin embargo la hipótesis colinérgica es la que se ha mantenido en boga, ya que está bien demostrado la asociación de la EA con el déficit colinérgico secundario a la pérdida neuronal que conlleva a disminución de ACh (acetilcolina) en el espacio sináptico, así como también se ha observado disminución de receptores nicotínicos y muscarínicos a nivel presináptico y posináptico. Lo anterior se sustenta con estudios en animales que han sido lesionados selectivamente en núcleos colinérgicos centrales, apoyando así esta teoría que aún es objeto de discusión. La farmacología de los sistemas colinérgicos, especialmente el uso de antagonistas muscarínicos, refrenda el papel de la neurotransmisión colinérgica en los procesos de memoria y aprendizaje. ^[75, 76] La hipótesis colinérgica de la EA emergió entre los años 1976-1977 como resultante de la publicación de tres trabajos que daban cuenta de una marcada reducción de la acetilcolintransferasa (ChAT) en la neocorteza e hipocampo de pacientes con EA. Esta enzima cataliza la síntesis de ACh a partir de colina y acetilcoenzima A y hasta hoy se considera un excelente marcador de actividad colinérgica así como de supervivencia de las neuronas colinérgicas. Posteriormente se estableció que el origen de la mayor parte de las proyecciones colinérgicas a la corteza cerebral se halla a nivel del núcleo basal de Meynert ubicado en el cerebro basal anterior, y en algunos núcleos septales vecinos. **Véase Fig.21** El núcleo de Meynert es un grupo discontinuo de neuronas grandes, multipolares en su mayor parte. Estudios de autopsia han informado pérdidas de 25 a 90% de las células a nivel del núcleo basal en pacientes con EA; las neuronas sobrevivientes por su parte presentan anomalías vacuolares y degeneración neurofibrilar. Resta por explicar la selectividad de la atrofia del sistema colinérgico, restringida a las neuronas de proyección o de axón largo. Al respecto, Wurtman ha postulado la hipótesis del autocanibalismo de las neuronas colinérgicas. Las neuronas colinérgicas poseen una característica única respecto a la utilización de colina: ésta no solamente es el sustrato de componentes básicos de la membrana neuronal como fosfatidilcolina, sino que también es el sustrato limitante en la síntesis del neurotransmisor y reparación de membranas. Pero si se produce una situación de déficit de colina, la neurona privilegia la síntesis de ACh llegando incluso a degradar la propia membrana para obtener el sustrato. Esto llevaría a la exposición de proteínas de membrana como la β APP y a la acción de proteasas calcio-dependientes con el consecuente aumento de β A y por lo tanto amiloidogénesis. ^[77, 78]

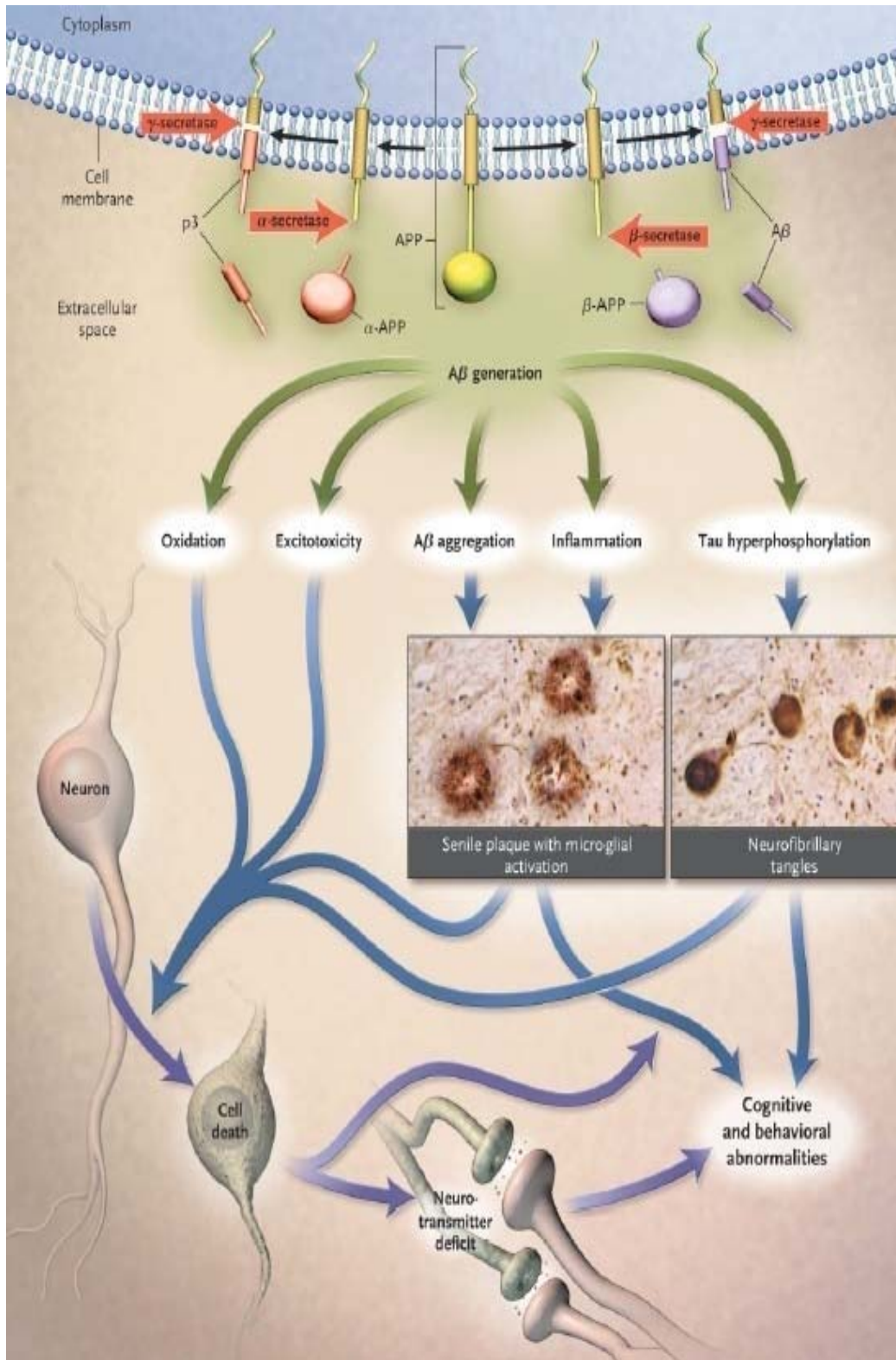


Figura 19: Fenómenos asociados a la muerte neuronal en los pacientes con EA, (tomada de Jeffrey, L. et al., *New Eng. J Med.* 2004).

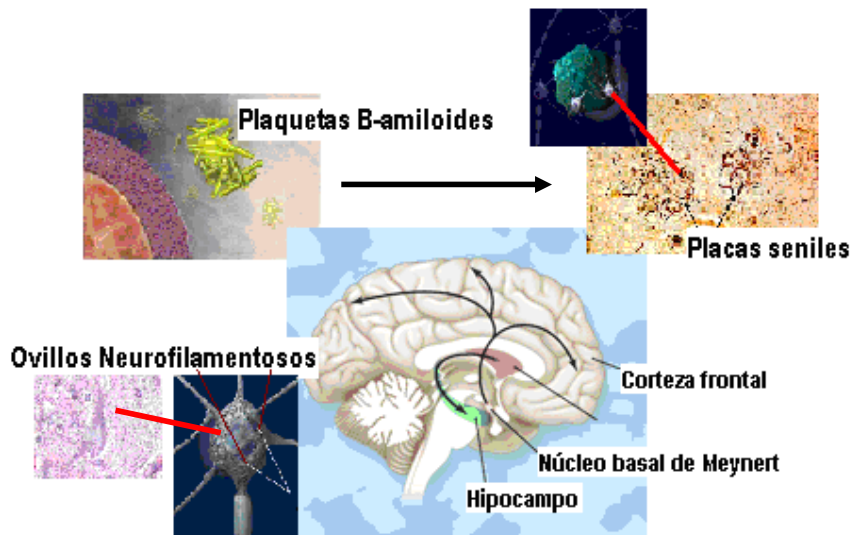


Figura 20: Corteza cerebral en la EA: tinción inmunohistoquímica para la proteína b-amiloide que se deposita en las placas seniles y en las paredes vasculares y tinción inmunohistoquímica para ovillos neurofilamentosos.

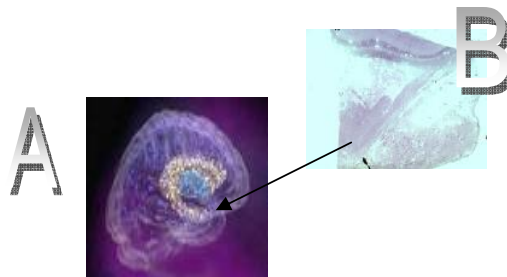


Figura 21: A. Vista del núcleo basal de Meynert. B. Demencia vascular: infarto en la proximidad del núcleo basal de Meynert.

Las evidencias que reflejan un trastorno metabólico de las neuronas centrales colinérgicas de axón largo en la EA se puede sintetizar de la siguiente manera:

- a. La fosfatidilcolina está en constante recambio.
- b. La disponibilidad de colina está marcadamente disminuida en pacientes con EA.
- c. Los metabolitos de fosfolípidos de la membrana como glicerofosfocolina y glicerofosfoetanolamina están aumentados.
- d. El transportador de colina a través de la barrera hematoencefálica disminuye con la edad.
- e. A nivel de las neuronas colinérgicas del núcleo basal se ha encontrado una disminución de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) que codifica para el receptor del factor de crecimiento neural.

Por otra parte la poca distancia existente entre el aparato de Golgi y la terminación nerviosa en las neuronas colinérgicas de axón corto permiten que los fosfolípidos del cuerpo neuronal contrarresten el déficit de colina a nivel terminal, explicando así su inmunidad al daño.^[79, 80]

2.3.2 HIPÓTESIS COLINÉRGICA.

El hecho de que los receptores incrementen o disminuyan en su densidad y/o afinidad, no explican de forma suficiente la fisiopatología de la EA. Se ha demostrado que la densidad de receptores tiende a disminuir tanto en la EA como en el envejecimiento. Sin embargo, muchos resultados aún son contradictorios. Existen 5 subtipos de receptores muscarínicos M1 a 5. Los receptores M1, M3 y M5 están acoplados a proteínas G mientras que los receptores M2 y M4 están acoplados a la adenilciclase.

Los estudios para discernir el subtipo de receptor que tiende a disminuir o aumentar en la EA son complicados por falta de ligandos específicos, sin embargo, se ha logrado demostrar un incremento de los receptores tipo M1 en el cuerpo estriado y la corteza temporal, interpretada como una hipersensibilización que compensa la denervación. Además se ha demostrado en estos receptores cambios de transducción. En los pacientes con EA existe un decremento en el número de receptores M2 presinápticos, lo cual se correlaciona con una disminución de la ChAT en la corteza frontal, temporal e hipocampo. Los receptores nicotínicos presinápticos son canales iónicos de 5 subunidades de origen protéico. Estos receptores tienen un decremento en los pacientes con EA que se correlaciona con la disminución de la ChAT, en el núcleo basal de Meynert, putamen y corteza infratemporal, además existe evidencia de baja afinidad para la nicotina.^[81-83]

2.3.3 TRATAMIENTO DE LA EA

Anteriormente la idea de dar una terapéutica paliativa en la EA era esencialmente teórica. Sin embargo, en últimos años la explosión en el conocimiento de la neurobiología ha sido extraordinaria. Diversos grupos de investigación en el mundo han diseñado fármacos que prometen tanto en el área conductual como cognitiva, elementos de ayuda terapéutica efectiva y segura, con algunos logros alentadores. A fines de 1990, once compañías estaban desarrollando cerca de 16 nuevos medicamentos para la EA. Para 1994, la cantidad de fármacos que estaban

en fases II y III, incluyendo los que estaban en el mercado, sumaban ya 57. Sin embargo, a pesar del tremendo esfuerzo invertido los beneficios a nivel de funciones cognitivas no han mostrado su verdadero potencial. Lo anterior no es consecuencia de malos diseños farmacológicos, sino porque la EA está asociada a múltiples factores.

En un inicio, cuando se empezó a comprender la fisiopatología de la EA, se propusieron inhibidores de AChE, pero gracias a los avances científicos que se han alcanzado últimamente sobre la etiología y fisiopatología de la enfermedad, se ha propuesto el uso de una terapéutica más amplia, por lo que existen nuevos fármacos en las primeras fases de estudio, pero aún no se tiene el modelo que pueda sustituir a los inhibidores de AChE, siendo hasta el momento los únicos aceptados por la Food and Drug Administration (FDA) con excepción de la memantina (bloqueador de receptores N-metil-D-aspartato "NMDA") para paliar a la EA.

A continuación se enlistan los grandes grupos de fármacos propuestos en el tratamiento de la EA como: neuroprotectores, antioxidantes (vitamina E, selegina, idebenona, xantinas y Ginkgo biloba), bloqueadores de canales de Ca^{+2} (nimodipina), estrógenos, antiovillos-antiplacas, antiinflamatorios (naproxen, indometacina, refecoxif), antagonistas de receptores NMDA, ondasentran, precursores de ACh, neurotrópicos (factores de crecimiento neural) y vacunas. [84-86]

2.3.3.1 TERAPÉUTICA COLINÉRGICA DE LA EA

El núcleo subcortical de Meynert corresponde a la zona magnocelular donde se encuentra la máxima concentración de neuronas colinérgicas. Estudios neuroquímicos han demostrado que en la EA hay deficiencia de ACh y de la enzima que la sintetiza. La corrección de este déficit se ha tratado de efectuar racionalmente mediante cuatro mecanismos.

- a) Facilitación de la síntesis a nivel presináptico con precursores colinérgicos.
- b) Agonistas de receptores nicotínicos.
- c) Estimulación directa de receptores para ACh del tipo M1.
- d) Prevención de la hidrólisis de la ACh usando agentes inhibidores de AChE.

Los fármacos usados como precursores colinérgicos como es el caso de colina-lecitina han fallado irremediablemente.

2.3.3.2 AGONISTAS COLINÉRGICOS.

Hasta este momento se usan agentes que inhiben a esta enzima incrementado así la vida media de la ACh en el espacio sináptico, lo que aumenta la estimulación de los receptores nicotínicos y muscarínicos. También se ha demostrado que algunos inhibidores de AChE son agentes neuroprotectores, debido a que la AChE y la BChE participan en la génesis del β A.^[87]

Existe interés por los agonistas de los receptores muscarínicos y nicotínicos Véase Fig.22 en el tratamiento de la EA. Los receptores muscarínicos, especialmente los de tipo M1 tienen un papel importante en la memoria y el aprendizaje. La xanomelina es un agonista selectivo M1 que ha demostrado efecto benéfico en los pacientes con EA, muy semejante a los inhibidores de AChE, pero con múltiples efectos adversos.^[88]

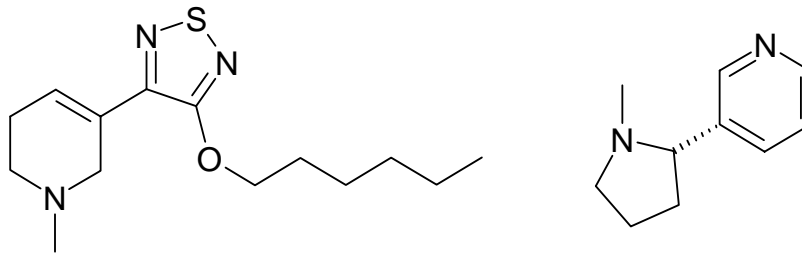


Figura 22: Agonista muscarínico xanomelina (izquierda) y nicotina (derecha).

2.4 INHIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASA.

Historicamente, los inhibidores de la AChE son el primer grupo de fármacos y los más desarrollados para el tratamiento de la EA. De acuerdo al concepto clásico del impacto de los inhibidores de la AChE sobre la neurotransmisión, el principal efecto de estos se asocia con el aumento de la vida media y la concentración del neurotransmisor ACh en el espacio sináptico lo cual conduce a una activación de los receptores colinérgicos tanto nicotínicos y muscarínicos, disminuidos en la EA. Sin embargo, la magnitud del efecto de los inhibidores depende de la integridad de las neuronas sinápticas. Aparentemente éstas están reducidas en las etapas tardías de la enfermedad cuando se observa una disminución significativa en el número de terminales de neuronas colinérgicas.

Los inhibidores de la AChE comúnmente usados pueden agruparse, de acuerdo con su naturaleza química en los siguientes grupos:

1. Alcoholes aromáticos, simples portadores de un grupo de amonio cuaternario, como el edrofonio.
2. Ésteres del ácido carbámico portadores de un grupo amonio cuaternario o terciario (carbamatos) y de un anillo aromático, como la neostigmina.
3. Derivados orgánicos del ácido fosfórico (organofosforados) algunos con anillo aromático, como el diisopropil fluorofosfato.

En general las propiedades farmacológicas de los agentes anticolinesterásicos se pueden predecir si se conocen los sitios donde se liberan la ACh, el grado de actividad del impulso y la respuesta en los órganos efectores correspondientes. La primera generación de inhibidores de la AChE, tales como la fisostigmina, tacrina y airidina, inhiben no selectivamente a la AChE, ya que inhiben a otra enzima de este grupo, la butirilcolinesterasa. Amiridina y tacrina también bloquean los canales de potasio y, de menor manera, los de sodio. Estos inhibidores tienen una actividad colinomimética parecida a la de la muscarina. La eficacia de estos fármacos es moderada y se desarrolla lentamente. Tienen efectos adversos pronunciados, tales como sedación y hepatotoxicidad.^[89]

Una de las investigaciones más populares para la obtención de nuevos inhibidores de la AChE es el incremento de selectividad en la inhibición de la AChE con respecto a la de la BuChE con el propósito de minimizar la toxicidad periférica. Este principio fue tomado en cuenta para el desarrollo en la segunda generación de inhibidores. Esta nueva generación de inhibidores, los cuales tienen una alta selectividad a la AChE, incluye Donepecilo, Galantamina, Eptastigmina y Rivastigmina. El objetivo de las investigaciones fue diseñar compuestos con una alta selectividad de inhibición a la AChE cerebral, más que a las formas periféricas. Estos nuevos inhibidores han disminuido sus efectos adversos en comparación con tacrina.

En el diseño racional de fármacos son varios los factores a considerar. Estos se pueden obtener al crear a los llamados pro-fármacos, los cuales liberan lentamente el principio activo a la sangre, un ejemplo de estos es el metrifonato (profármaco del dimetil-2,2-diclorvinilfosfato). Además de los inhibidores sintéticos, se ha aislado un producto natural, el alcaloide llamado Huperazcina A. El compuesto exhibe actividad anticolinesterasa y está bajo investigación para el tratamiento de la EA.^[90, 91]

Aunque la segunda generación de inhibidores de la AChE difiere en su especificidad, ellos tienen un rango similar de efectos adversos. Esto lleva a la conclusión de que la selectividad de estos compuestos para inhibir a la AChE no afecta su aceptabilidad para uso clínico. Evidentemente, el desarrollo del inhibidor óptimo está limitado primariamente por el blanco de su efecto. Los efectos adversos y depresivos de estos compuestos se deben a su actividad como inhibidores de la AChE. Los efectos tóxicos mencionados, y otros efectos adversos, siguen planeando la necesidad de encontrar nuevos inhibidores anticolinesterasa efectivos y potentes que superen dichas desventajas, ya sea con propósitos terapéuticos o como insecticidas, además de su alta utilidad en investigaciones científicas relacionadas.

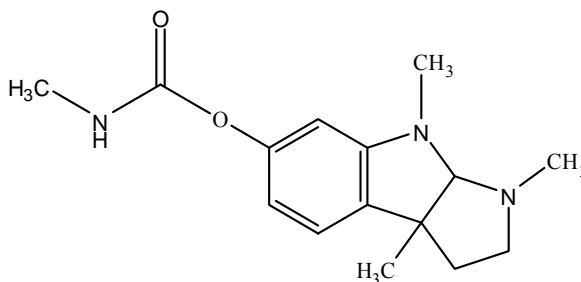
2.4.1 FÁRMACOS: INHIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASA.

Los inhibidores de AChE se clasifican en cuatro grupos, según su relación estructura-actividad:

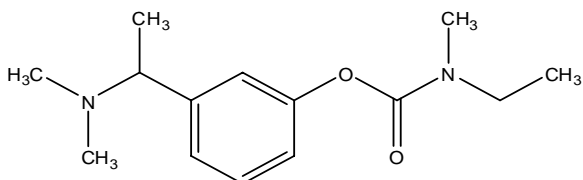
A.- Inhibidores pseudo-irreversible (unión no covalente)

Esta categoría incluye un grupo de carbamatos que forman un complejo carbamoilado con el residuo de Ser200 de la tríada catalítica de AChE que se hidroliza más lentamente que la forma acilada resultante de la interacción con ACh. Dentro de este grupo tenemos a:

1. ***Fisostigmina***. Es una amina terciaria, carbamato de primera generación de origen natural, fue el primer inhibidor de AChE aceptado como tal, con algunos usos terapéuticos. Dadas sus características químicas, atraviesa eficientemente la barrera hematoencefálica, pero su vida media es muy corta (30 min), por lo que no fue aceptada por la FDA, para la terapéutica de la EA.

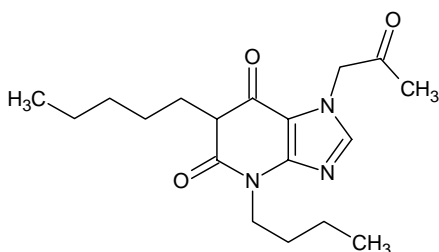


2. **Rivastigmina.** Esta sustancia fue aprobada por la FDA en 2001, para ser usada en la EA. Es más afín hacia la AChE que la BChE, inhibiendo preferentemente la isoforma enzimática G1, que es la que predomina en el SNC. Su dosis de sostén es de 6 a 10 mg por día, se absorbe rápido y por completo por vía oral, no se metaboliza por el CYP450. Tiene una eficacia similar a tacrina (THA) y donepezilo (E2020), sin embargo, sus efectos adversos son, náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal.



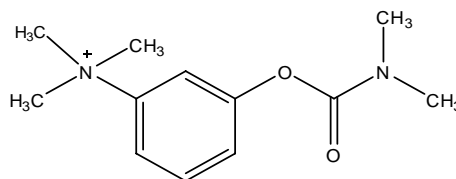
Ya existen carbamatos de tercera generación como: fenserna, RO46-5934, CHF2819 y P10350, que además de inhibir a la AChE, también interactúan con receptores M2 y de serotonina. Sin embargo, son muy caros y no han pasado las pruebas preclínicas.

3. **Eptastigmina.** La eptastigmina igual que la quilostigmina y rivastigmina, son carbamatos de segunda generación. Es un derivado de la fisostigmina, inhibidor de la AChE de tipo reversible, al administrarlo a pacientes con EA se observa mejoría clínica; sin embargo, induce arritmias cardíacas así como trombocitopenia, por lo que se suspendió el uso de este fármaco.



4. **Neostigmina.** Es una amina cuaternaria; así mismo, este carbamato es de segunda generación, el cual produce una inhibición de la acetilcolinesterasa mediante la formación reversible de un complejo ester carbamil en la porción ester de la parte activa de la colinesterasa. Actúa como un inhibidor competitivo de la acetilcolinesterasa mediante un mecanismo de unión similar a la de la misma acetilcolina. Hay una transferencia subsiguiente, sin embargo, del grupo carbamato de la molécula de neostigmina a la parte

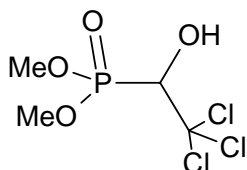
éster de la acetilcolinesterasa. La neostigmina también se piensa que tiene una acción presináptica, produciendo un aumento del nivel de liberación de acetilcolina.^[92]



B.- Inhibidores irreversibles.

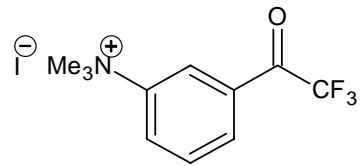
Esta familia de IChE incluye una serie de organofosforados que forman complejos estables fosforilados con el residuo de serina en el centro activo de AChE, y cuya desfosforilación, es aún más lenta que la descarbamoilación. Dentro de este grupo tenemos a:

1. **Metrifonato.** Este compuesto es un pro-fármaco, de por sí no-activo, que se transforma no-enzimáticamente en 2,2-diclorovinil-dimetilfosfonato (DDVP), la FDA finalmente no lo ha aprobado debido a problemas detectados en el sistema respiratorio y en músculo en un grupo pequeño de pacientes.

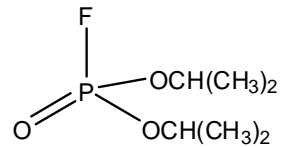


C.- Inhibidores tipo-análogos de estados de transición (compuestos organofosforados)

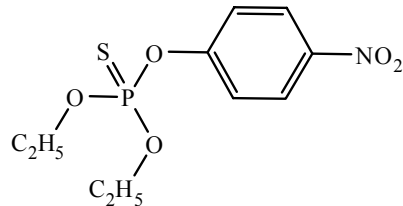
1. El **yoduro de m-(N,N,N-trimetilamonio)trifluoroacetofenona**, su potencia procede de la interacción covalente y reversible con el residuo de serina del centro activo de la enzima, formando un aducto hemiacetal, tetrahédrico, que recuerda el estado de transición en el mecanismo mismo de la enzima. No obstante, el carácter iónico de este compuesto impide su paso por la barrera hematoencefálica.



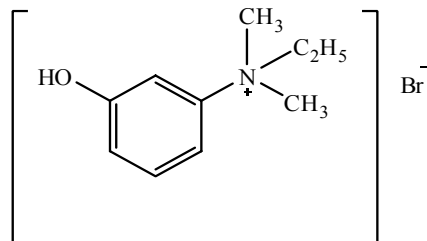
2. **DFP (Diisopropilfosfofluorato).** Inactiva irreversiblemente a la AChE, es muy liposoluble, de bajo peso molecular y su volatilidad facilita su inhalación, absorción transdérmica y penetración al SNC.



3. **Paratión.** Químicamente es inactivo, por lo que se requiere la sustitución del azufre por el oxígeno en el hígado para obtener el metabolito activo: paraoxón. Es un compuesto muy tóxico.^[93]



4. **Edrofonio.** Fármaco cuaternario cuya actividad se limita a sinapsis del sistema nervioso periférico. Su acción farmacológica es breve debido a su rápida eliminación por riñones.^[94]

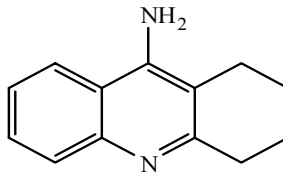


D.- Inhibidores Reversibles

A diferencia de los anteriores, estos interactúan con la enzima cerca del sitio catalítico, sin producir complejos covalentes. Tres son las grandes familias en este grupo: A) tacrinas (análogos de aminoacridinas), B) las *N*-bencilpiperidinas y C) algunos alcaloides. [5]

I.

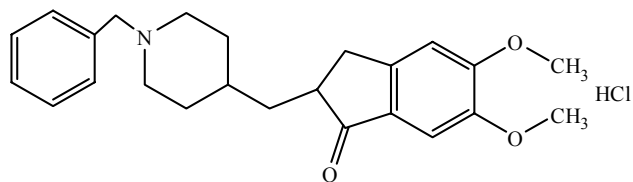
- a) **Tacrina.** La tetrahidroaminoacridina (THA) o tacrina, fue el primer fármaco aprobado por FDA en 1993, su dosis fue de 80 mg por día. Esta sustancia inhibe tanto a la AChE como a la BChE. La aprobación de tacrina por la FDA, se basó en tres estudios multicéntricos, sin embargo en los mismos estudios se observó incremento de transaminasas hepáticas, que se corrigieron una vez suspendiendo el fármaco, lo que ocasionó que se suspendiera su uso en el tratamiento de la EA. En el análisis por rayos-X del complejo tacrina-AChE se observa que tacrina se dispone paralelamente entre los restos de Trp84 y Phe330, el átomo de nitrógeno heterocíclico está formando un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo de la cadena más larga de His440, y el grupo amino forma un puente de hidrógeno con una molécula de agua.



II.

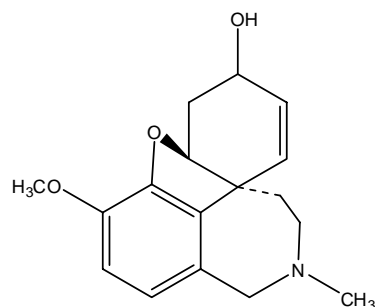
- a) **Donepezilo.** Aprobado por la FDA en 1996 para tratar a la EA, Inhibe selectiva y reversiblemente a la AChE tanto G1 como G4, es el primero de una nueva clase de inhibidores de AChE no relacionada químicamente con la THA, su dosis es de 5 a 10 mg por día. Se absorbe bien por vía oral, tiene una vida media de 70 h. Es metabolizado por los citocromos CYP2D6 y 3A4. Con este fármaco hasta un 80% de los pacientes tiene mejoría clínica. Algunos estudios han documentado que sus principales efectos adversos, son diarrea, vómito, mareo, insomnio, calambres musculares, cansancio y anorexia. Se ha observado por rayos-X que el complejo donepezilo-AChE, donepezilo adopta una singular orientación,

situándose desde el centro aniónico del centro catalítico hasta el sitio periférico de AChE, interaccionando con distintos restos aromáticos de los diferentes aminoácidos aromáticos y moléculas de agua. Se observa que el grupo bencilo se dispone en una posición paralela, dando lugar a una interacción p-p, con el anillo indólico de Trp84 y, por lo tanto, "ocupando" el sitio de unión de los grupos cuaternarios en el centro activo; el nitrógeno cuaternario del anillo de piperidina genera una interacción catión-p con el resto de Phe330; finalmente, el anillo de indanona se dispone paralelamente (interacción p-p) con el anillo de indol de Trp279 en el sitio periférico.

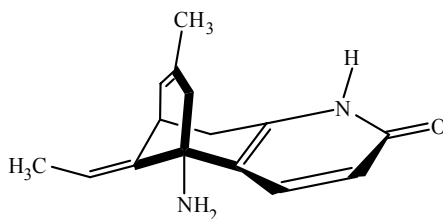


III.

- a) **Galantamina.** Es un fármaco que además de inhibir a la ACHE es un agonista de los receptores nicotínicos presinápticos, de manera directa, incrementando así la liberación de ACh. Este fármaco ya está aprobado por la FDA, para ser usado en los pacientes con EA. La Galantamina se une a la base del sitio activo interno de la enzima interaccionando con el bolsillo de unión del grupo acilo y con el sitio de unión del grupo amonio cuaternario. Sin embargo, la amina terciaria interacciona por medio de una molécula de agua con los restos de Trp84 y Phe330. Otros puntos de contacto son los puentes de hidrógeno del oxígeno del grupo metoxilo y del grupo hidroxilo de Ser200, y entre el grupo hidroxilo del anillo de ciclohexenol y el grupo carboxílico de Glu199.



b) **Huperzina**. Derivada del licopodio chino (*Huperzina serrata*). Aislada por primera vez en 1948 por científicos chinos. No puede ser administrada a personas con presión arterial alta o enfermedad hepática o renal severa. Es muy potente, de larga acción, baja toxicidad, que aumenta las funciones cognitivas en humanos y animales, y que exhibe neuroprotección en neuronas de hipocampo y córtex cerebral. En el análisis por rayos-X del complejo huperzina A-AChE 2 se observa que el grupo amino interacciona con los anillos aromáticos de Trp84 y Phe330, hay un puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo del ligando y el grupo hidroxilo de Tyr130, una interacción entre el grupo etilideno y el oxígeno principal de His440, y varias moléculas de agua interaccionando con distintos residuos en el bolsillo catalítico.



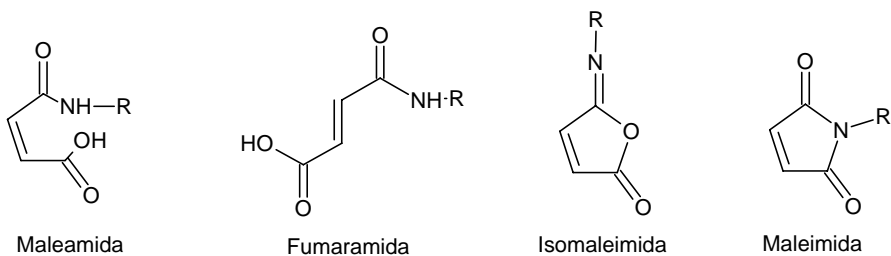
2.5 ANTECEDENTES QUÍMICOS.

En el presente trabajo se mencionó que la Acetilcolinesterasa contiene dentro de la triada catalítica binucleófilos ($\text{Nu} = \text{R-SH}, \text{R-OH}, \text{R-NH}_2$), los cuales reaccionan con electrófilos (E) presentes en los sustratos correspondientes. Esto se conoce debido a las investigaciones que se suscitaron alrededor de este tema, y que son por lo tanto la base del presente trabajo.

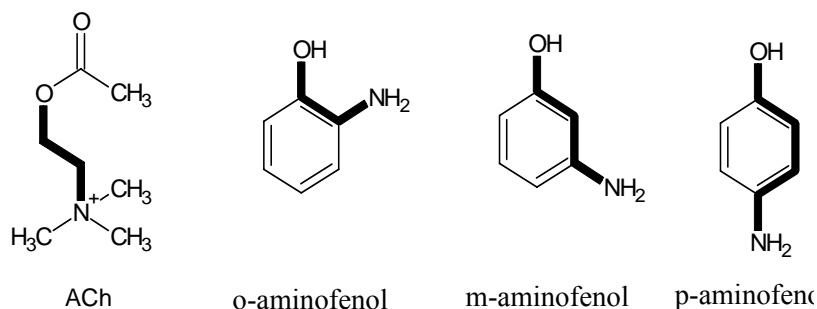
El conocimiento de la AChE y su acción sobre la ACh, ha permitido el desarrollo de varios grupos de fármacos inhibidores de esta, con el objetivo de estudiar el efecto de los diferentes sustituyentes de este grupo de inhibidores para obtener el o los compuestos con mayor afinidad al receptor (AChE). Uno de los trabajos pioneros en el campo de la síntesis de inhibidores enzimáticos no clásicos es de B. R. Baker^[95], quien considera que el antimetabolito no necesariamente debe tener completa similitud estructural con el sustrato natural, mientras conserve la porción que interaccionará en el sitio catalítico y/o sitios activos de la enzima. En efecto, la idea era obtener inhibidores potentes que

reconozcan el sitio activo de la enzima con una propiedad adicional, es decir, que tengan en su estructura un electrófilo. Por lo tanto la formación del enlace covalente entre el receptor y el fármaco constituye la base del diseño de inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo de enzimas. Para ello se toma como base el sustrato natural o una molécula con relación estructural a dicho sustrato. Esta parte de la molécula es la que da el reconocimiento enzima-inhibidor, mientras que la otra porción de la molécula es la que participa en la formación del enlace covalente y por consiguiente es la que da la inhibición irreversible. Dicha porción de la molécula funciona como electrófilo (E) y es la que relaciona con los bionucleófilos (Nu) existentes en el sitio activo de la enzima.

En base a lo anterior, las investigaciones^[8, 15, 45, 46, 57, 58, 74, 87, 110] se han enfocado principalmente a la síntesis de maleamidas, fumaramidas, isomaleimidias y maleimidias, con el fin de obtener un fármaco que inhiba a la AChE específicamente, con propiedades farmacológicas, mejores a los anti-AChE existentes, y que puedan ser usados en un futuro, en enfermedades cuya concentración de ACh este disminuida o se carezca de receptores para este neurotransmisor.



Los cuatro grupos anteriores comparten la propiedad de unirse covalentemente a un centro nucleofílico, debido a que son muy reactivos por la presencia del doble enlace en posición α , β con respecto al carbonilo, lo que les permite llevar a cabo reacciones de adición tipo Michael^[96]. Para la porción de la molécula (**R**) que da el reconocimiento con la enzima se usa la materia prima relacionada estructuralmente con la acetilcolina (ACh). Esta materia prima es una anilina sustituida como se muestra a continuación:



Sin embargo, el hidroxilo puede sustituirse con grupos electroattractores (COOH; NO₂) o electrodonadores (OCH₃; H), con el fin de estudiar los efectos de los sustituyentes en el reconocimiento de la molécula con la AChE. En la actualidad estos inhibidores han adquirido importancia, no solo como plaguicidas, sino en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, caracterizada por un trastorno neurológico con pérdida del control de algunos reflejos, la memoria y el lenguaje.

Estos compuestos, derivados de las anilinas sustituidas se probaron *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, encontrándose que actúan como agonistas directos a receptores muscarínicos tipo M de acetilcolina, por estar implicados en las alteraciones mentales tipo Alzheimer^[97]. Así mismo, existe la descripción del estudio espectroscópico por RMN de cada serie de amidas aromáticas, isomaleimidadas y maleimidadas, las cuales son mostradas más adelante en este trabajo.

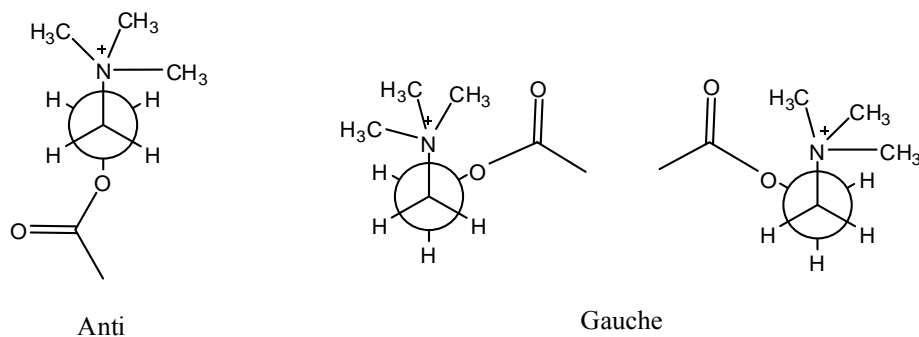
En la síntesis descrita para maleamidas, la única variante es el disolvente utilizado y la amina que se hace reaccionar con el anhídrido maléico para formar el ácido maleámico. Entre los disolventes más comúnmente utilizados están: metanol, etanol, ácido acético y metiletilacetona^[98]. En todos los casos se obtienen rendimientos del 90 al 95% del producto purificado, de tal manera que el criterio de elección del disolvente se basa en la solubilidad de la amina y el anhídrido maléico. Se ha reportado que la transformación *cis-trans* (Z-E) de oleofinas se puede dar por varios métodos con buen exceso diastereomérico^[99]. Estos resultados son particularmente buenos, cuando se usan ácidos de Lewis como catalizadores^[100]; sin embargo, existen informes de que la isomerización del maleato de dietilo a fumarato de dietilo no tienen lugar bajo dichas condiciones de reacción, probablemente debido a que el ácido de Lewis interacciona preferentemente con el oxígeno más que con el par de electrones del enlace carbono-carbono. Sin embargo, existen pocos informes de la transformación Z-E de maleamida a fumaramida, se tiene el antecedente que al usar una gota de ácido sulfúrico concentrado, como catalizador, se tiene la transformación en ácido acético a reflujo.

Las imidas se consideran como diacil derivados del amoníaco o de aminas primarias, con pérdida de una molécula de agua, como antecedente se tiene que la síntesis que arroja un gran rendimiento, es aquel que aprovecha la reacción retro Diels-Alder a bajas temperaturas. Las maleamidadas N-sustituídas, tanto alifáticas como aromáticas se obtienen haciendo reaccionar anhídrido maléico con la amina en cuestión. Con este método se obtiene primero el ácido maleámico, cuya deshidratación conduce inicialmente a la isomaleimida y posteriormente a la maleimida correspondiente. La formación de la

isomaleimida depende del ácido maleámico del que se trate y de las condiciones de deshidratación. Los principales reactivos para deshidratar son: anhídrido acético en presencia de acetato de sodio anhidro, N,N-diciclohexilcarbodiimida, cloruro de tionilo^[101], pentóxido de fosfato^[102]. En el presente trabajo se eligió la mezcla anhídrido acético/acetato de sodio, ya que proporcionan buenos rendimientos y condiciones de reacción suave. En dichas condiciones al iniciar la ciclización, primero se obtiene el producto cinético (isomaleimida) y al aumentar la temperatura se obtiene el producto termodinámico (la maleimida).^[103]

Se ha demostrado que las maleamidas y maleimidas no presentan mezcla diastereomérica Z, E; sin embargo, la isomaleimida puede presentar los dos diastereómeros, siendo el mayoritario el estereoisómero Z.

En cuanto al funcionamiento de la AChE en presencia de los inhibidores, se tiene el antecedente teórico de que esta confunde a los compuestos con la ACh. Sin embargo, la ACh puede existir en cuando menos tres conformeros energéticamente favorecidos.



De las tres, la conformación *gauche* es la más favorecida energéticamente, debido a las interacciones atractivas entre el nitrógeno cuaternario y el oxígeno esterático. Tomando en cuenta que en investigaciones anteriores las maleamidas y maleimidas (precursoras de las maleamidas acetiladas) son estructuras rígidas, casi planas y que los compuestos *orto* se relacionan con la conformación *gauche* de la acetilcolina, mientras que los *meta* con una conformación intermedia entre *gauche* y *anti*, y los derivados de *para* se relacionan con el conformero en *anti*.

Sin embargo experimentalmente se demostró que la hidrólisis de la ACh ocurre con la conformación completamente extendida del sustrato (conformación *anti*), mientras que la conformación *gauche* es poco adecuada para el acoplamiento de la enzima. Lo anterior se describe por las K_i obtenidas experimentalmente, donde los derivados amídicos e imídicos *orto* no presentaron actividad inhibitoria considerable, los *meta* presentaron

potencia intermedia ($K_i=1.38 \times 10^{-5} \text{M}$) y los compuestos *para* presentaron mayor capacidad de inhibición ($K_i=4.5 \times 10^{-8} \text{M}$), todos ellos derivados del aminofenol monosustituído. A la par, los resultados arrojados por diferentes investigaciones demuestran que los compuestos saturados son menos tóxicos que los compuestos insaturados, esto se le atribuyó al carbonilo α - β insaturado.

Como ya se mencionó anteriormente la AChE puede ser inhibida por una amplia variedad de compuestos, los cuales presentan algunas características estructurales en común. Considerando estas similitudes, se observó que los derivados amídicos sustituidos en la posición 4 del anillo fenilo cumplen con varias características que comparten los diferentes inhibidores de la AChE. En primer lugar, núcleo cíclico principal, el cual es comúnmente encontrado en inhibidores irreversibles selectivos; este se encuentra bisustituído por dos grupos principales, el primero la amida y el segundo por un grupo éster, con lo que se obtiene un patrón estructural similar al observado en diferentes familias de inhibidores.

Los grupos funcionales juegan un importante papel en el reconocimiento molecular, por lo que se eligió un grupo funcional comúnmente observado en el sustrato natural (ACh), el grupo éster. Este grupo fue considerado como probable determinante de la afinidad por la AChE, por lo tanto se incorporó en el anillo bencénico como clave para la actividad de muchos inhibidores selectivos.

III. JUSTIFICACIÓN

Una estadística real de incidencia de Alzheimer en México no existe, esto representa un problema en todos los ámbitos de la investigación y en clínica; por lo tanto para tener una noción parcial del problema, se han realizado cálculos que consideran la frecuencia mundial de la aparición de la enfermedad a los 65 años. Es decir, Se calcula la frecuencia de 5% en la población de 65 años (Según el INEGI), lo cual da un valor aproximado entre 300 o 350 mil personas con EA. Ante esto se hace notar que el resultado solo es un valor calculado, lo cual no toma en cuenta el parámetro de la mezcla étnica (dato que es desconocido aún), y que puede influir en la frecuencia de aparición de la EA¹. Por otro lado, no existe ninguna medida terapéutica que permita mejorar la calidad de vida de los pacientes con EA; aún cuando esta enfermedad tiene múltiples etiologías que convergen generalmente en disminución de la ACh y/o falta de receptores de la misma en la membrana pre o postsináptica, no se conoce con exactitud la fisiopatología de esta enfermedad y los fármacos usados tienen múltiples desventajas. En la actualidad existe una amplia variedad de inhibidores de AChE aprobados por la FDA, pero aún no se tiene el ideal para dar una terapia óptima a la EA.

La incidencia del diseño de fármacos bajo estudios de relación estructura-actividad, ha permitido diseñar sustancias biológicamente activas. Para lograr este objetivo se consideran factores electrónicos, de geometría, el coeficiente de reparto, el impedimento estérico, las distancias interatómicas, la densidad electrónica, la acidez, vibración interatómica, volumen molecular, los cuales juegan un papel importante en el reconocimiento por el receptor.

Los estudios basados en datos de modelaje molecular y de análisis cuantitativo de la relación estructura-actividad han permitido diseñar este patrón de reconocimiento, en el cual, se han obtenido importantes datos de agentes terapéuticos derivados de los compuestos mencionados en la tabla 1. Por esta razón se ha optado por estudios de simulación molecular asistida *in silico* con el propósito de encontrar moléculas líder de una forma eficiente y relativamente económica.

El diseño de nuevos fármacos anti-ChE buscan optimizar tanto la síntesis como la actividad biológica; para lo cual, se sintetizan una serie de compuestos estructuralmente relacionados y se analiza el QSAR. Lo anterior se ve reforzado por el reconocimiento molecular “Docking” entre la estructura tridimensional de la enzima AChE y los compuestos propuestos. Es necesario

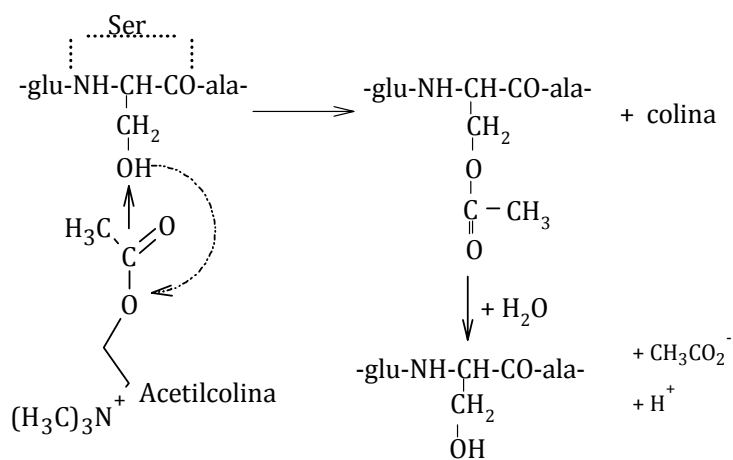
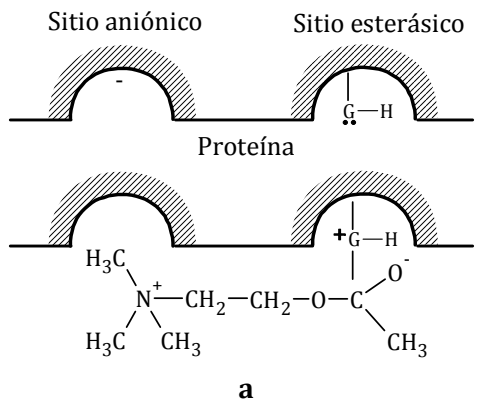
¹ Datos Proporcionados por el Dr. Jorge Guevara del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México (INNyN). 2007

resaltar que la posición tridimensional del inhibidor en el sitio activo de la enzima, varía entre las diferentes clases químicas; así mismo, se ha encontrado la importancia de las moléculas de agua en la determinación de esta disposición tridimensional. La información de las interacciones enzima-inhibidor serán útiles para comprender la complejidad del sistema entre la estructura y la actividad de nuevas clases químicas de inhibidores de AChE, especialmente de diseño *de novo* y de construcción híbrida. De esta forma, se evidencia la conveniencia de buscar nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa cuya acción sea más específica, potente y durable, cuyos efectos indeseables sean mínimos y con las características fisicoquímicas que les permitan llegar hasta el SNC, por lo tanto, en este trabajo se propone el diseño, la síntesis de las N-arilimidaz; derivada del p-aminofenol, y probar sus efectos colinérgicos.^[107, 108]

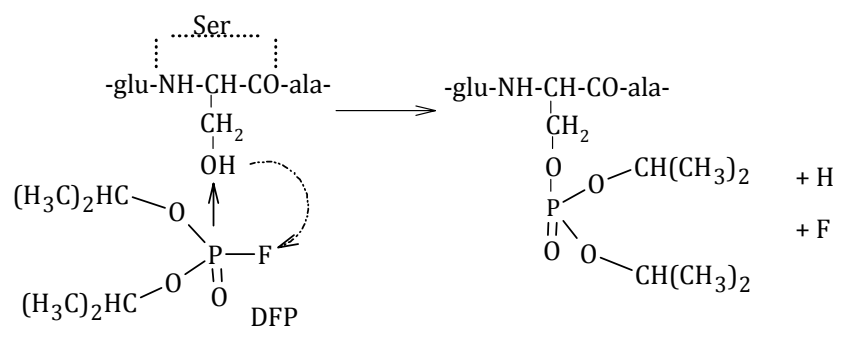
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En un inicio, los inhibidores de AChE llamaron importantemente la atención de los investigadores por sus aplicaciones bélicas en la segunda guerra mundial. Posteriormente se propusieron para tratar enfermedades que requirieran del uso de anticolinesterásicos así como insecticidas, pero por los efectos tóxicos como: neurotoxicidad, nefrotoxicidad, efectos parasimpáticos agudos y citotoxicidad (organofosforados), hepatotoxicidad y miopatías (tacrina), se limitó su uso. Tal toxicidad se potencializa, por las características fisicoquímicas que algunos presentan como son: alta volatilidad, alta liposolubilidad, e inactivación de esterasas diferentes a la AChE, como en el caso de las serin-proteasas.

La AChE es una serín hidrolasa, en su acción catalítica se involucran pasos de acilación-desacilación en un residuo de serina en la triada catalítica. En el centro catalítico de las proteasas, al igual que las esterasas, el grupo $-OH$ de la serina forma parte de un enlace de hidrógeno en la triada catalítica.^[55] Véase **Fig. 23** El papel principal de la AChE es la terminación de la transmisión del impulso en las sinapsis colinérgicas por rápida hidrólisis del neurotransmisor; por lo tanto, ha sido un blanco importante para el diseño racional de inhibidores basándose en el mecanismo de acción, entre éstos se encuentran organofosforados, carbamatos, sales de amonio cuaternario, edrofonio, tacrina y huperazina A, entre otros. En la Tabla 1, se ilustran las diferentes características químicas de los compuestos más conocidos como inhibidores de AChE empleados en la EA.^[104-106] En relación a las características químicas de los inhibidores de AChE mostrados en la **Tabla 4**, se observa que todos contienen un anillo aromático y un átomo de nitrógeno; este eventualmente pudiese adquirir carga positiva lo que incrementa el reconocimiento con la AChE. Por otro lado los anillos aromáticos tienen interacciones de tipo $\pi-\pi$ con los aminoácidos de la misma naturaleza (sitio de unión a ligandos aromáticos) contenidos en la AChE, Esto ilustra la importancia que juegan estos componentes químicos, en este grupo de fármacos.



b



c

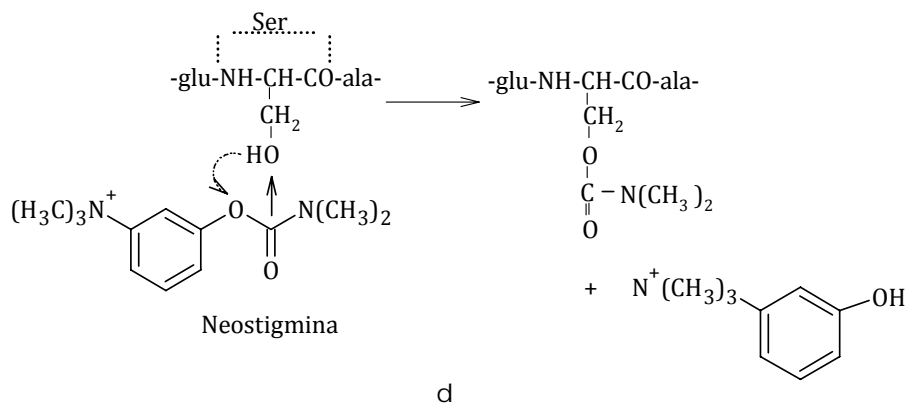


Figura 23: Hidrólisis de la ACh por la colinesterasa y modo de acción de dos inhibidores
a) Sitio activo de la enzima, b) Regeneración de la enzima por hidrólisis, c) Inhibición irreversible por DFP “isofluorato” y d) Inhibición reversible por Neostigmina.

TABLA 4
DIFERENTES CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE INHIBIDORES DE AChE CON UNA CARACTERÍSTICA COMÚN (ANILLO AROMÁTICO Y N).

Nombre	Estructura	K_i
Fisostigmina		$1.50 \times 10^{-7} M$
Tacrina		$7.70 \times 10^{-8} M$
Donezepil (E2020)		$6.70 \times 10^{-9} M$
Galantamina		$3.60 \times 10^{-7} M$
Rivastigmina		$4.30 \times 10^{-9} M$

Para el diseño de los compuestos aquí propuestos se consideraron factores determinantes para la actividad AChE como:

- La similitud estructural entre la ACh, los compuestos propuestos y la neostigmina; considerando que la distancia existente entre el oxígeno del grupo éster y el nitrógeno cuaternario de la ACh y los fármacos en estudio es un factor importante a considerar, ya que esto les permitirá acoplarse óptimamente al sitio activo de la AChE e inhibirla. Véase Fig. 24 En este campo se ha demostrado la mayor potencia inhibitoria de los derivados de aminofenol sustituidos en posición *para* en comparación con los *meta* y los *orto*, que no inhiben

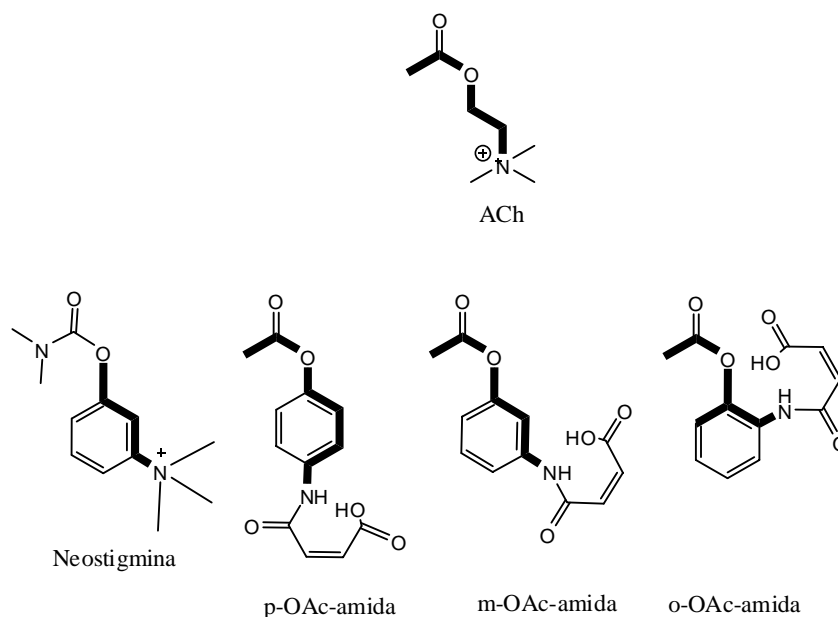
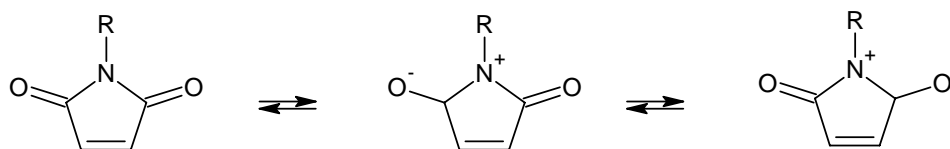


Figura 24: Relación estructural entre acetilcolina, las amidas propuestas y la Neostigmina.

- El efecto de los sustituyentes sobre la actividad inhibitoria de los precursores de los compuestos propuestos ha sido muy estudiado.^[8, 15, 45, 46, 57, 58, 71, 74, 87, 110] Se ha demostrado que los grupos electrodonadores enriquecen la densidad electrónica del anillo aromático, aumentando la afinidad por la enzima, y como consecuencia un incremento en la actividad inhibitoria. Contrario a los electroattractores; sin embargo, una excepción es el grupo OAc en estos compuestos, por su gran relación estructural con la ACh.
- El aminofenol y sus derivados presentan en su estructura regiones molecularmente similares a las regiones de acoplamiento del sustrato natural, se considera que ello les

permitirá acoplarse con el sitio activo de la acetilcolinesterasa e inhibirla, comportándose como bioisómeros (más similares en su actividad biológica que en sus propiedades fisicoquímicas) de ACh. Es decir, el nitrógeno cuaternario tanto en la ACh como en la neostigmina es esencial para la interacción con la enzima; aunque la presencia impide el paso de los compuestos a través de la barrera hematoencefálica. Por lo tanto la obtención de moléculas sin carga fija pueden favorecer la liposolubilidad y el reconocimiento con la enzima, por su capacidad de generar carga positiva, como se muestra a continuación.



- Finalmente, la actividad biológica mostrada por las arilmaleamidas, permite proponer la síntesis de análogos para evaluarlos como posibles inhibidores de la AChE.

V. HIPÓTESIS

1. Si AChE reconoce el ligando que tiene en su estructura grupos aromáticos y al menos un átomo de N, es posible que los derivados arílicos que aquí se proponen tengan afinidad por esta enzima, siendo más afin por poseer un grupo funcional electroattractor al ser evaluado mediante estudios computacionales (*docking*).
2. Se propone que en función de la posición *para* del sustituyente amídico (bioisosterismo), presenta mayor potencia inhibitoria, tomando en cuenta que para el acoplamiento de la acetilcolina con el sitio activo de acetilcolinesterasa, la distancia nitrógeno cuaternario-oxígeno esterático es factor determinante..
3. La amida del ácido maleámico, por la presencia de un doble enlace en posición alfa-beta en relación con el carbonilo, que les permite llevar a cabo reacciones de adición 1,4 tipo Michael en condiciones suaves, se espera que reaccionen de manera irreversible
4. La estimulación de las aferencias vagales hacia el tubo digestivo aumenta el tono, la amplitud de la contracción y la actividad secretora del estómago y el intestino, las cuales no se observan de manera constante al administrar ACh debido a la hidrólisis tan rápida que se produce por la AChE; la cual impide que llegue a los receptores muscarínicos y ejerza su acción,^[34, 50] por lo tanto con la administración del inhibidor propuesto en este trabajo, se espera inhibir la AChE y observar tales respuestas amplificadas por la acumulación de ACh endógena, proporcional a la dosis aplicada del fármaco.
5. Se sabe que los anticolinesterásicos tienen acción preferencial en uniones neuromusculares del músculo estriado y ejercen una doble acción, por lo tanto pueden actuar a la par como agonistas colinérgicos. De esta forma a nivel vías urinarias producen contracción del músculo pobovesical, incremento de la presión de micción y disminución de la capacidad de la vejiga y aumento del peristaltismo ureteral; así mismo, los músculos del trígono y del esfínter externo se relajan^[34, 50]; por tal motivo se cree que a mayor dosis de p-OAc-amida no solo actuará como inhibidor colinesterásico debido a su similitud estructural con la Acetilcolina, también actuará como agonista colinérgico.

VI. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y caracterizar los análogos estructurales de acetilcolina derivados de p-aminofenol que presentaron mayor afinidad; previamente analizados por docking, con el fin de evaluar la capacidad inhibitoria sobre la AChE *in vivo*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Efectuar el estudio por docking usando el programa AutoDock 3.05, de las tres maleamidas acetiladas en posición *para*, *meta* y *orto*, respectivamente sobre la AChE.
- Determinación de la ocupación del subsitio aniónico de la AChE utilizando Neostigmina como patrón en competencia con la ACh y los inhibidores sintetizados, utilizando simulación por computadora a través del programa Docking.
- Síntesis de las maleamidas acetiladas que presentaron mayor afinidad en el docking.
- Determinación del rendimiento de la síntesis y la pureza de los compuestos.
- Caracterización de los compuestos sintetizados por métodos espectroscópicos de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) de y carbonotrece (RMN-¹³C).
- Evaluar los efectos farmacológicos en animal íntegro, al administrar los compuestos acetilados.

VII. DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1 MATERIAL Y REACTIVOS.

6.1.1 DOCKING

- Los estudios se realizaron con el programa AutoDock 3.05 en plataforma Linux, en una PC P4 a 1.6 GHz con 512 MB en RAM.
- La enzima AChE sobre la cual se realizó El Docking, fué obtenida del banco de datos de proteínas (PDB).
- Después de aislar la unidad catalíticamente activa, se adicionaron átomos de hidrogeno, cargas parciales y parámetros de solvatación, utilizando El programa AutoDock Tools.

7.1.2 SÍNTESIS

- Las determinaciones de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un espectro Jeol GSX.270 para ^1H y 68.7 MHz para ^{13}C .
- El espectro IR fue determinado en un espectrofotómetro Perkin Elmer 16F-FT-IR en pastilla de KBr.
- Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato de Gallen Kamp (los datos no están corregidos).
- El tetrahidrofurano (THF) se secó utilizando sodio metálico (Na) y benzofenona como indicador, manteniéndose en agitación y reflujo en atmósfera inerte (N_2) hasta obtener un color azul intenso y destilándose previa utilización.
- Los solventes usados para la síntesis se destilaron previamente; así mismo todos los reactivos utilizados fueron de grado reactivo (GR), de la marca Aldrich.

7.2 METODOLOGÍA

7.2.1 DOCKING.

El procedimiento general consistió en preparar archivos de entrada para AutoDock 3, los cuales deben incluir la estructura de la macromolécula, la estructura de los ligandos, los archivos de parámetros y algunos archivos adicionales creados y utilizados por el programa.

La enzima a ensayar (AChE) sobre la cual se realizaron las simulaciones de *docking* fue obtenida del banco de datos de proteínas¹ (PDB con clave: 1B41). A este archivo se le eliminaron moléculas de agua y ligandos ajenos a la enzima. Esto se realizó usando el editor de texto wordpad. Después de aislar los ligandos ajenos a la proteína, se adicionaron los átomos de hidrógeno, cargas parciales y parámetros de solvatación, utilizando el programa AutoDockTools. Con la finalidad de evaluar la contribución electrostática en el reconocimiento, se calcularon cargas parciales de Kollman. También se determinaron los átomos de hidrógeno polares, es decir, aquellos unidos a átomos electronegativos que pueden participar en interacciones por puente de hidrógeno. Todos los átomos de hidrógeno no polares se trataron de manera implícita, es decir, son eliminados de la estructura y su efecto es sumado a los átomos a los que estaban unidos. Por último se adicionaron parámetros de solvatación. Hechas estas modificaciones se editaron los archivos *.pdbqs para la enzima con el mismo programa previamente mencionado.

La estructura de los compuestos “dockeados” fue construida utilizando el programa Hyperchem 6.0 Å. Dichas estructuras se les optimizó su geometría utilizando el método B3LYP/6-31G** en el programa Gaussian 98 y se convirtieron a formato *.pdb con el programa Molekel 4.3. Una vez optimizadas las estructuras, se adicionaron cargas parciales de Gasteiger y se definieron los átomos de hidrógeno polares mediante el programa AutoDockTools, de manera similar a como se realizó con las enzimas. En seguida se especificaron los carbonos aromáticos, se definieron las porciones rígidas de las moléculas y se especificaron los enlaces que presentan libre rotación. Esta información se escribió en un archivo *.pdbq para cada uno de los inhibidores.

El mapa de afinidad atómica se generó para el archivo *.pdbqs de la enzima, utilizando el programa AutoGrid 3.0. Para la enzima se generó un mapa de afinidad por cada tipo de átomo encontrado en el ligando. En primer lugar se especificó cada uno de los tipos de átomos presentes en los inhibidores. Después, a la enzima se le delimitó el volumen a analizar, el cual

¹ www.pdb.org

se fracciona en secciones o puntos, sobre cada uno de éstos se hace el cálculo de afinidad por cada átomo. Esta información se almacenó en un archivo *.gpf, que es utilizado por el programa AutoGrid para generar los mapas de afinidad. Estos mapas son utilizados por el programa AutoDock para determinar la afinidad de los inhibidores por la enzima.

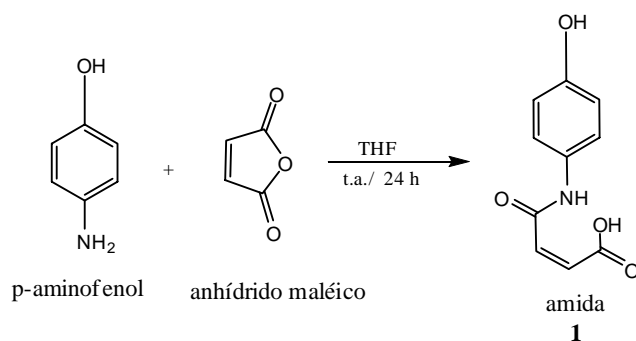
La ejecución del programa AutoDock requiere la estructura de la enzima en formato *.pdbqs con los respectivos mapas de afinidad atómica (*.gpf), las estructuras de los inhibidores en formato *.pdbq y un archivo de parámetros *.dpf. Este último se creó también utilizando el programa AutoDockTools. El método a utilizar fue el algoritmo Genético-Lamarckiano implementado en AutoDock, los parámetros a utilizar fueron los siguientes: 100 corridas, 100 individuos en la población, 1×10^7 evaluaciones de energía 27000 generaciones. El resto de los parámetros fueron tomados con los valores iniciales propuestos por el programa. El programa AutoDock genera un archivo de salida *.dlg el cual contiene las conformaciones y energías libres de unión para cada una de las corridas solicitadas. A esta información se accederá con ayuda del programa AutoDock Tool. Con éste se pueden visualizar las interacciones no covalentes y sus respectivas distancias encontradas. Los complejos tridimensionales enzima-inhibidor fueron visualizados y analizados utilizando el programa VMD.

7.2.2 SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE LAS MALEAMIDAS Y MALEIMIDAS ACETILADAS DE AMINOFENOL.

La síntesis de los compuestos fue realizada en el CICATA-IPN² siguiendo las técnicas de síntesis descritas por Trujillo, y tomando en cuenta los trabajos que le precedieron.

7.2.2.1 SÍNTESIS DE ACIDO (2Z)-4-[(4'-HYDROXIFENIL)AMINO]-4-OXOBUT-2-ENOICO

Reacción: Se hacen reaccionar cantidades equimolares de anhídrido maleico (1g = 9.16×10^{-3} mol), disuelto en THF anhidro (c.b.p. completa disolución) con el correspondiente aminofenol (4.49 g = 9.16×10^{-3} mol), disuelto en 30 ml de THF anhidro.

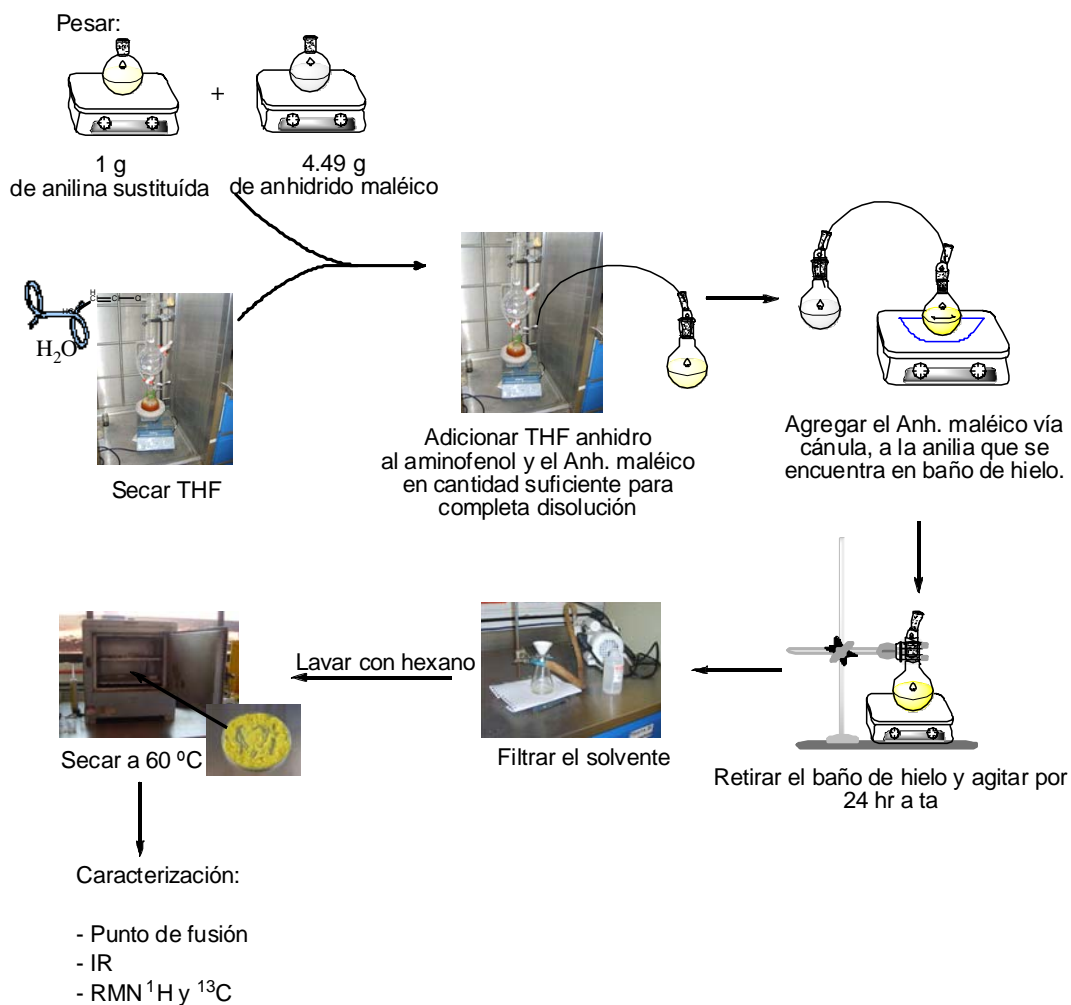


Por vía cánula se mezclan los dos compuestos previamente disueltos en THF anhidro con agitación continua por 3 horas a temperatura ambiente. El producto obtenido se filtró y se lavó con Hexano. El precipitado se secó a 50°C en la estufa. Véase esquema 1.

Apoyo estructural: La estructura de los compuestos se verificó tomando en cuenta el punto de fusión, espectroscopía por IR y resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C, para esto se utilizó Dimetil Sulfóxido Deuterado como disolvente.

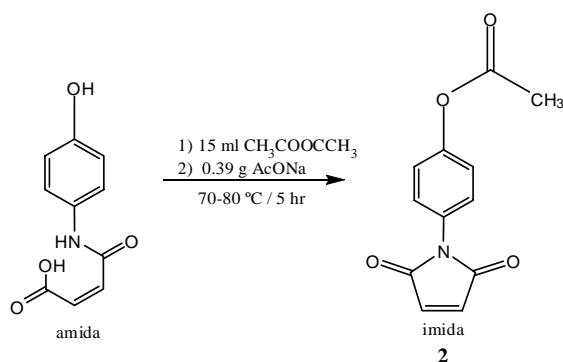
² (Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada).

ESQUEMA 1. Desarrollo experimental para la obtención de las maleamidas.



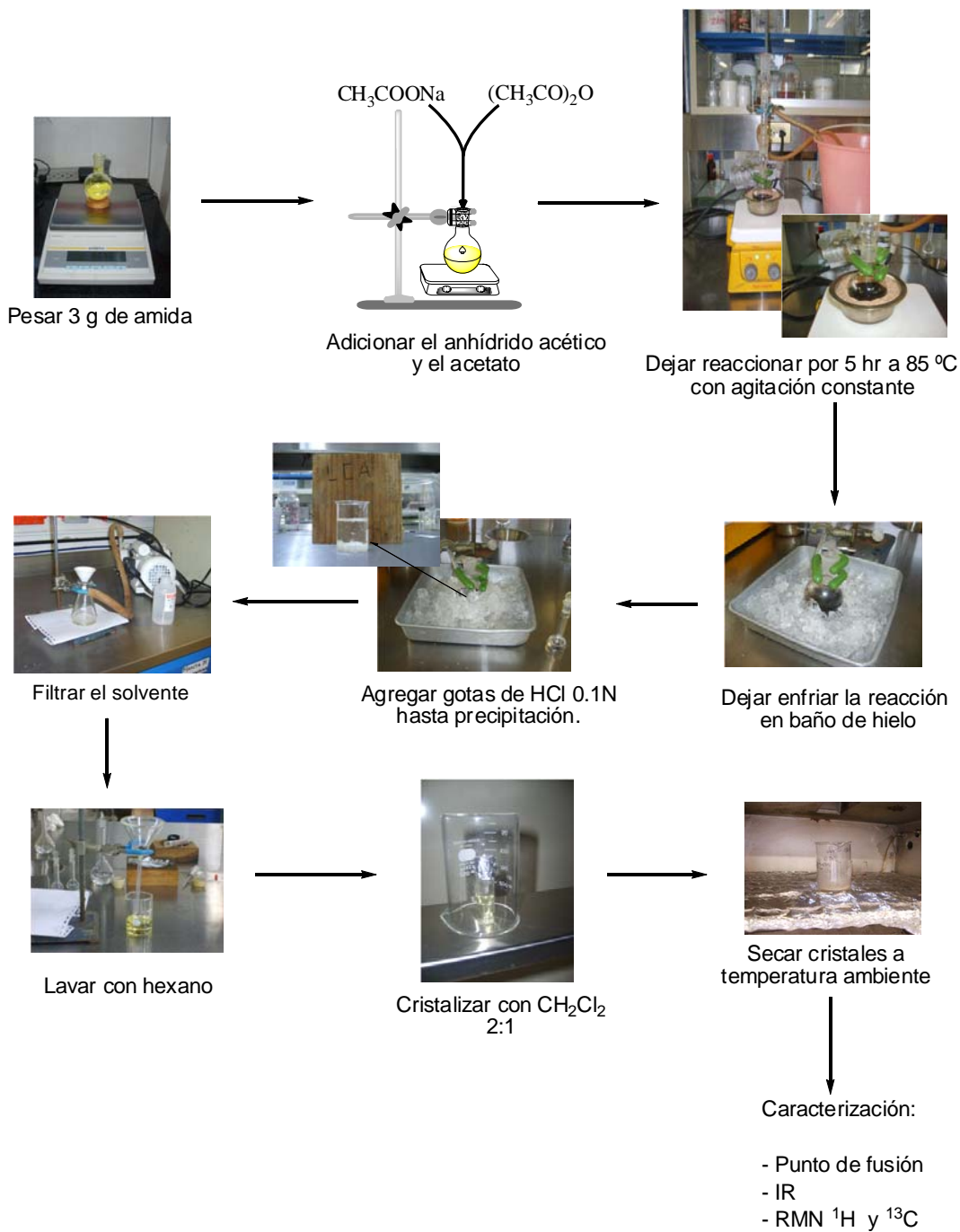
7.2.2.2 SÍNTESIS DE ACETATO DE 4-(2,5-DIOXO-2,5-DIHI-DRO-1H-PIRROL-1-IL)FENIL

Reacción: El producto acetilado se obtuvo mezclando la amida 1 ($3\text{g} = 1.44 \times 10^{-2}$) en 15 ml de anhídrido acético y 0.39 g de acetato de sodio como catalizador. La reacción se efectuó a $85\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 hr en agitación constante. El compuesto resultante se extrajo en baño de hielo y adicionando gotas de HCl 0.1N, el precipitado se filtró a vacío y se lavó con hexano mediante operaciones repetidas. El producto se cristalizó con una mezcla de cloruro de metileno (Cl_2CH_2) y hexano en una proporción 2:1, los cristales obtenidos se secaron a temperatura ambiente. **Véase esquema 2**



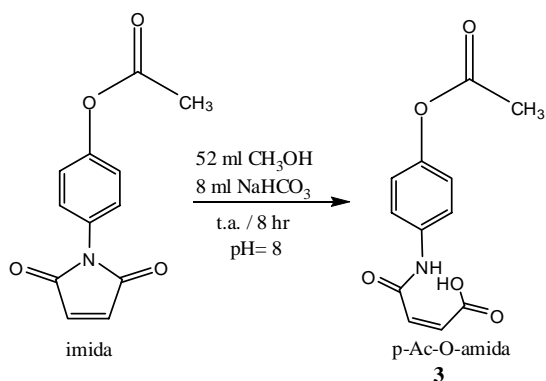
Apoyo estructural: La estructura de los compuestos se verificó tomando en cuenta el punto de fusión, espectroscopía por IR y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , para esto se utilizó Dimetil Sulfóxido Deuterado como disolvente.

ESQUEMA 2. Desarrollo experimental para la obtención de las maleimidadas.



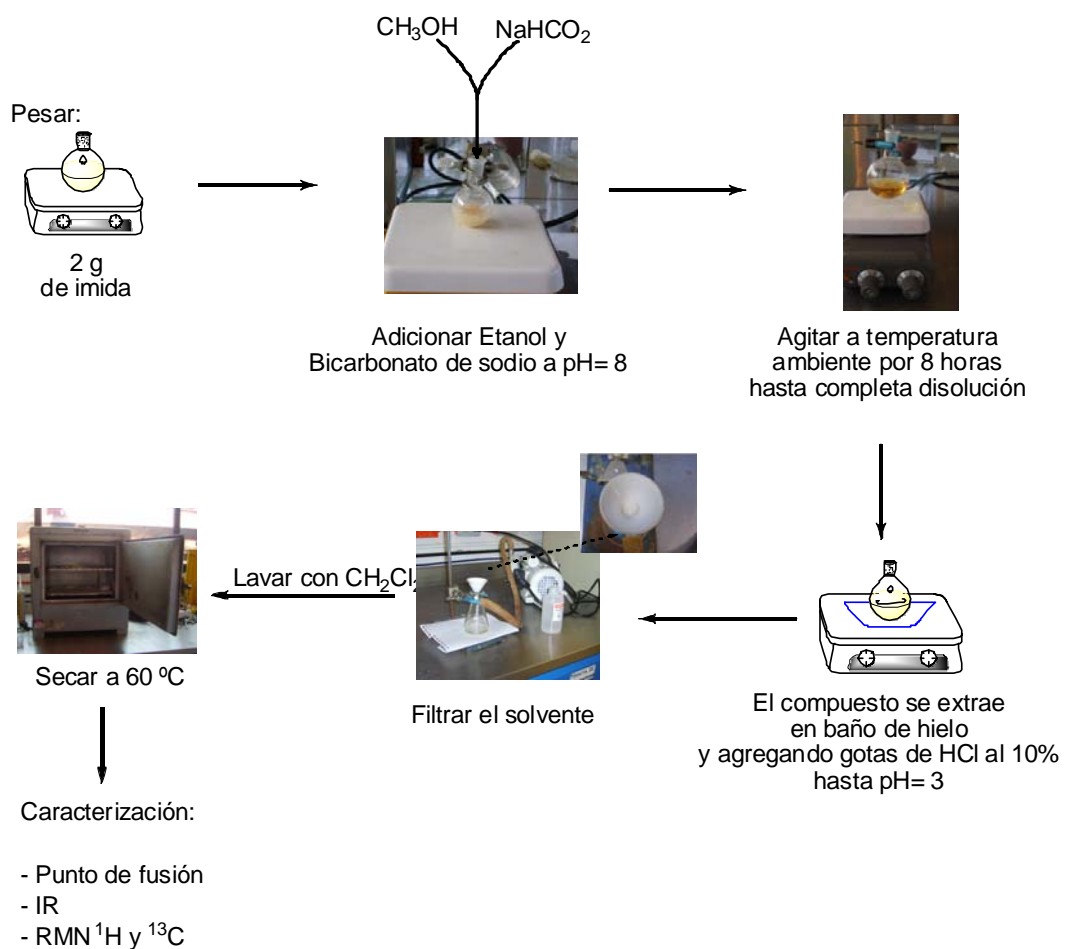
7.2.2.3 SÍNTESIS DE ACIDO (2Z)-4-[(4'-ACETOXYFENIL)AMINO]-4-OXOBUT-2-ENOICO

Reacción: La maleamida acetilada (3) se obtuvo por hidrólisis de la imida 2 (500 mg= 2.16×10^{-3}) en presencia de 52 ml de Etanol y 8ml de una disolución de bicarbonato de sodio a pH= 8. La reacción se efectuó a temperatura ambiente por 8 horas en agitación constante. El compuesto resultante se extrajo en baño de hielo y agregando gotas de HCl al 10% hasta pH= 3. El precipitado se lavó varias veces con cloruro de metileno y se secó a 50 °C en la estufa. **Véase esquema 3**



Apoyo estructural: La estructura de los compuestos se verificó tomando en cuenta el punto de fusión, espectroscopía por IR y resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C, para esto se utilizó Dimetil Sulfóxido Deuterado como disolvente. La asignación total de los espectros se llevó a cabo mediante el análisis de los espectros de correlación bidimensional ¹H y ¹³C.

ESQUEMA 3. Desarrollo experimental para la obtención de las maleamidas acetiladas.



7.2.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN ANIMALES ÍNTEGROS.

Se determinó los efectos anticolinérgicos del compuesto acetilado en 20 ratones CD₁ machos, cuyo peso osciló entre 28 y 35 g. Todos los individuos se mantuvieron en condiciones similares de temperatura, iluminación y acceso a alimento. Se administraron dosis de 1, 10, 100 y 500 mg/Kg; para la neostigmina y para el compuesto. Los ratones se dividieron en 4 grupos. Cada grupo consistía de 5 ratones (un control, un comparativo y tres experimentales).

El procedimiento consistió primeramente en la administración; vía intraperitoneal, de 10 ml/Kg del vehículo: aceite de oliva, en los ratones blanco. En seguida las diferentes dosis de neostigmina se suspendieron en un volumen de vehículo igual al administrado en el grupo control. Finalmente se administró a los diferentes grupos de ratones conforme a la dosis correspondiente. Para la amida acetilada se repitió el mismo procedimiento que la neostigmina.

A partir de la administración de los ratones, se contaron el número de contracciones abdominales que presentaron los ratones cada 5 minutos.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 DOCKING

El mecanismo de inhibición tiempo y concentración-dependiente, que da algunas veces lugar a la selectividad y a la inhibición irreversible, está relacionado con la interacción de los inhibidores con residuos específicos de la enzima, por lo que estas interacciones pueden ser un indicativo de la capacidad de un inhibidor a ser sustrato. A pesar de que el método de docking no permite observar el mecanismo cinético de inhibición, este método puede orientar sobre la afinidad y modo de unión y conducir a una posible selectividad, a través de la simulación del modo de unión. Debido a que este tipo de análisis se realizó sobre la AChE, y que el modo de unión obtenido sobre cada estructura es susceptible a variación debido a cambios en la conformación, lo ideal sería efectuar una dinámica molecular.

Para el análisis de Docking se usó la estructura tridimensional de la enzima acetilcolinesterasa, sobre la cual se evaluó a los compuestos acetilados en su sitio activo. La estructura de la enzima se encontró almacenada en el Banco de Datos de proteínas (PDB), actualmente se encuentran reportadas estructuras pertenecientes a diferentes especies, entre ellas el del ser humano. Esta última es la usada en este trabajo para el análisis correspondiente. Entre las diferencias encontradas de las acetilcolinesterasas de cada especie como *Torpedo californica*, *Electricus electrophorus* y *Homo sapiens* a través del modelado por homología se han encontrado, que solo difieren en la secuencia de algunos aminoácidos; lo cual no altera de manera importante la catálisis, inhibición o estructura de estas enzimas; sin embargo en el presente trabajo usamos la AChE humana ya que es uno de los blancos importantes en el estudio de la enfermedad de Alzheimer, entre otras enfermedades relacionadas con esta enzima.

Se sabe que los sustratos e inhibidores, al entrar en contacto con la AChE, producen cambios en la conformación de esta enzima. Posiblemente las variaciones observadas en la conformación de la enzima se deben, en gran medida, a la presencia y estructura de ligantes co-cristalizados en el sitio activo. Con la finalidad de determinar el efecto que producen las diferencias estructurales observadas sobre el docking, se aplicó este método sobre la AChE empleando como inhibidor de referencia a la Neostigmina (inhibidor irreversible). En todos los casos se realizó el método utilizando los mismos parámetros para el programa.

La elección de los sustratos elegidos para observar los diferentes estados de conformación, se basaron en investigaciones anteriores,^[16, 42, 46, 80, 93, 110] en los que se encontró que la estructura es semejante, excepto en el grupo funcional localizado en el anillo bencénico, y los cuales resultaron tener una gran afinidad por la enzima; sin embargo, resultaron ser muy tóxicos a una baja concentración.

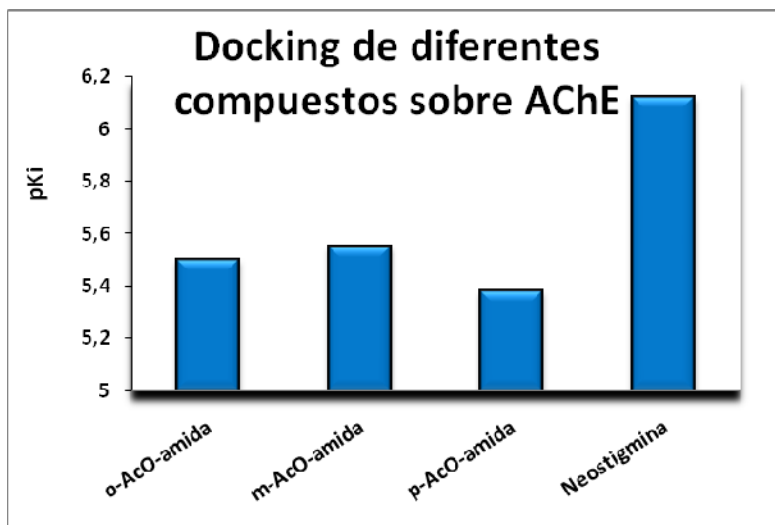
Tomando en cuenta el antecedente de los estudios relación estructura-actividad *in vitro* y por *docking* realizados previamente^[15, 110], se propuso este derivado amídico, el cual se basó en la estructura de los inhibidores de la AChE ya existente; además, se contempló un grupo electro-atractor en el anillo aromático en posiciones *orto*, *meta* y *para* al grupo amida. Adicionalmente la familia de compuestos que proviene del anhídrido maléico presentan un carbonilo α,β -insaturado. El grupo funcional seleccionado fue el acetato, el cual confiere a la molécula propiedades electrónicas, hidrofóbicas y estéricas que pueden impactar sobre su afinidad por la enzima. Para tal objeto anteriormente se valoró su actividad inhibitoria por medio de simulación molecular (*docking*), encontrando una mayor potencia inhibitoria de $K_i = 2.81 \times 10^{-6}$ M, para el compuesto sustituido en posición *meta*, el cual interactúa con el anillo aromático del Trp-86 de la AChE.

En la **Tabla 5** se muestran los resultados del Docking de los compuestos acetilados, la Neostigmina y a la acetilcolina sobre la AChE. Los resultados correspondientes a los complejos enzima-inhibidor de mínima energía, incluyen la energía libre de unión estimada (ΔG_{EI}) y el logaritmo negativo de la constante de inhibición promedio estimada (pK_i).

TABLA 5
RESULTADOS DE DOCKING

Compuesto	K_i	pK_i	Docked Energy	ΔG_{EI} (kcal/mol)
o-AcO-amida	3.19×10^{-6}	5.50	-9.83	-7.5
m-AcO-amida	2.81×10^{-6}	5.55	-9.6	-7.57
p-AcO-amida	4.14×10^{-6}	5.38	-9.46	-7.34
Neostigmina	7.58×10^{-7}	6.12	-6.93	-8.35

En la siguiente gráfica se muestra las constantes de inhibición estimadas por Docking. En este se puede observar que el compuesto *m*-AcO-amida presentó mayor afinidad por el núcleo de la enzima, comparado con el compuesto *p*-AcO-amida, el cual tuvo menor afinidad por la AChE. Así mismo, ninguno de los compuestos tuvo mayor afinidad que la Neostigmina.



Una de las causas de las variaciones encontradas con respecto a la afinidad y modo de unión, está relacionada a la variación en la conformación de los inhibidores. El método es particularmente sensible a sutiles variaciones estructurales probablemente debido a que la estructura de la enzima se considera rígida al realizar el análisis.

Otro factor a considerar son los efectos estéricos, los cuales también son importantes tanto en el reconocimiento como en la farmacocinética de los ligandos, por ejemplo un fármaco con un gran impedimento estérico no podría interactuar eficientemente en un sitio de reconocimiento estrecho, además se encontraría limitado para pasar las barreras lipídicas, sobre todo si posee cierta polaridad intrínseca. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, pareciera que el impedimento estérico no jugara un papel importante en el reconocimiento por la AChE.

Así mismo, se demostró que los compuestos interactúan en el sitio activo de la AChE. Esto puede ser debido a que ellos conservan un anillo aromático y un grupo amino, algo que tienen en común con otros inhibidores de la AChE. De acuerdo a los estudios preliminares tanto teóricos como biológicos ^[15, 110], era factible que tales compuestos interactuaran en el sitio activo de la AChE. Sin embargo, existen muy pocos trabajos que han explorado los efectos electrónicos del sitio activo de la AChE, los cuales se pueden estudiar modificando los grupos funcionales en un compuesto padre que interactúe a este nivel. El *docking* permite predecir la

estructura de los complejos ligando-AChE, lo cual experimentalmente podría lograrse con rayos X, para esto se requiere que la proteína sea cristalizada junto con el ligando.

El análisis entre las cadenas laterales de los aminoácidos de la AChE y los respectivos inhibidores se llevó a cabo tomando en cuenta el pH en el que se encuentran las enzimas en el organismo, el cual es un pH fisiológico. Lo anterior permite determinar las interacciones que se presentan entre el fármaco y los residuos de los aminoácidos cercanos a este. Para cada complejo, solo se visualizan los residuos de la enzima que se encuentran a una distancia menor a 10 Å del inhibidor o neurotransmisor, por lo que estos pueden presentar interacciones no covalentes. Para validar las simulaciones se determinaron los estudios de interacción para ACh y neostigmina, estos se describen a continuación.

8.1.1 INTERACCIÓN ACh CON AChE

Como podemos observar en la **Figura 26**, el sustrato de la acetilcolinesterasa interactúa con los principales 5 sitios activos de la enzima, los cuales son:

- El sitio esterático (ES) localizado en la base de la garganta, formando la triada catalítica Ser³³⁶, His⁴⁴⁷, Glu³³⁴, en el hidroxilo de la serina interactúa el nitrógeno cuaternario de ACh, por medio de enlaces de hidrógeno.
- El sitio de unión a grupos acilo (ABS) está conformada por Phe²⁹⁷, Phe²⁹⁵ y Phe³³⁸, las cuales tienen una interacción con la Tyr³³⁷ del tipo π - π . Lo anterior favorece a que la Tyr³³⁷ tenga una fuerte interacción con el grupo éster de la ACh del tipo π - π .
- El saco oxianiónico (OH) Gly¹²¹ y Gly¹²², que estabiliza el intermediario tetraédrico.
- El sitio aniónico para unión de sustratos (AS) Trp⁸⁶, Glu²⁰² y Tyr¹³³, donde el amonio cuaternario de ACh se une a través de una interacción preferencial del nitrógeno cuaternario con los electrones π del grupo aromático del Trp⁸⁶, así mismo hay una interacción iónica con los residuos Glu²⁰² y Tyr¹³³ y el amonio cuaternario de la acetilcolina.
- El sitio activo de unión selectiva a grupos aromáticos (AACS) que es contiguo o cercano a ES y AS que es importante para la unión de sustratos arilo y de ligandos del sitio activo.

Además, la enzima tiene un sitio aniónico periférico (PAS) conformado por Trp²⁸⁶, Tyr¹²⁴, Tyr⁷² y Asp⁷⁴, los cuales se encuentran a una distancia de 7.06 Å del inhibidor; así mismo, es el lugar por donde entra el sustrato.

El promedio general de la distancia entre la ACh y los residuos de la enzima es de 3.6 Å. Como se puede ver, los datos se acercan a los reportados en la literatura. Esto se debe a que los datos de la literatura basan sus estudios a través de la enzima AChE de la especie *Torpedo californica*, mientras que en el presente trabajo se usó la AChE de la especie *Homo sapiens*. Por lo tanto observamos que los residuos de aminoácidos ocupan una posición diferente dentro de la enzima, sin afectar de manera drástica al sitio catalítico.

8.1.2 INTERACCIÓN NEOSTIGMINA CON AChE

Se sabe que la AChE hidroliza a la Neostigmina^[43], ya que contiene un grupo carbamoilo, pero este proceso es más lento para hidrolizar a la ACh. La amina cuaternaria se encuentra como catión a pH fisiológico, por lo tanto el ataque del centro activo por el hidroxilo de la Ser²⁰³ origina la enzima carbamoilada. La mitad carbamoilo reside en el saco acilo definido por las Phe³³⁸, Phe²⁹⁵ y Phe²⁹⁷. El secuestro de la enzima en su forma carbamoilada impide, por tanto, la hidrólisis de la ACh catalizada por la enzima durante periodos prolongados. Véase **Figura 27**

8.1.3 INTERACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ACETILADOS CON LA AChE

En las **Figuras del 28 a la 30** se ilustran a las amidas con un grupo éster en diferentes posiciones del anillo aromático sobre la AChE. Se observa que los 3 compuestos propuestos actúan en la base de la garganta (triada catalítica) y el subsitio aniónico como lo hace el sustrato de la enzima, cuya interacción es con el Trp⁸⁶, sugiriendo que las moléculas entran a la garganta por el lado del anillo aromático. Los estudios de *docking* mostraron que los 3 compuestos tienen afinidad sobre la AChE, así mismo las interacciones que se observan son principalmente puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals con el Trp⁸⁶ y Ser²⁰³ de AChE. Aunque cabe señalar que las interacciones que predominaron fueron las π - π entre los anillos aromáticos de los compuestos y el de los triptofanos de la AChE. Esto significa, que son las interacciones que dan más estabilidad a los complejos. Lo anterior se sostiene, dado que los compuestos tienen carbonos sp^2 en la región amídica y por lo tanto son más afines sobre la

AChE. Como grupo testigo se eligió la Neostigmina, ya que guarda una estrecha relación estructural (como se muestra en la **Figuras 27**) con los compuestos acetilados.

Los resultados de Docking de estos 3 compuestos acetilados muestran que adoptan un modo de unión similar a los de sus predecesores previamente reportados. El hecho es que los compuestos se encuentran enterrados en el sitio activo, lo que contribuye a la estabilización del complejo enzima-receptor. El anillo aromático es rico en electrones π , esto les confiere la posibilidad de tener un mayor contacto con los residuos aromáticos; sin embargo la posición que adopta los grupos funcionales del anillo en el espacio determina que tan grande será el contacto con el anillo. Por lo tanto el reconocimiento principal entre el ligando y su receptor está dada por interacciones π - π con el Triptófano 86 del sitio aniónic; esto se observa con las distancias promedio obtenidas de los residuos de aminoácidos que tienen mayor contacto con los compuestos, de tal forma que el compuesto que presenta mayor afinidad hacia la enzima, es el inhibidor m-AcO-amida con una distancia de 2.6 Å, le sigue el compuesto o-AcO-amida con una distancia de 2.59 Å, y finalmente el compuestos p-AcO-amida con una distancia de 3.55 Å.

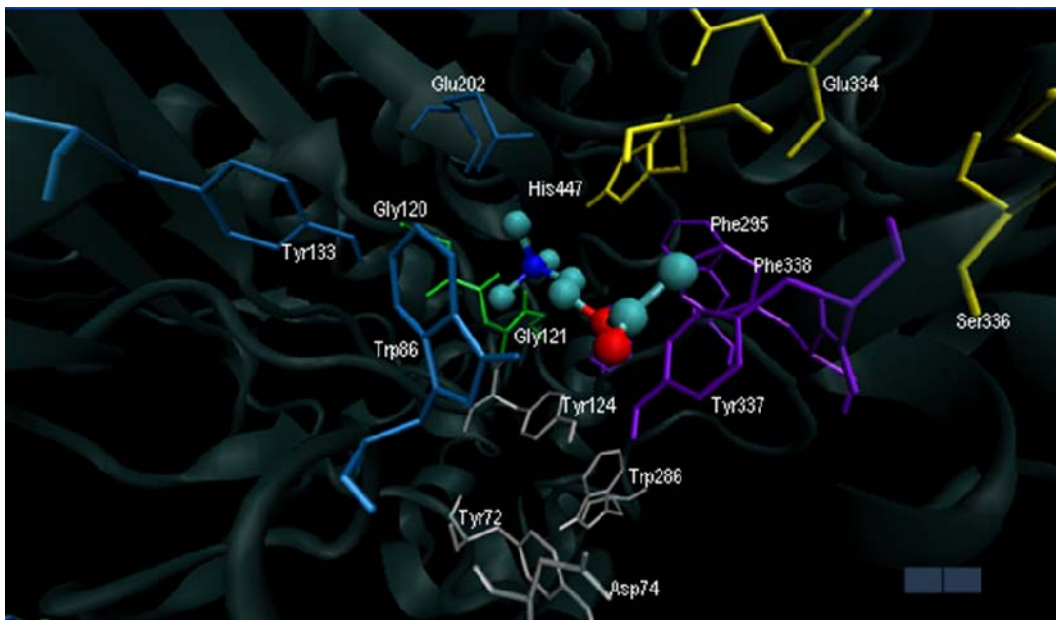
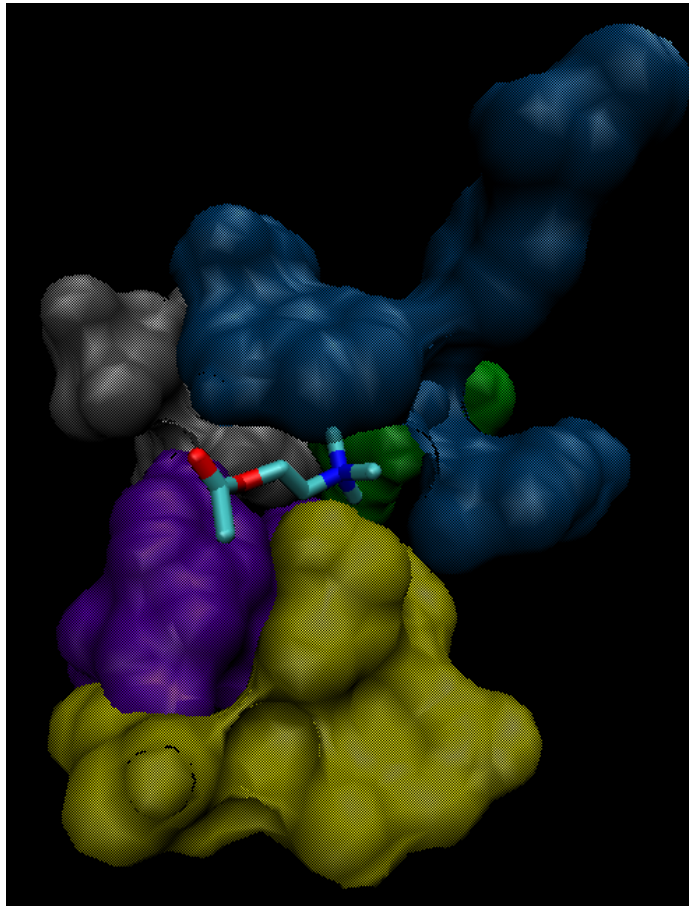


Figura 26: A. (Arriba) Estructura tridimensional de AChE, de la especie *Homo sapien*, mostrando los sitios principales de unión con la ACh. El ABS se representa en color violeta, el ES se representa en color amarillo, el AS se representa en color azul, el OH se representa en color verde y el PAS se representa en color gris. B. (Abajo) Principales aminoácidos de la AChE que interactúan con la ACh.

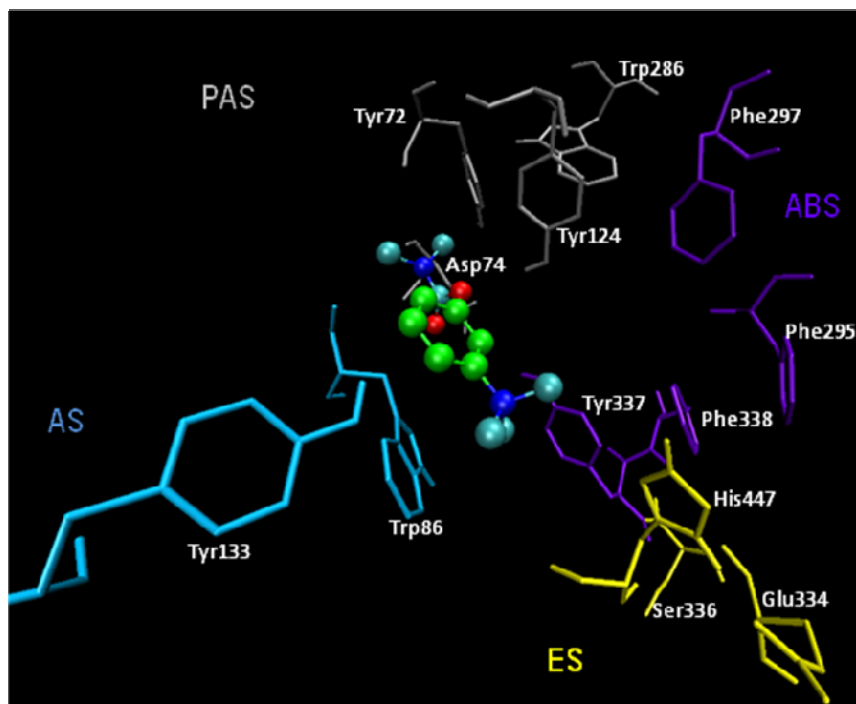


Figura 27: Interacción de la Neostigmina con el núcleo de la AChE.

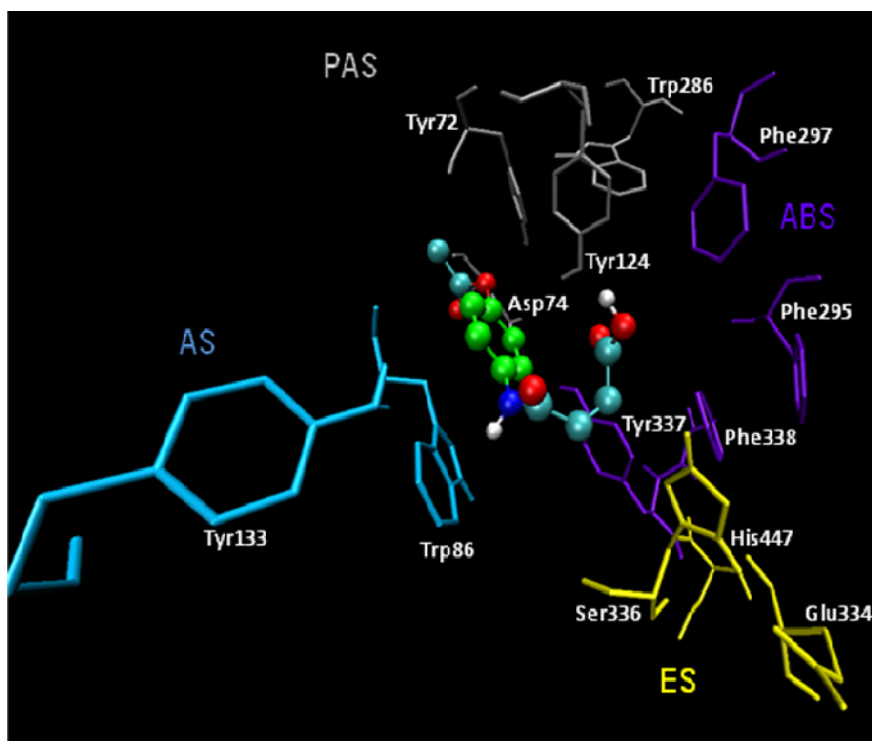


Figura 28: Interacción de la *p*-AcO-amida con el núcleo de la AChE.

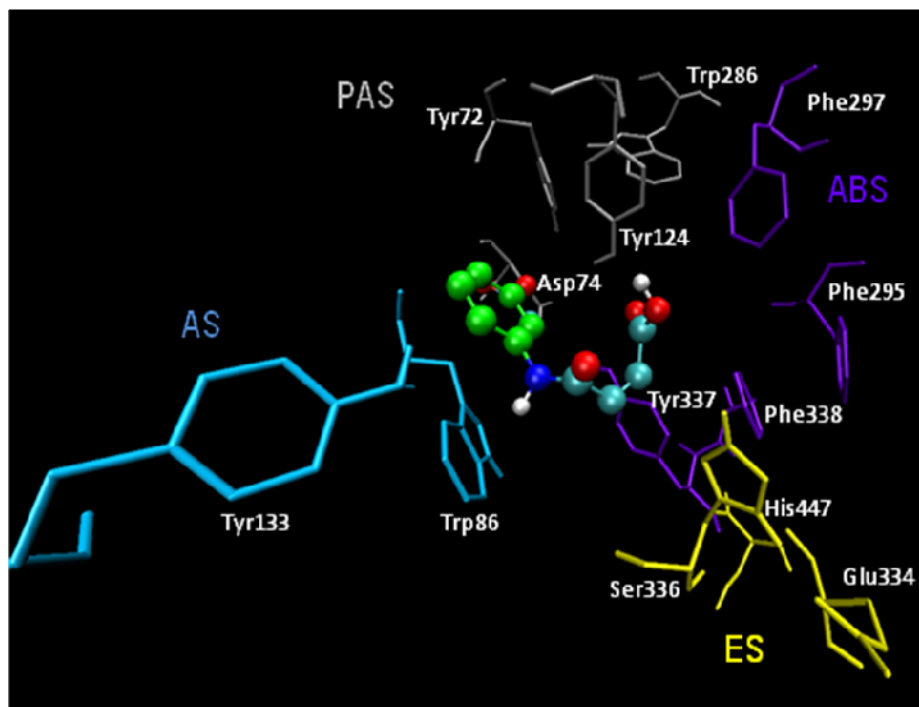


Figura 29: Interacción de la *m*-AcO-amida con el núcleo de la AChE.

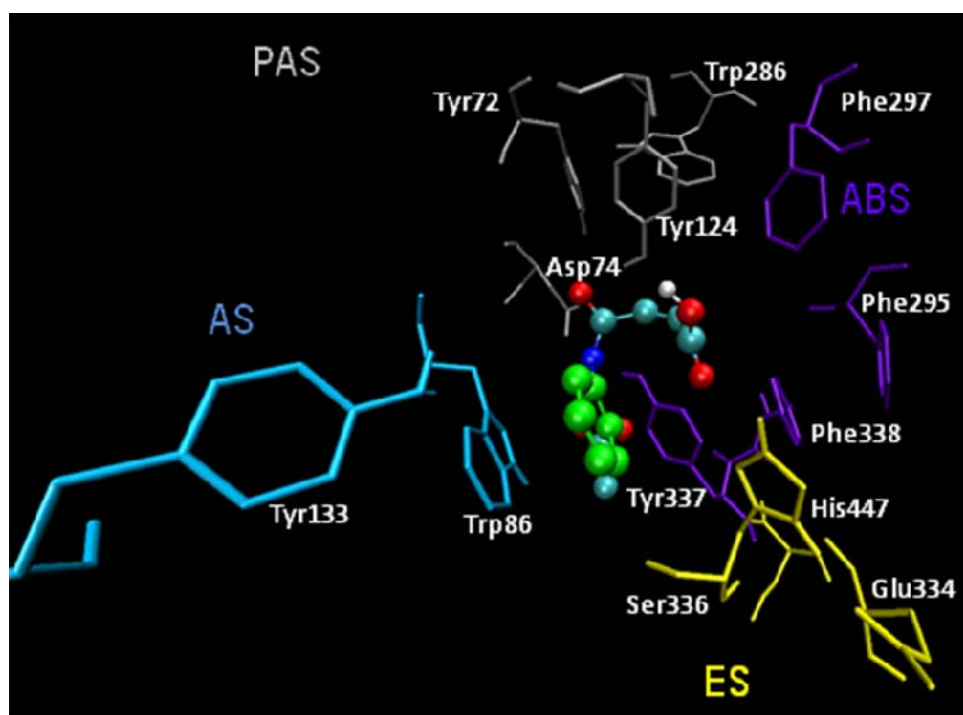


Figura 30: Interacción de la *o*-AcO-amida con el núcleo de la AChE.

8.1.4 ANÁLISIS DEL DOCKING.

Se demostró que los compuestos interactúan en el sitio activo de la Acetilcolinesterasa. Esto puede ser debido a que ellos conservan un anillo aromático y un nitrógeno, algo que tienen en común con otros inhibidores de las ChEs (Véase **Figura 27**). Como se puede ver, los estudios teóricos evidenciaron que el compuesto sustituido con el electro-atractor AcO-amidas en *meta* (Véase **Figura 29**) es el más potente, por efecto inductivo. Así mismo se observa que los tres compuestos acetilados efectuaron una unión que pudiese ser interpretada como irreversible con la histidina o de muy alta afinidad, unión que se suma a las interacciones π - π entre el anillo aromático de los compuestos y el Trp-84 de la AChE y puentes de hidrógeno entre el éster de la amida y la Ser-125 de la misma enzima lo que le confiere mayor afinidad. Además las amidas tienen menos grados de libertad lo que les confiere un menor número de contactos con los residuos de la base de la garganta.

Por otro lado, la AChE es más afín por el compuesto en posición meta y orto. De acuerdo a los resultados se puede sugerir que los compuestos electroattractores cercanos a la amida fueron más afines sobre la AChE. Lo anterior provee de herramientas para efectuar un diseño racional de fármacos inhibidores de estas enzimas de una forma integral, e incrementar las potencias de inhibición, proponiendo fármacos que contengan grupos electroattractores a la vez, generando regiones químicas que incluyen en la geometría y el fenómeno electrónico, el cual es fundamental para el reconocimiento fármaco-receptor, sin embargo, no es el único parámetro a evaluar. Existe evidencia de que la afinidad de los compuestos sobre tales enzimas también depende del tamaño molecular, ya que los inhibidores de pequeño tamaño son más eficientes sobre la AChE. Esto ha sido confirmado por trabajos teóricos (*docking*) y experimentales, en donde se dimerizó la tacrina (un inhibidor de AChE) encontrando que un monómero interactúa en el subsitio aniónico (Trp 84) mientras que el otro interactúa con la Phe 278, la cual está ubicada en el labio de la garganta. De esta forma se demuestra que el cribado o cernimiento mediante estudios de *docking*, además de ilustrar el complejo de reconocimiento ayuda a predecir los mejores fármacos, ya que con los datos experimentales tienen una alta correlación. Una vez efectuada la evaluación teórica, se sugirió sintetizar el compuesto *m*-AcO-amida; sin embargo, la síntesis de este compuesto y el del *o*-AcO.amida presentó dificultades químicas, por lo que se sintetizó únicamente el compuesto *p*-AcO-amida.

8.2 SÍNTESIS.

Cabe mencionar que a pesar de que el compuesto *m*-AcO-amida tuvo mayor afinidad por la AChE, la síntesis llevada a cabo fue del compuesto *p*-OAc, debido a la dificultad de obtener el compuesto *m* sustituido.

La síntesis de la amida (1) e imida (2) se realizó con resultados satisfactorios, ya que los porcentajes de rendimiento son altos, lo que indica que la ruta de síntesis es adecuada, además de ser un procedimiento relativamente sencillo y rápido; y la pureza que se logró en la mayoría de los casos fue eficiente, ya que las variaciones en los puntos de fusión obtenidos no fue mayor de 3°C. La síntesis de la amida acetilada (3) descrita se realizó con resultados poco satisfactorios, ya que los porcentajes de rendimiento son bajos, lo que indica que la ruta de síntesis es muy sensible al cambio de pH, de tal manera que la pureza fue afectada de igual manera. **Tabla 6**

Tabla 6
RENDIMIENTO Y PUNTO DE FUSIÓN DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

Compuesto	Rendimiento	Punto de fusión (°C)	Solubilidad	Color del sólido
1	99%	190-194	Etanol, acetona, DMSO	Amarillo
2	95%	149-151	Cloruro de metileno, Acetato de Etilo, Cloroformo.	Beige
3	41%	176-180	Etanol, acetona, DMSO	Nacarado

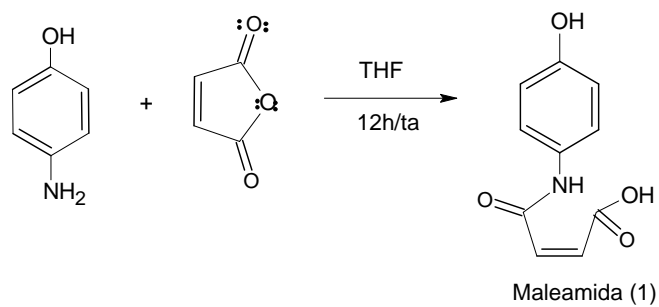
La obtención de la amida se hizo en condiciones controladas; es decir, en un ambiente anhidro para que ningún otro factor alterara el rendimiento; así mismo, al hacer reaccionar el *p*-aminofenol con el anhídrido maléico, las primeras 8 horas la reacción fue a bajas temperaturas para que la reacción fuera dirigida (quimioselectiva), y obtener por lo tanto un alto rendimiento como se mostró en la Tabla 6. La purificación del compuesto **1** fue sencilla debido que es insoluble en THF, y precipitó rápidamente, se lavó con hexano para quitar exceso de Anhídrido maléico remanente.

El siguiente punto relevante en este trabajo es la ciclización del ácido maleámico para dar la imida correspondiente. En esta parte de la síntesis el disolvente fue el anhídrido acético, el cual fue elegido ya que establece condiciones de reacción suave que hacen posible obtener el producto aislado con rendimientos en el intervalo de 70-90% y el acetato de sodio anhidro como catalizador; es importante recalcar y aunque el objetivo no fue la obtención de la isomaleimida, que durante la reacción se obtiene este como intermediario, donde el paso entre la isomaleimida y la maleimida es muy lento, por lo que se necesitó proporcionar mayor energía y la presencia del catalizador que ayudó su obtención en un tiempo corto y con un alto rendimiento. Bajo dichas condiciones, con el sustrato se obtuvo el producto acetilado (el grupo éster) para la maleimida. La purificación del compuesto **2** fue a través de una cristalización, utilizando hexano/CH₂Cl₂ (1:1); ya que la molécula no contiene ningún grupo polar fue posible disolverla en cloruro de metileno.

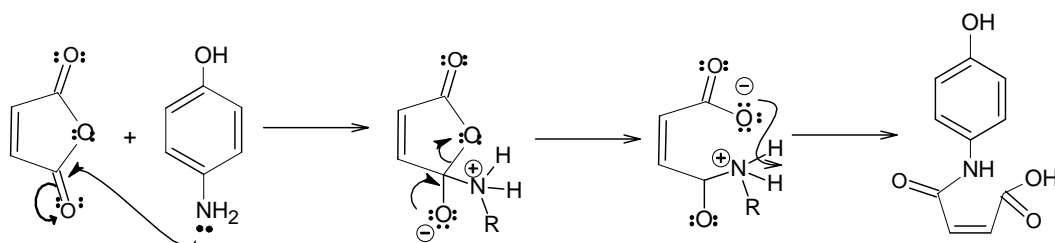
La última reacción para la obtención del compuesto **3** se realizó en un medio alcalino suave; es decir, de pH= 8, con el efecto de hidrolizar selectivamente la imina, generando la maleamida acetilada, este último paso es muy sensible al efecto del pH, esto se debe a que la molécula contiene protones ionizables y por consiguiente una carga dependiente del pH. Por tal motivo la purificación del compuesto tomó como base los pKa de los grupos funcionales tales como Ar-OH (10.1) y maleamida (2.1), con las constantes anteriores tomadas de la bibliografía^[8] se deduce que a pH menor de 2.1 y/o mayor de 10.1 se obtendrá el compuesto **1** y no el **3** como se desea, mientras que si el medio se encuentra entre 2.1 y 3 obtendremos una mezcla entre el compuesto **1** y **3**, los cuales son difíciles de separar por ser ambos solubles en solventes polares.

En base a las investigaciones previamente realizadas en el laboratorio, se propone los mecanismos de reacción, que dan lugar al compuesto de estudio que atañe en este trabajo. Este grupo de inhibidores de AChE se les han realizado las pruebas biológicas correspondientes, las cuales discutiremos más adelante.

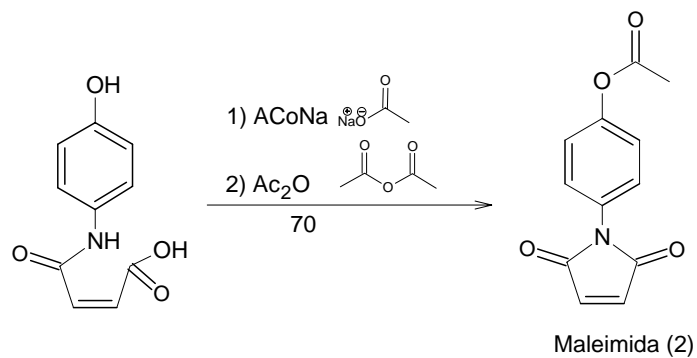
1era Reacción



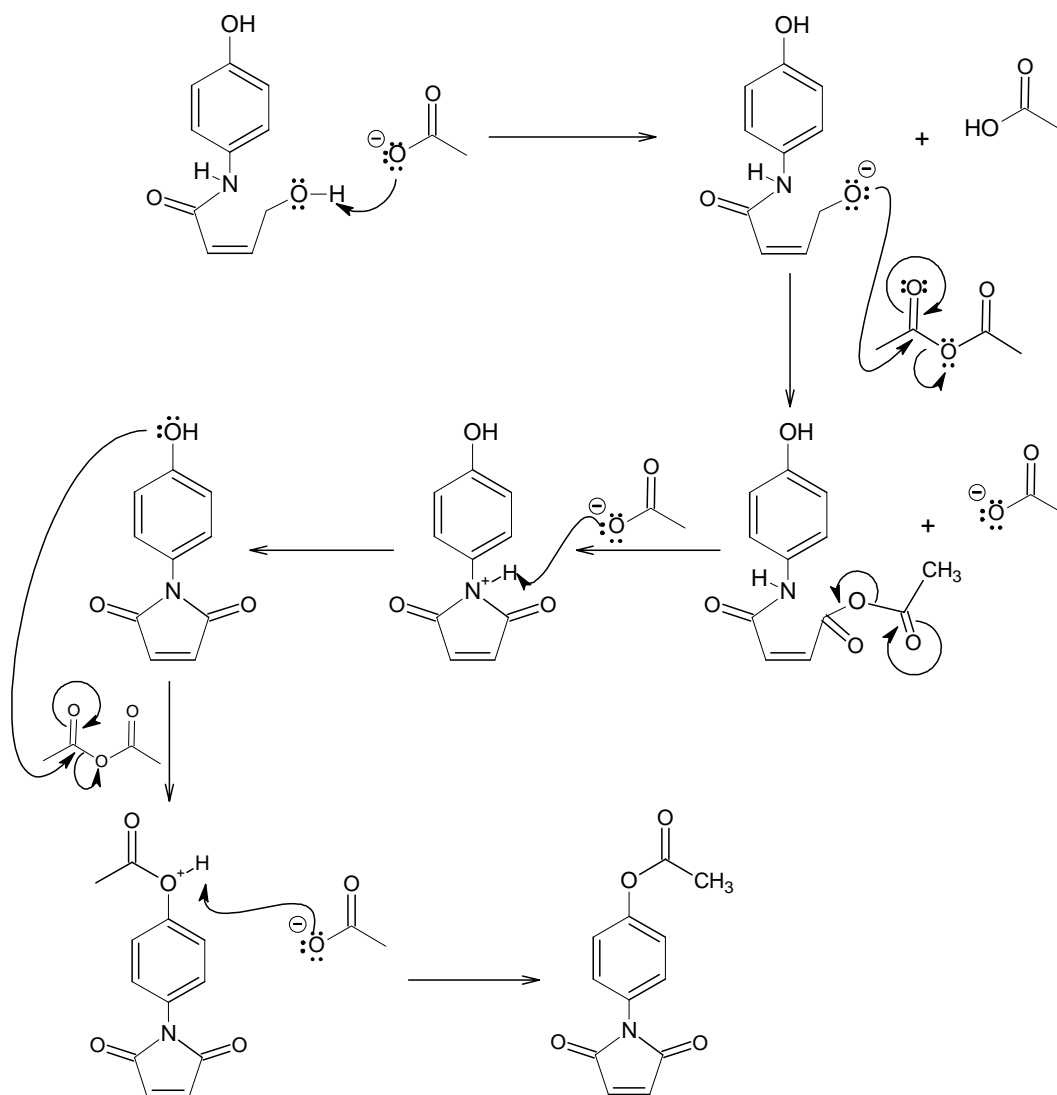
Mecanismo de reacción



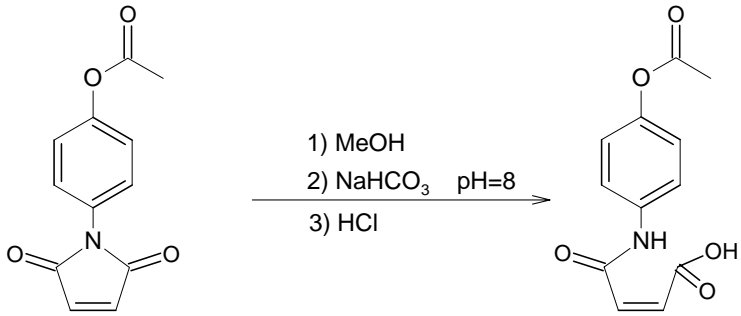
2da Reacción



Mecanismo de reacción

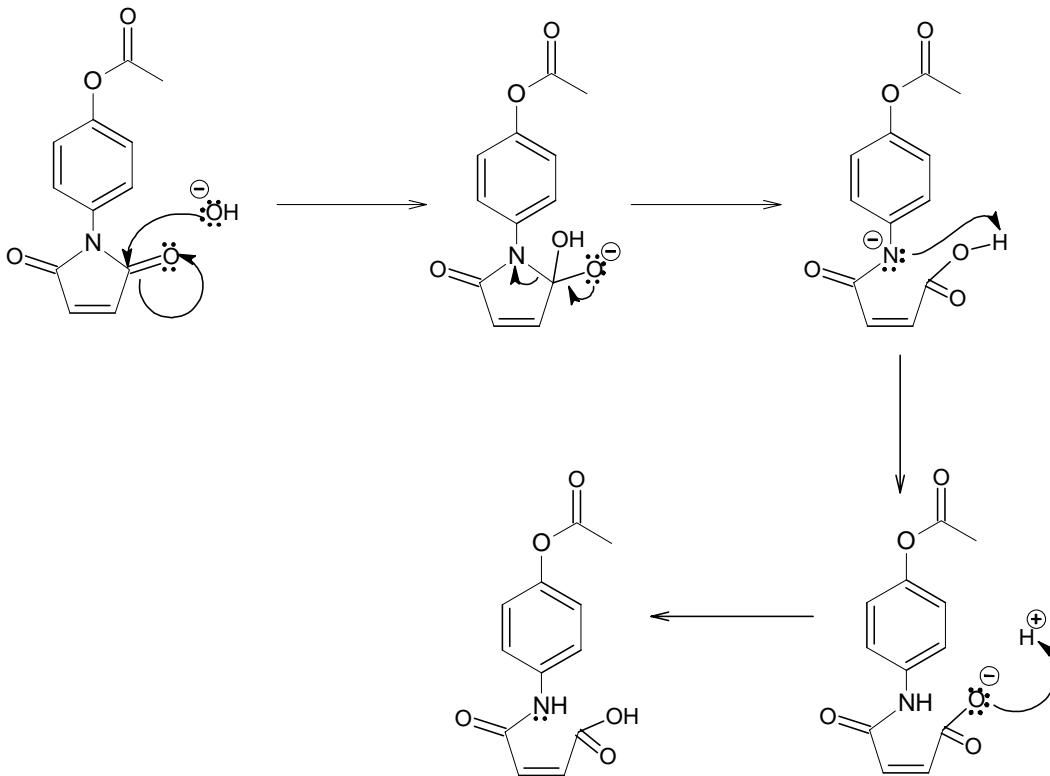


3er Reacción



Maleamida acetilada (3)

Mecanismo de reacción



8.2.1. CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA INFRARROJA.

En la caracterización por IR se obtuvieron para las amidas las señales correspondientes al carbonilo de la amida, se observa en 1662cm^{-1} y de $1699\text{-}1700$ para el ácido carboxílico, la señal correspondiente para N-H de la amida secundaria se observa entre $3200 - 3500\text{ cm}^{-1}$, y la señal del anillo aromático en 1550 cm^{-1} (Tabla 7). Después de la caracterización por IR se realizó el estudio de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C para todos los compuestos. En las Figuras del 1 al 3, se muestran los espectros de cada compuesto.

Tabla 7

Datos arrojados por Espectroscopia Infrarroja.

Compuesto	IR KBr cm^{-1}				
	OH	NH	O=C-OH Amida	C=O Imida	OAc
1c	3400	3200	1699	1625	--
2c	--	--	--	1707	1755
3c	--	(N-C) 1233	1734	1630	1734

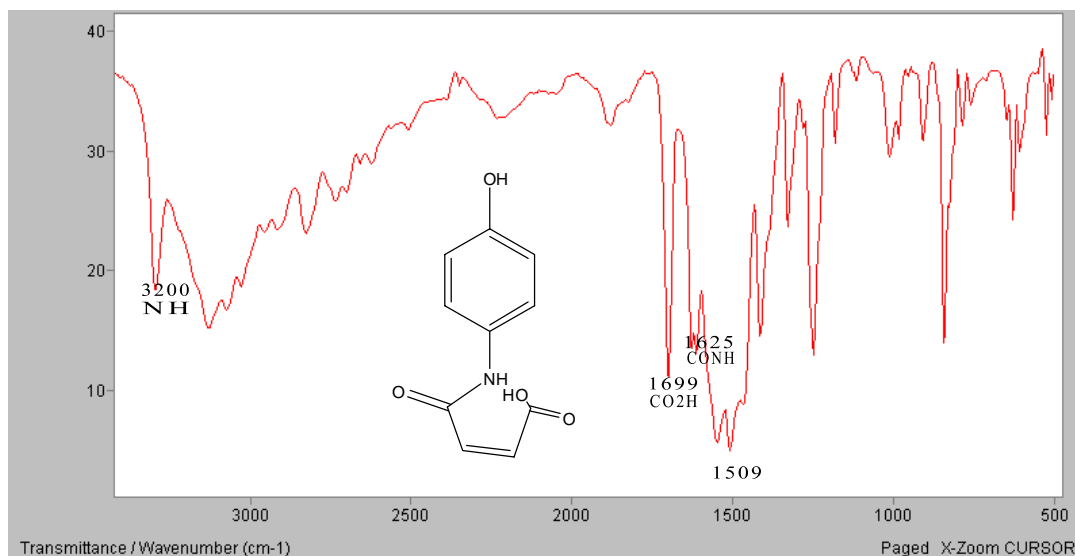


Figura 1: Espectro de IR del Acido (2Z)-4-[(4'-hydroxyfenil)amino]-4-oxobut-2-enoico.

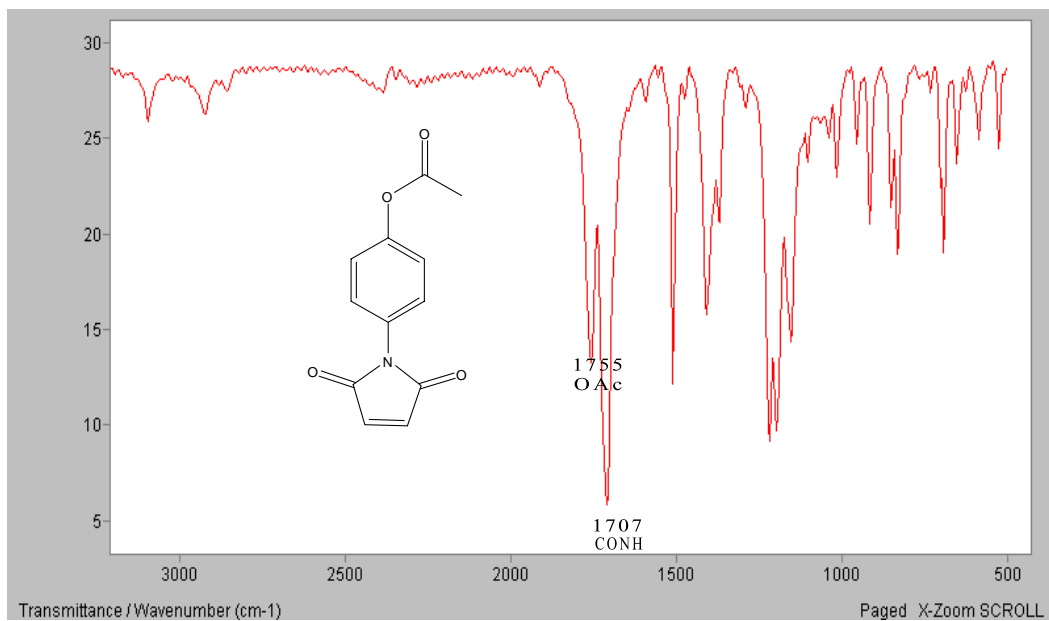


Figura 2: Espectro de IR del Acetato de 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)fenil.

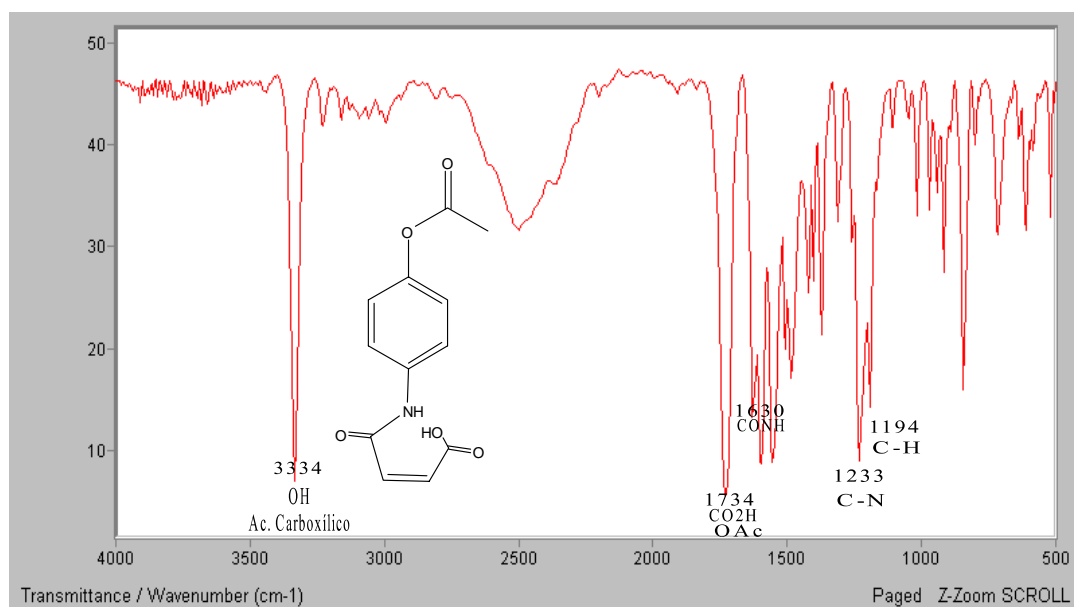


Figura 3: Espectro de IR del Síntesis de Acido (2Z)-4-[(4'-acetoxyfenil)amino]-4-oxobut-2-enoico.

8.2.2. CARACTERIZACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los resultados obtenidos de espectroscopia de RMN sugieren que el proceso de síntesis propuesto produjo los compuestos diseñados. Los siguientes figuras (1-3) muestran los desplazamientos químicos obtenidos en la RMN de ^{13}C y de ^1H respectivamente para las amidas e imidas sintetizadas. Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear para todos los compuestos. Para los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H , la asignación de las señales correspondientes a los hidrógenos que se encuentran en la región aromática del compuesto, se llevó a cabo, basándose en los efectos inducidos por los sustituyentes sobre la señal del benceno utilizando la siguiente fórmula:

$$\delta_{\text{H}} = 7.27 - \Sigma \text{ efectos}$$

Por otra parte, para asignar las señales correspondientes a los carbonos en el espectro respectivo de RMN de ^{13}C , nos apoyamos en el cálculo de los efectos inducidos por los sustituyentes sobre el desplazamiento de la señal de los carbonos del benceno, utilizando la fórmula siguiente:

$$\delta_{\text{C}} = 128.5 - \Sigma \text{ efectos}$$

Para poder aplicar las dos fórmulas anteriores en las **Tablas 8 y 9** se muestran los valores utilizando para cada sustituyente del espectro de ^1H y de ^{13}C respectivamente.

Tabla 8
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS INDUCIDOS POR DIFERENTES SUSTITUYENTES
(PPM) SOBRE LA SEÑAL RMN DE ^1H DEL BENCENO

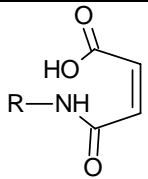
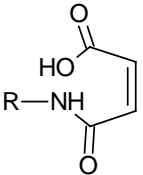
Grupo	δ_{Orto}	δ_{Meta}	δ_{Para}
	-0.38	-0.07	+0.17
-OAc	+0.21	+0.02	+0.12

Tabla 9
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS INDUCIDOS POR DIFERENTES SUSTITUYENTES
(PPM) SOBRE LA SEÑAL RMN DE ^{13}C DEL BENCENO

Grupo	δ_{Ipsa}	δ_{Orto}	δ_{Meta}	δ_{Para}
	9.7	-8.1	0.2	-4.4
-OAc	22.4	-7.1	0.4	-3.2

La asignación total de los espectros se llevó a cabo mediante el análisis del efecto de los sustituyentes en los desplazamientos químicos ($\Delta\delta$), multiplicidad, constantes de acoplamiento ($J_{\text{H-H}}$ y $J_{\text{C,H}}$) y por análisis de los espectros de correlación bidimensional de desplazamientos químicos ^{13}C - ^1H . La asignación de los espectros de RMN de ^1H de la maleamida, isomaleimida y maleimida se describen en la **Tabla 10**. En la **Tabla 11** se indican los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de las series respectivas. En las maleamidas acetiladas, los protones H-2 y H-3 en los fragmentos vinílicos se observan como un sistema AB en el espectro de RMN ^1H . La constante de acoplamiento de esta serie es característica y presenta un valor de 12 Hz. Se sabe que el desplazamiento químico de los protones H-2 y H-3 es prácticamente insensible al efecto de los sustituyentes en el anillo aromático y absorben en 6.30 ± 0.14 ppm. La asignación de los carbonos vinílicos se llevó a cabo mediante los espectros de correlación bidimensional de desplazamientos químicos ^{13}C - ^1H en la tabla 6 la señal de C-3 aparece a campos bajos que la debida a C-2. Los carbonos vinílicos C-2 y C-3 absorben en 131.0 ± 0.9 . Las constantes de acoplamiento a un enlace (1J) se indican a continuación:

$$^1J_{\text{C-3,H-3}} \quad ^1J_{\text{C-2,H-2}}$$

$$\text{Maleamida} \quad 132 \pm 2 \text{ Hz} \quad 131 \pm 3 \text{ Hz}$$

Los carbonos cuaternarios C-1 y C-4 de los grupos carboxilo y amida respectivamente se asignaron tomando en consideración sus desplazamientos químicos característicos. De esta forma la señal debida al grupo carbonilo de la amida (C-4) se encuentra desplazada a campos bajos, y por consecuencia el grupo carbonilo del ácido carboxílico (C-1) se encuentra desplazada a campos altos.

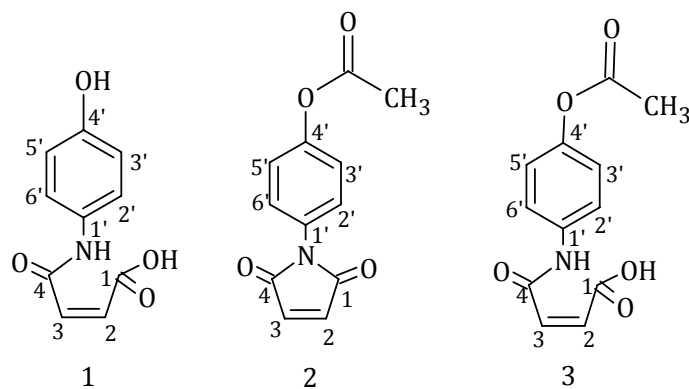
$$\text{C-1} \quad \text{C-4}$$

$$\text{Maleamida} \quad 164 \pm 0.5 \text{ ppm} \quad 167.8 \pm 0.2 \text{ ppm}$$

En la serie de las maleimidas los protones vinílicos absorben como una señal simple en 6.79 ± 0.04 ppm (tabla 5). En el espectro de RMN de ^{13}C los carbonos vinílicos equivalentes absorben en 134.7 ± 0.4 ppm (tabla 6). Para la asignación de los anillos aromáticos tanto de las maleamidas como de las maleimidas, los compuestos 1-3 se agruparon de acuerdo a su patrón de sustitución. Las constantes de acoplamiento ($J_{\text{H-H}}$) de los protones aromáticos se encontraron dentro de los intervalos característicos: $J_{\text{orto}} = 7$ a 9 Hz, $J_{\text{meta}} = 2$ a 3 Hz, $J_{\text{para}} = 1$ Hz

Tabla 10

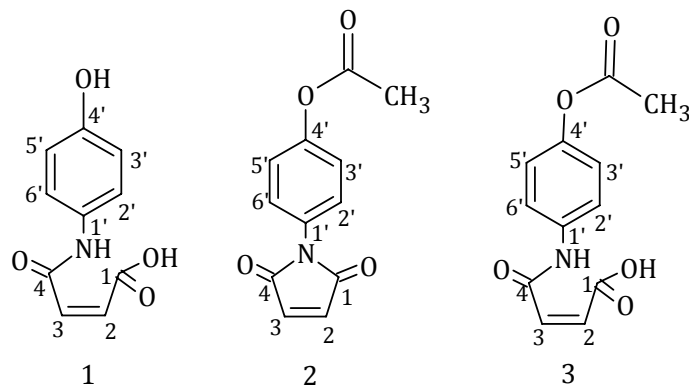
Desplazamientos Químicos en RMN de ^1H de las Maleamidas y Maleimidias respectivamente.



No.	H-2	H-3	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'	NH	OAc
1	6.45 (d)	6.31 (d)	7.44 (d)	6.74(d)	--	6.47 (d)	7.44 (d)	10.43 (s)	-
2	6.79 (s)	6.79 (s)	7.16 (d)	7.34 (d)	--	7.34 (d)	7.16 (d)	-	2.26 (s)
3	6.30 (d)	6.44 (d)	7.0 (d)	7.6 (d)	--	7.6 (d)	7.0 (d)	10.44	2.23 (s)

Tabla 11

Desplazamientos Químicos en RMN de ^{13}C de las Maleamidas y Maleimidias respectivamente.



No.	C-1	C-2	C-3	C-4	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	OAc
1	163.41	131.88	132.44	167.03	130.25	122.20	118.83	154.80	118.83	122.20	--
2	169.43	134.30	134.30	169.43	128.82	127.83	122.37	149.88	122.37	127.83	169.19/21.17
3	164	131	132.5	167.8	137	123	121	147	121	123	169/21.5

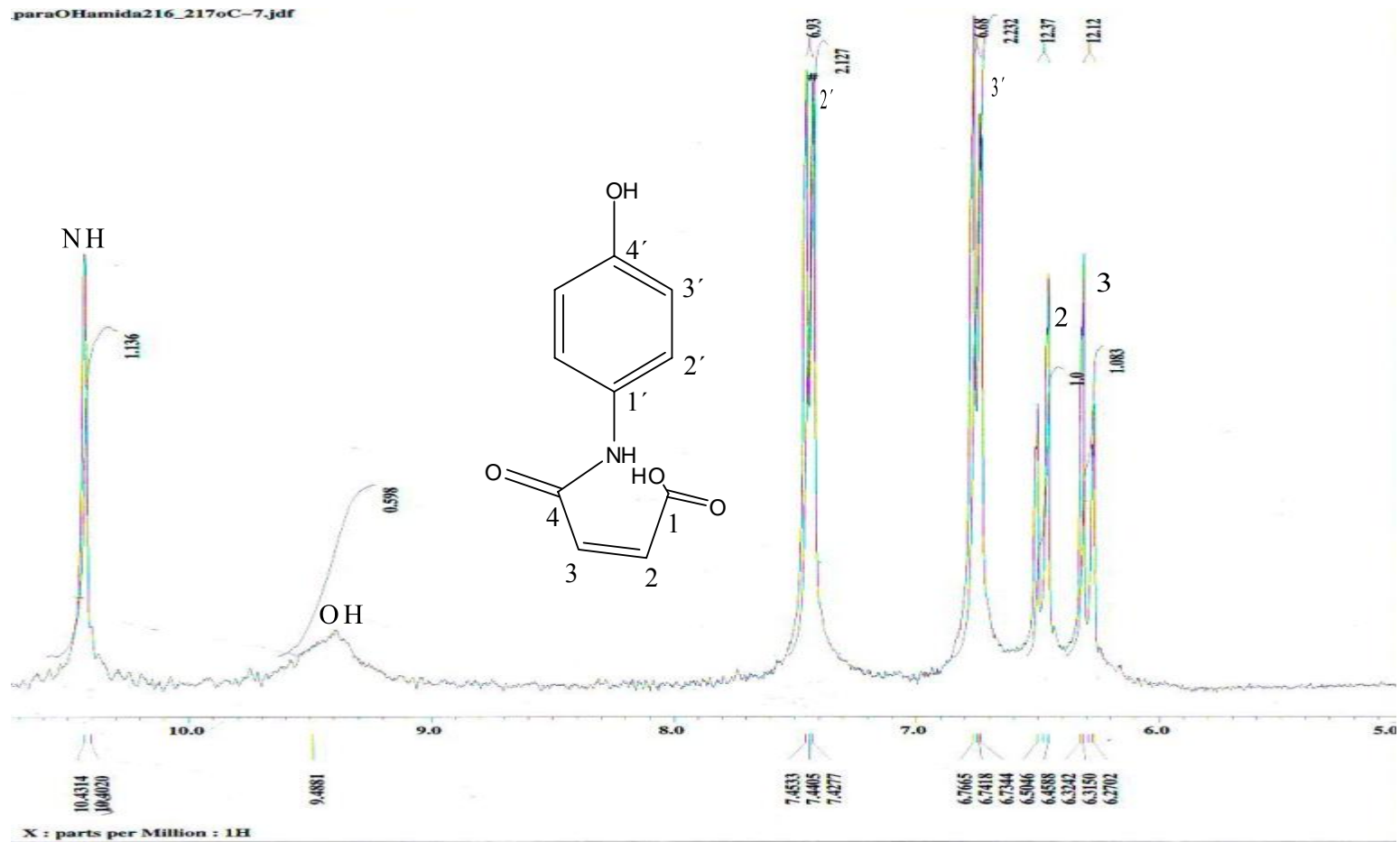


Figura 1: Espectro de RMN ^1H del Acido (2Z)-4-[(4'-hydroxyfenil)amino]-4-oxobut-2-enoico.

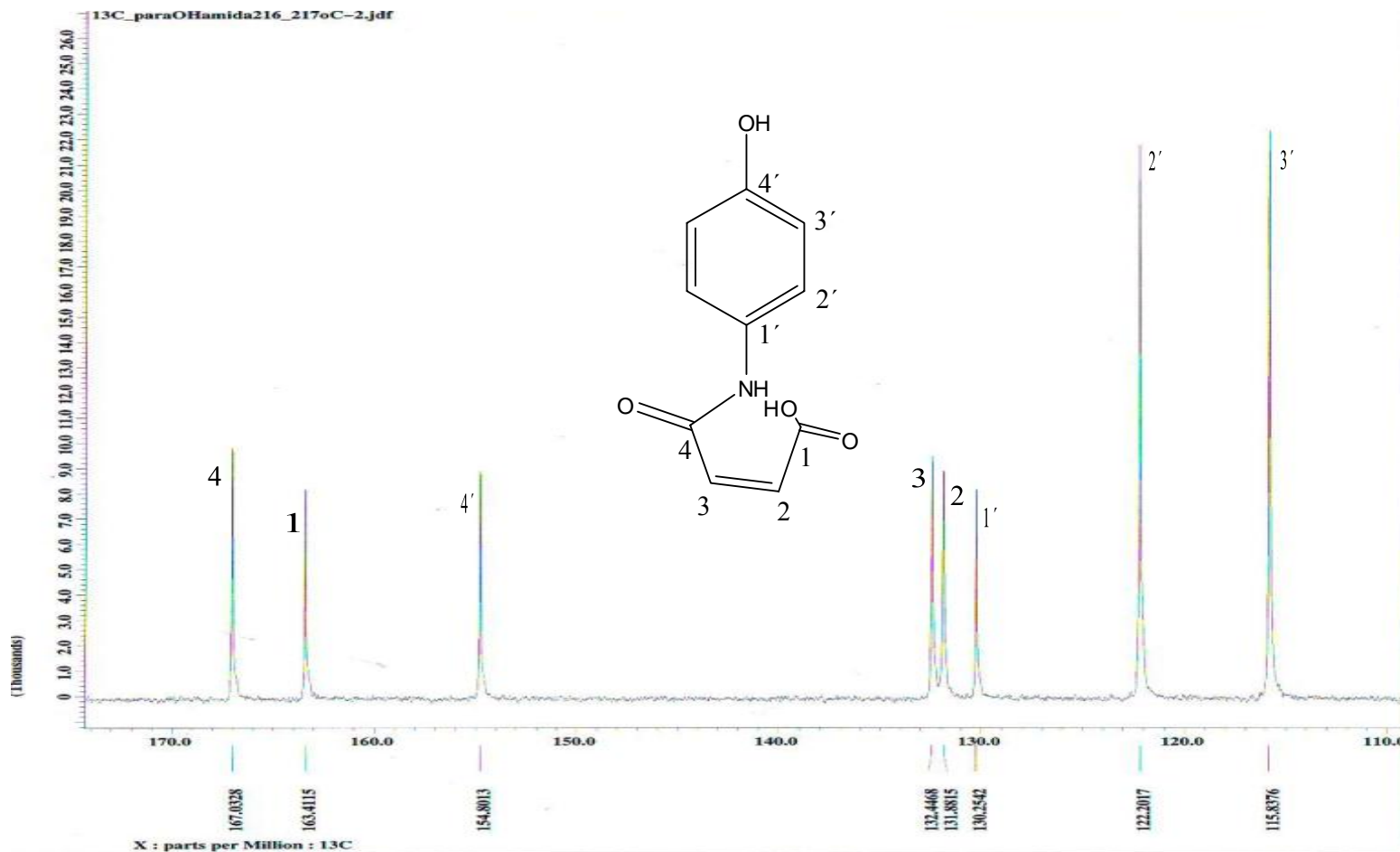


Figura 1: Espectro de RMN ^{13}C del Acido (2Z)-4-[(4'-hydroxifenil)amino]-4-oxobut-2-enoico.

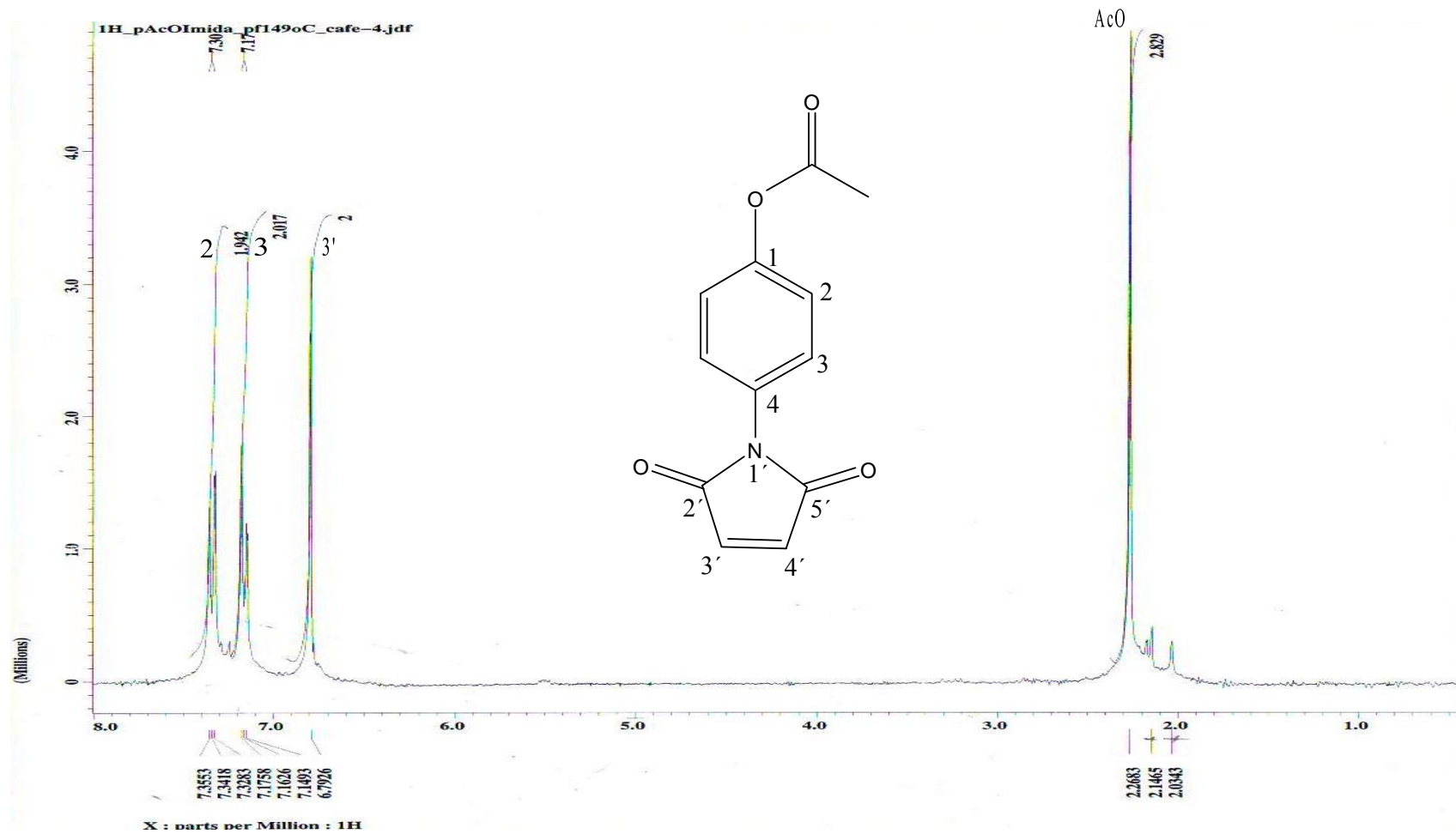


Figura 2: Espectro de RMN ¹H del Acetato de 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)fenil.

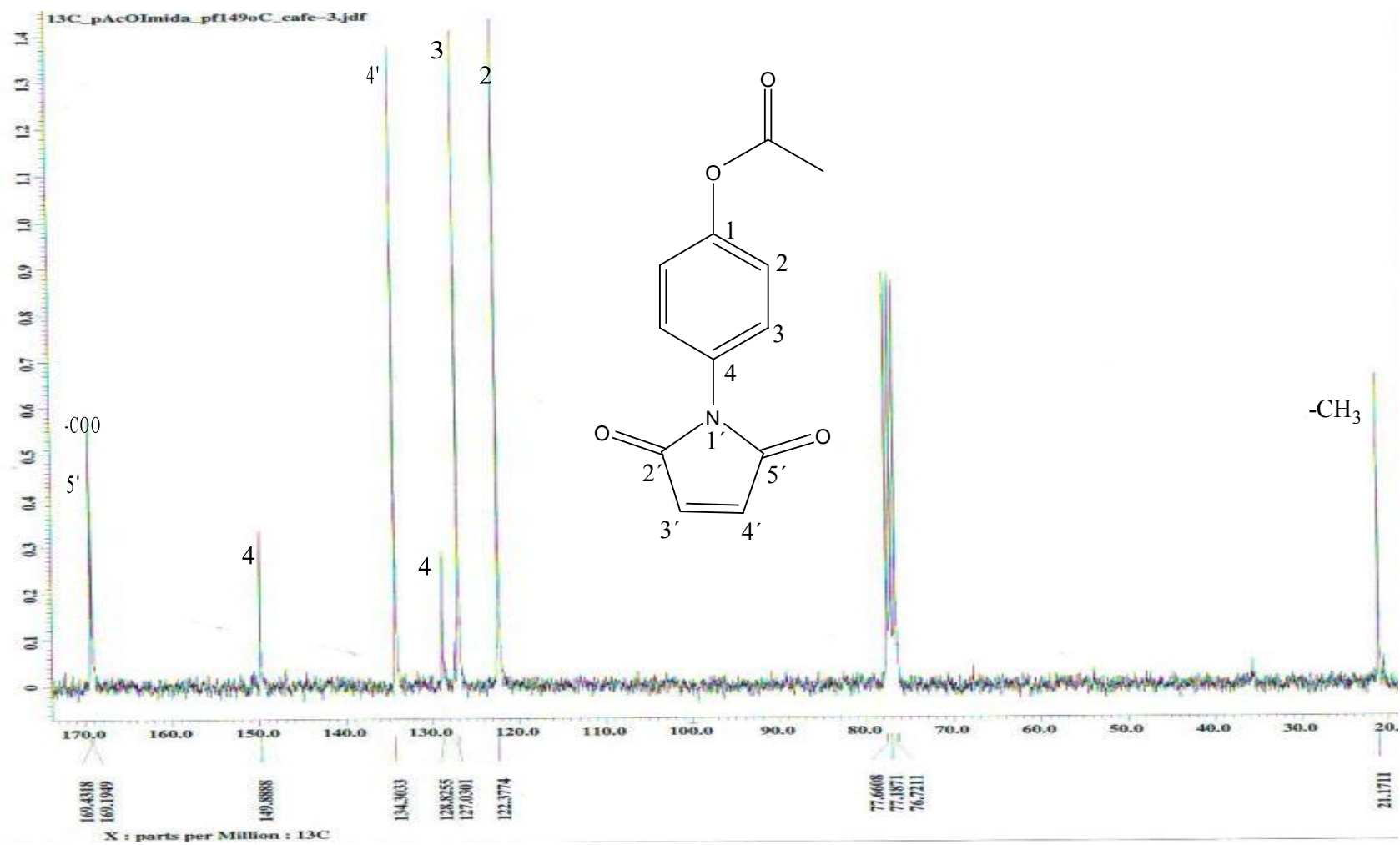


Figura 2: Espectro de RMN ¹³C del Acetato de 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)fenil.

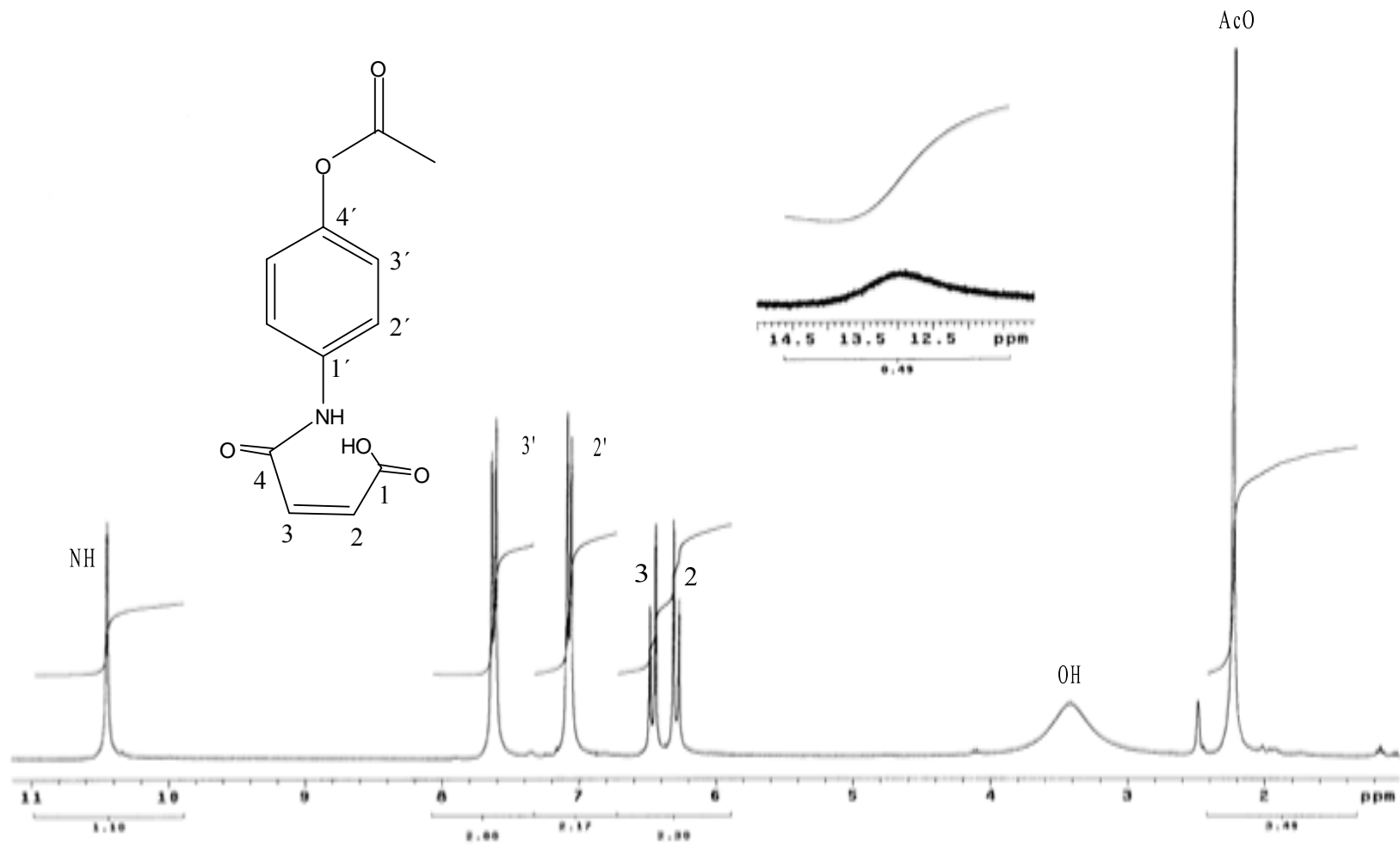


Figura 3: Espectro de RMN ¹H del Síntesis de Acido (2Z)-4-[(4'-acetoxyfenil)amino]-4-oxobut-2-enoico.

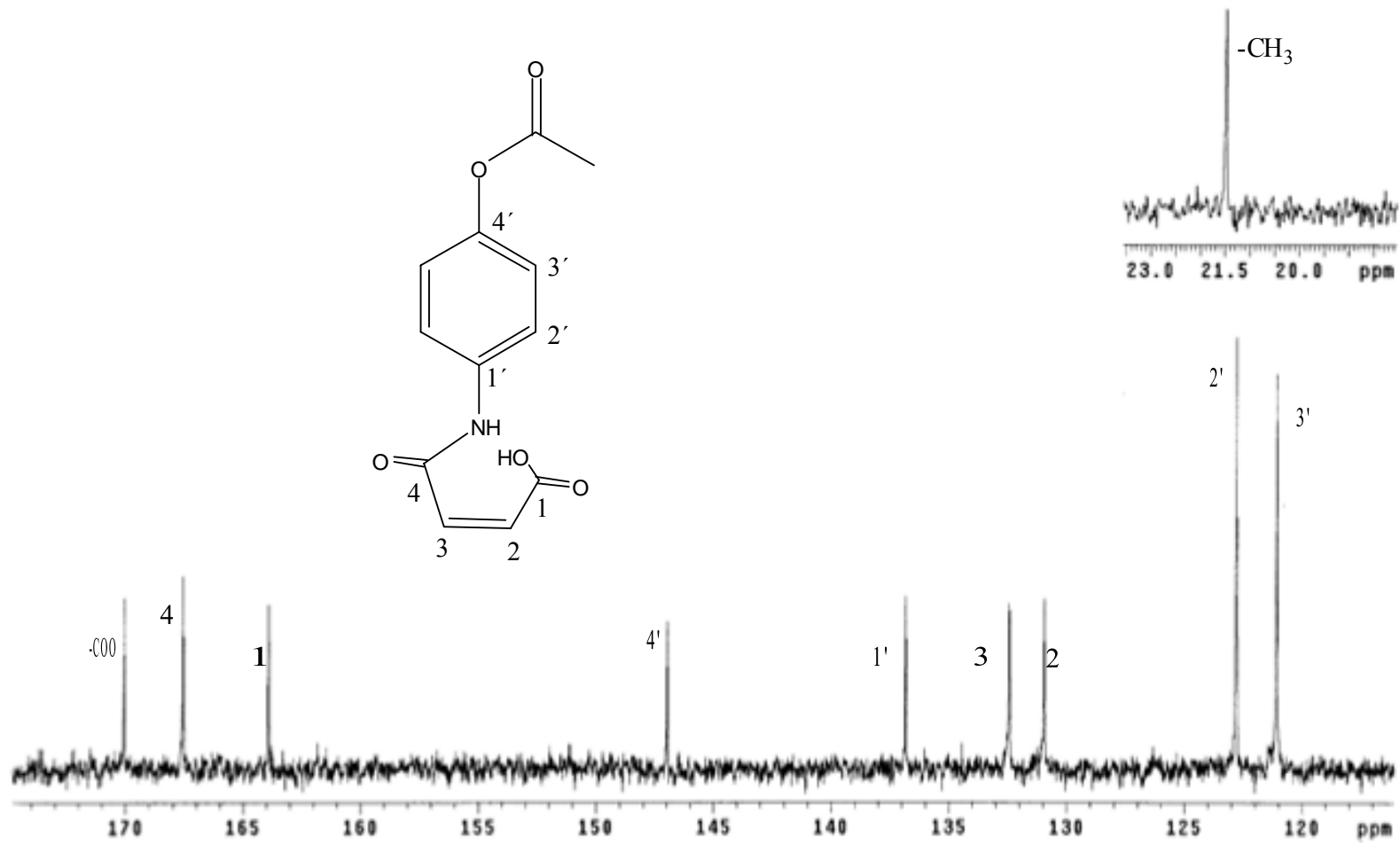


Figura 3: Espectro de RMN ¹³C del Síntesis de Acido (2Z)-4-[(4'-acetoxyfenil)amino]-4-oxobut-2-enoico.

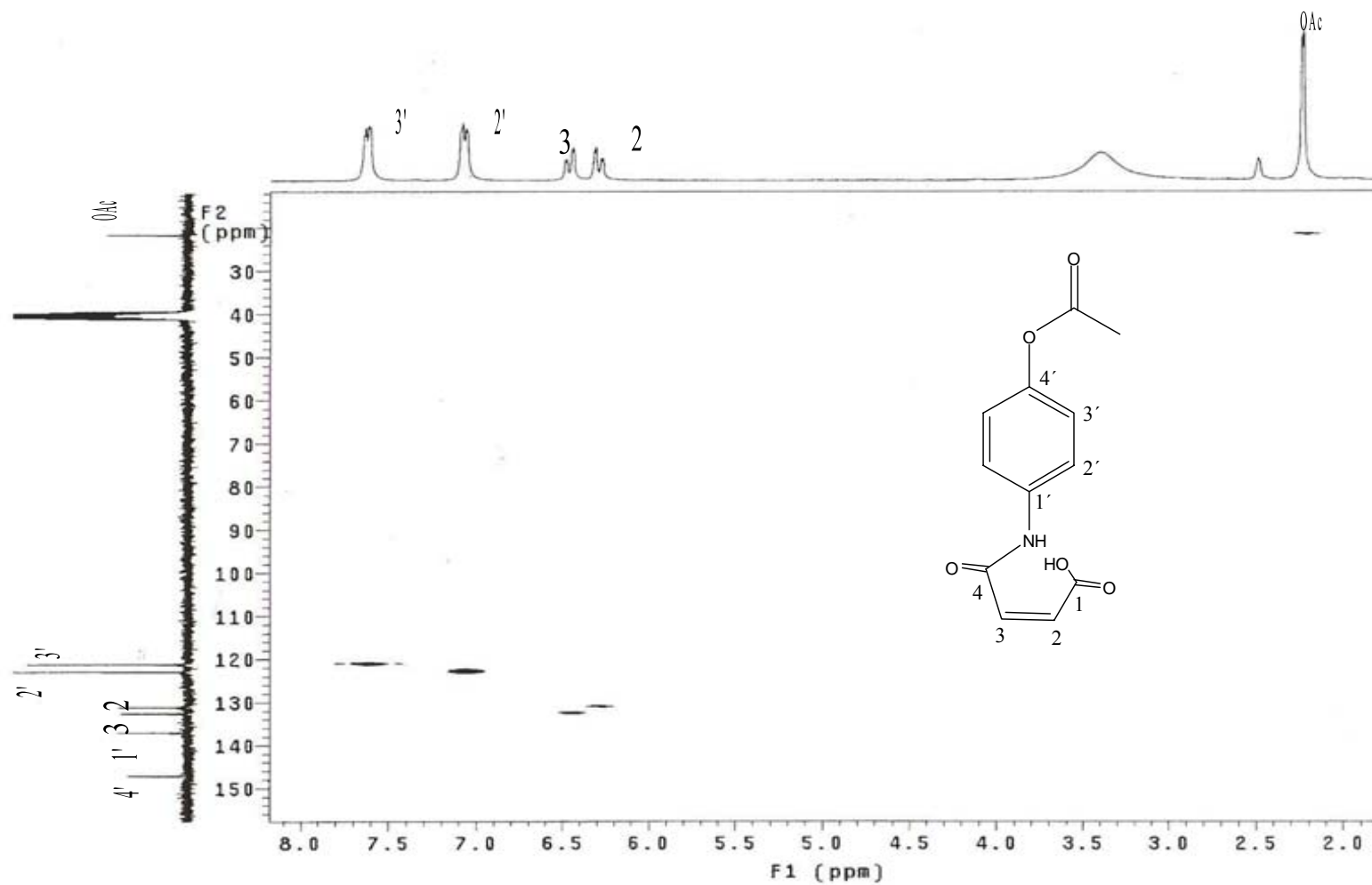


Figura 3: Diagrama de heterocorrelación nuclear ^{13}C - ^1H para el Acido (2Z)-4-[(4'-acetoxyfenil)amino]-4-oxobut-2-enoico.

8.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS "IN VIVO"

La administración del compuesto acetilado en ratones, tuvo como resultado la presencia de contracciones a nivel gastroentérico. La respuesta biológica fue evaluada, al contar el número de contracciones que se presentaron en el animal. Al administrar el compuesto *p*-OAc a diferentes dosis. Como referencia se usó la neostigmina a las mismas concentraciones que el compuesto acetilado. A pesar de que este modelo es poco específico y presenta variabilidad en la respuesta observada, es un modelo predictivo, capaz de ser correlacionado con actividades anticolinesterásicas en humanos. La especificidad del modelo debe considerarse de manera cuidadosa, ya que se propone que su dualidad de acción de los inhibidores se debe a su grupo acetato, el cual puede reaccionar con receptores postsinápticos y con la acetilcolinesterasa y afectar la respuesta motora del ratón. Lo anterior se debe a que el inhibidor guarda estrecha relación con la estructura de la Acetilcolina, y por lo tanto tiene una gran afinidad por receptores muscarínicos y nicotínicos. Sin embargo, la dualidad de la acción del inhibidor propuesto esta en función de la dosis administrada. La variabilidad en la respuesta observada puede minimizarse al realizar varias repeticiones usando el compuesto *p*-OAc en dosis específicas; lo cual se requiere realizar una experimentación más exhaustiva a futuro.

La dosis que fue administrada a cada grupo de ratones con amida acetilada, guarda una relación logarítmica, mientras que los ratones blanco de cada grupo sólo se les administró el vehículo. En todos los grupos de ratones administrados se observaron diversos efectos; la frecuencia de estos, se incrementó proporcionalmente a las dosis administradas (1, 10, 100 y 500 mg/Kg), los efectos observados se compararon con los que se generaron en un grupo de ratones al cual se le administró Neostigmina en dosis equivalentes a las de *p*-AcO-amida. Se eligió la Neostigmina como un testigo, ya que está documentado que es un anticolinesterásico irreversible,^[5] y que su capacidad para unirse a la AChE se debe a que contiene un anillo aromático, un grupo éster y una amina terciaria, que estabilizan al intermediario que forma con los residuos de los aminoácidos que conforman a la enzima. Así mismo hay una estrecha relación con los grupos que conforman la amida acetilada propuesta en este trabajo.

Las principales respuestas observadas presentadas a continuación, se ordenaron conforme se presentaron: disminución de ambulación, taquipnea, contracciones musculares tónicas y piloerección. De todas las respuestas las contracciones musculares tónicas se presentaron marcadamente para todas las dosis administradas.

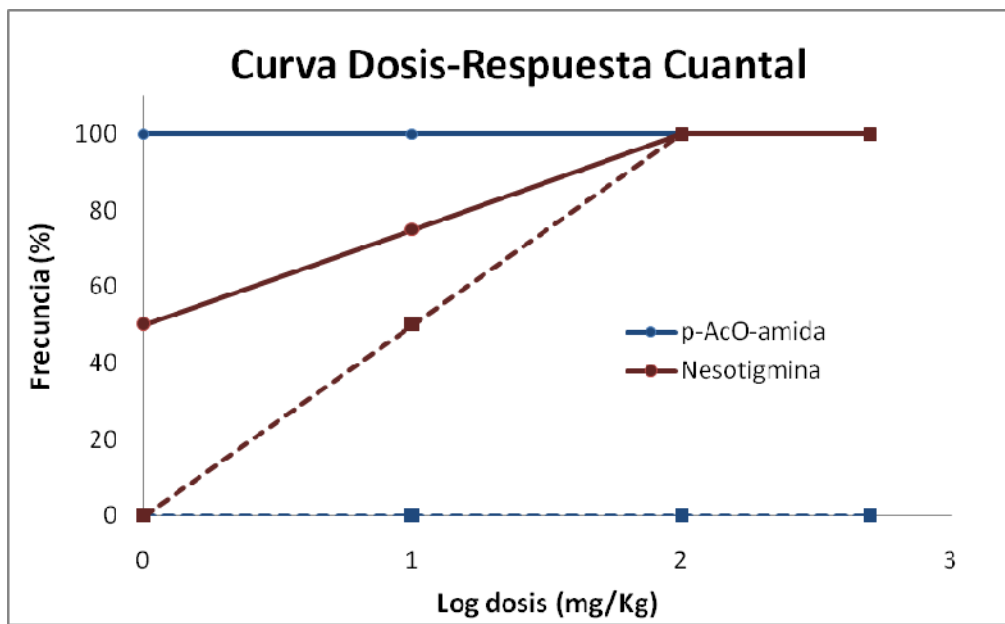


Gráfico 1: Curva Dosis-Respuesta Cuantal. Las líneas continuas representan el porcentaje de la población en el que se observó contracción muscular tónica; en las líneas discontinuas representan el porcentaje de la población en el que se observó muerte.

Como se observa en la **Gráfica 1** con la administración de la amida acetilada se presentan contracciones musculares tónicas a bajas dosis en el 100% de la población, sin embargo la administración de la Nesotigmina a bajas dosis se observó esta misma respuesta en el 50% de la población. Por otro lado al administrar Neostigmina a bajas dosis se presentó muerte en el 50% de la población; respuesta que no se observó al administrar la amida acetilada.

Por lo tanto los anticolinesterásicos producen cierto grado de bloqueo neuromuscular. Es así como se propone que el inhibidor *p*-AcO-amida favorece desensibilización de receptores muscarínicos postsinápticos previamente activados por acetilcolina, por lo tanto estos inhibidores producen agotamiento de la respuesta contráctil durante estimulación tetánica, probablemente por bloqueo del canal central del receptor. Es posible que el exceso de acetilcolina en la unión neuromuscular, producido por la inhibición de la acetilcolinesterasa, cause desensibilización de los receptores postsinápticos. Así mismo, otros mecanismos pueden estar envueltos en el antagonismo: el aumento de la acetilcolina, como resultado de la acción de los anticolinesterásicos puede producir una descarga repetitiva de la terminación nerviosa motora; los anticolinesterásicos *per se* pueden despolarizar la terminación nerviosa motora y, además, convertir una despolarización axonal simple en una respuesta repetitiva. De este modo, el bloqueo neuromuscular es posiblemente el resultado final de todos estos aspectos por *p*-AcO-amida.

IX. CONCLUSIONES

- Se realizó el análisis del docking de las arilamidas *orto*, *meta* y *para* sustituidas.
- Los modelos de docking sugieren, que las arilamidas estudiadas, se unen al sitio activo de la enzima, haciendo contacto con residuos clave, que participan en la unión con otros anti-AChE.
- Todas las arilamidas acetiladas tuvieron una afinidad relativa menor por la AChE; que neostigmina, la cual fue empleada como referencia.
- El compuesto *m*-OAc, resultó ser el inhibidor de mayor afinidad relativa de los compuestos evaluados con una $K_i = 0.281 \mu\text{M}$, mientras que el compuesto *p*-OAc tuvo una menor afinidad relativa con una $K_i = 0.414 \mu\text{M}$.
- La obtención de los compuestos *m*-OAc y *o*-OAc no se realizaron, debido a la dificultad de su obtención. Por lo tanto, se sintetizó la arilamida *para* sustituida, evaluándose su actividad inhibitoria sobre AChE *in vivo*.
- El compuesto *p*-OAc, tuvo un porcentaje de rendimiento muy bajo del 41%.
- Las simulaciones de *docking* permitieron estimar la afinidad relativa de una serie de inhibidores potenciales de AChE de 3 compuestos. La estimación se realizó en tiempos cortos y a bajo costo. Además, este estudio permitió visualizar los complejos ligando-AChE sin la necesidad de cristalizarlos.
- Se observó que el compuesto *p*-AcO-amida a dosis altas; no es tóxico, comparado con la neostigmina.

1.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Bladé F.A., Ordorica V.J., Ordorica V.M., Yañez A.R. *Apuntes sobre mecanismos de acción de fármacos. -FARMACOLOGÍA-*. IPN. México D.F. 1999. pp. 1-10
2. Guimerà A., Gironès X., Cruz-Sánchez F. *Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer*. Instituto de Ciencias Neurológicas y Gerontológicas, Universidad Internacional de Catalunya. Rev Esp Patol 2002; 35(1):21-48.
3. Perea A., Ramón J. *Guía Práctica de Farmacología del Sistema Nervioso Central*. You & US, S.D. (tres cantos). España. 2003. pp. 120-145
4. Knegetel R.M.A., Wagener, M. *Efficacy and selectivity in flexible database docking*. Proteins: Struct Func Genet 1999; 37:334-345.
5. Goodman, G.A., Nall, T., Nies, A.S., Taylor P. *Las bases Farmacológicas de la terapéutica*. 9ª edición. Ed. Interamericana McGraw-Hill, México, D.F. 1996. pp: 171-188.
6. Morrison R.T., Boyd R.N. *Química orgánica*. 5ª Edición. Pearson Educación. México D.F. 1998. pp: 530-554
7. Hernández L.H., Flores R.R. Arrazola D.F., Martínez R.V., Gómez S.C. *Grupos Funcionales I*. IPN. México D.F. 2004 pp: 55-69
8. Trujillo F.J. *Síntesis de análogos estructurales de la acetilcolina y de los ácidos para-aminobenzóico y gama-aminobutírico*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en la especialidad de Química Orgánica. CINVESTAV IPN. México D.F. 1994.
9. Hucho F., Järv J. y Weise, C. *Substrate-binding sites in acetylcholinesterase*. Trends Pharmacol Sci 1991; 12: 422-426.
10. Dobransky T., Davis W.L., Xiao G., Rylett R.J. *Expression, purification and characterization human choline acetyltransferase: phosphorylation of the enzyme regulates catalytic activity*. Biochem J 2000; 349: 141-151.
11. Trujillo F.J. *Síntesis de heterociclos de cinco miembros farmacológicamente activos*. Tesis para obtener el grado de Doctor en la especialidad de Ciencias Químicas. CINVESTAV IPN. México D.F. 1999

12. María del Carmen Avendaño López. *Introducción A La Química Farmacéutica*. 2da edición. McGraw-Hill. 2006. pp 202-234
13. Hicks G.J., Trujillo F.J., Vázquez A.J. *Bioquímica*. McGraw-Hill. México D.F. 2006. pp: 115-128
14. Lenninger A.L. *Bioquímica*. 2^{da} Edición. Omega S.A. Barcelona, España. 1989. pp: 190-195.
15. Judith E.R. *Síntesis y evaluación anticolinesterásica in Vitro e in vivo de análogos de acetilcolina derivados de aminofenol*". Tesis para obtener el título de Médico cirujano y partero. ESM IPN. México D.F. 2001
16. Bar-On P., Millard C.B., Harel M., Dvir H., Enz A., Sussman J.L., Silman I. *Structural determinants of Torpedo californica acetylcholinesterase inhibition by the novel and orally active carbamate based anti-alzheimer drug ganstigmine*. *Biochemistry* 2002. pp. 3555-64
17. Yañez A.R., Vázquez A.I., Trujillo F.J. *Bases moleculares en el estudio de nuevos fármacos*. *Act Méx Cien Tec* 1993; 11(41): 63 – 79.
18. Goldstein A., Lewis A., Sumner M.K. *Farmacología*. 2da edición. Limusa. México 1978. pp 1-148
19. Alfonso Velasco Martín. *Compendio de Farmacología General*. Díaz de Santo. España. Pp60-78.
20. Baños D.J.E., Farré. *Principios de Farmacología Clínica – Bases científicas de la utilización de medicamento*. Albadalejo M. Barcelona: Masson, 2002. pp. 352.
21. Andrew R., Leach,† Brian K., Shoichet, Catherine E. Peishoff,. *Prediction of Protein-Ligand Interactions. Docking and Scoring: Successes and Gaps*. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 49(20)
22. Gómez-Puyou A., Saavedra-Lira E., Becker I., Zubillaga R.A., Rojo-Domínguez A., Pérez-Montfort R. *Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action. Studies with triosephosphate isomerase*. *Chem Biol* 1995; 2:847-855.
23. Padilla Z.J., Rojo D.A. *Simulación Del Reconocimiento Entre Proteínas Y Moléculas Orgánicas O Docking. Aplicación Al Diseño De Fármacos*. Mensaje Bioquímico, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, DF, MÉXICO. 2002.

24. Eglen R.M., Schneider G., Böhm H.J. *High-throughput screening and virtual screening: Entry points to drug discovery. En: Virtual screening for bioactive molecules* (Böhm HJ y Schneider, G eds.) Wiley-VCH. Weinheim, Alemania. 2000 pp. 1-14.
25. Leach A.R. *Molecular modeling. Principles and applications*. Addison Wesley-Longman Ltd. Essex, Inglaterra. 1996. pp. 543-585.
26. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html>.
27. Trujillo F.J., Vázquez A.I., Yáñez A.R. *Inhibidores enzimáticos suicidas*. Act Med 1992; 28 (17): 17-26.
28. Guyton A.C., Hall J.E. *Fisiología y fisiopatología*. 6ª Edición. McGraw-Hill Interamericana. 1998 pp: 361-383.
29. González M.J.M. *Síntesis y evaluación anticolinesterásica in vitro de isomaleimida de p-Aminofenol*. Tesis para obtener el título de Médico Cirujano y Partero. ESM IPN. México D.F. 2003.
30. K.M. Robert, MD. K.G. Daryl, MD, A.M. Peter, DSC, W.R. Victor. *Bioquímica de Harper*. 14^{va} Edición. El Manual Moderno S.A. de C.V. México D.F. pp: 593-607.
31. Wurtman RJ. *Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons*. Trends Neurosci 1992; 15:117-122.
32. Taylor P. *The cholinesterases*. J Biol Chem 1991; 266 (7): 4025-4028.
33. Crawley JN, Wenk GL. *Coexistence of galanin and acetylcholine: Is galanin involved in memory processes and dementia?* Trends in Neurosci 1989; 12: 278-281.
34. Potter A., Corwin J., Lang J., Piasecki M., Lenox R., Newhouse P.A. *Acute effects of the selective cholinergic channel activator (nicotinic agonist) ABT-418 in Alzheimer's disease*. Psychopharmacology 1999; 142: 334-442.
35. Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman. *Atomic structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein*. Science 1991; 253:872-879.
36. Skok V.I. *Nicotinic acetylcholine receptors in the neurons of autonomic ganglia*. J. Auton Nerv Syst 1987; 21: 91-99.
37. Goyal R.K. *Muscarinic receptors subtypes. Physiology and clinical implications*. N Eng J Méd 1989; 321 (15): 1022-1029.

38. Quinn D.M. *Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states*. Chem Ver 1987; 87 (5): 955-979.
39. Enyedy I.J., Kovach I.M., Bencsura A. *Molecular Dynamics study of active-site interactions with tetracoordinate transients in acetylcholinesterase and its mutants*. Biochem J 2001; 353: 645-653.
40. Simon S, Le Goff A, Frobert Y, Grassi J, Massoulie J. *The binding sites of inhibitory monoclonal antibodies on acetylcholinesterase. Identification of a novel regulatory site at the putative "back door"*. J Biol Chem 1999; 274: 27740-27746.
41. Jennifer R, Aileen E.B., Oscar P.R., Zoran R., Palmer T., Charles M.T. *Synthesis of fluorescent probes directed to the active site gorge of acetylcholinesterase*. Bioorg Med Chem Lett 2000; 14: 1523-1526.
42. Lin G., Lai, C.-Y., Liao W.C. *Molecular recognition by acetylcholinesterase at the peripheral anionic site: Structure-Activity Relationships for inhibitions by aryl carbamates*. Bioorg Med Chem 1999 7: 2683-2689.
43. Boyd A.E., Marnett A.B., Wong L., Taylor P. *Probing the site active center gorge of Acetylcholinesterase by fluorophores linked to substituted cysteines*. J Biol Chem 2002; 275 (29): 2401-2408.
44. Koellner G., Kryger G., Millard C.B., Silman I., Sussman J.L., Steiner T. *Active site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from Torpedo californica*. J Mol Biol 2000; 296: 713-735.
45. Trujillo F.J., Santillán R., Beltrán H.I., Farfán H. *¹H and ¹³C NMR spectra for a series of arylmaleamic acids, arylmaleimides, arylsuccinamic acids and arylsuccinimides*. Magn Reson Chem 1999; 37: 682-686.
46. Correa-Basurto J., Vázquez-Alcántara I., Espinoza-Fonseca M.L., Trujillo-Ferrara J.G., *p-aminobenzoic acid derivatives as acetylcholinesterase inhibitors*. Eur J Med Chem 2005; 40: 732-735.
47. Nordberg A. *Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease. Therapeutic implication*. Biol Psychiatry 2001; 49: 200-210.
48. Mayeux R., Sano M. *Drug Therapy: Treatment of Alzheimer's disease*. N Eng J Med 1999; 341 (22): 1670-1679.
49. Harel M., Schalk I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner M., Hirth C., Axelsen P.H., Silman I., Sussman J.L. *Quaternary ligand binding to aromatic residues*

- in the active-site gorge of acetylcholinesterase. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 9031-9035.*
50. Goyal RK. *Muscarinic receptors subtypes. Physiology and clinical implications.* N. Eng. J. Med. 1989; 321: 1022-1029.
 51. Growdon JH. *Muscarinic agonists in Alzheimer's disease.* Life Sci 1997; 60: 993-998.
 52. Chistopoulos A., pierce TL., Sorman JL., E1-Fakahany EE. *On the unique binding and activating properties of xanomeline at the M1 muscarinic acetylcholine receptor.* Mol Pharmacol 1998; 53: 1120-1123.
 53. Recananati M., Cavalli A., y Hansh C. *A comparative QSAR analysis of acetylcholinesterase inhibitors currently studied for the treatment of Alzheimer's disease.* Chem.-Biol. Interact. 1997; 105: 199-228.
 54. Kasa P., Rakonczay Z., and Gulya K. *The cholinergic system in Alzheimer's disease.* Prog Neurobiol. 1997; 52: 511-535.
 55. Antosiewicz J.; Wlodek ST., y McCammon J.A. *Acetylcholinesterase. Role of the enzyme's charge distribution in steering charged ligands toward the active site.* Biopolymers 1996; 39: 85-94.
 56. Pakaski M., Kasa P. *Role of acetylcholinesterase inhibitors in the metabolism of amyloid precursor protein.* Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2003; 2:163-171.
 57. Vázquez AJI. *Síntesis y evaluación colinérgica de la maleamida de meta-aminofenol.* Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en especialidad de Farmacología. ESM IPN. México D.F. 1994
 58. Espinosa RJ. *Síntesis y evaluación anticolinesterásica in vitro e in vivo de una familia de compuestos derivados de aminofenol.* Tesis para obtener el título de Médico Cirujano y Partero. ESM IPN. México D.F. 2001
 59. Bourne Y., Grassi JPE., Marchot P. *Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by x-ray crystallography.* J Biol Chem 1999; 274: 30370-30376.
 60. Schneider LS. *Treatment of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitors.* Clin. Geriatr. Méd. 2001; 17 (2):337-358.
 61. Salnikov W. *[Distribution of acetylcholinesterase in different regions of the human brain according to light and electron cytochemical findings]. Zh Nevropatol Psikhiatr Im SS Korsakova 1978; 78: 966-974*

62. Melicke A., Albuquerque EX. *Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease*. Eur. J. Pharmacol. 2000; 393: 165-170.
63. Coelho F., Birks J. *Physostigmine for Alzheimer's disease*. Cochrane Database Syst Rev. 2001; (2): CD001499.
64. Birks J., Iakovidou V., Tsolaki M. *Rivastigmine for Alzheimer's disease*. Cochrane database Syst Rev 2000; (2): CD001191.
65. Nicolet Y., Lockride O., Masson P., Fontecilla-Camps JC., Nachon F. *Crystal Structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products*. J Biol Chem 2003; 278: 41141-41147.
66. Taylor P. *Development of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease*. Neurology 1988; 51(1suppl 1): S65-S67.
67. Ballard CG., Greig NH., Guillozet-Bongaarts AL., Enz A., Darvesh S. *Cholinesterases: roles in the brain during health and disease*. Curr Alzheimer Res. 2005; 2: 307-318.
68. Giacobini E. *Cholinergic function and Alzheimer's disease*. Int. J. Geriatr. Psychiatry. 2003; 18(Suppl 1): S1-S5.
69. Gentry KM., Moorad RD. *Characterización of monoclonal antibodies that inhibit the Catalytic Activity of Acetylcholinesterases*. J Neurochem 1995; 64: 842-849.
70. Cao CJ., Mioduszewski RJ., Menking DE., Valdes JJ., Katz EJ., Eldefrawi ME., Eldefrawi AT. *Cytotoxicity of organophosphate anticholinesterase. In vitro*. Cell Dev Biol Anim 1999; 35: 493-500.
71. Correa-Basurto José, Espinosa-Raya Judith, Vázquez-Alcántara Iván, Flores-Sandoval Cesar A, Trujillo-Ferrara José. *p-aminobenzoic acid derivatives as cholinesterase inhibitors in the brain of mice*. Chem-Biol Inter. 2005; 157-158: 368-369.
72. Inglis F. *The tolerability and safety of cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia*. Int J Clin Pract Suppl. 2002; 127: 45-63.
73. Trujillo-Ferrara J., Montoya Cano L., Espinosa-Fonseca M. *Synthesis, anticholinesterase activity and structure-activity relationships of m-Aminobenzoic acid derivatives*. Bioorg Med Chem Lett 2003; 13: 1825-1827.

74. Trujillo-Ferrara J., Correa-Basurto J., Espinosa J., García J., Martínez F., Miranda R. *Solvent-free synthesis of arylamides and arylimides, analogues of acetylcholine*. Synth. Comm. 2005; 35: 2017-2023.
75. Correa-Basurto J., Espinosa-Raya J., González-May M., Espinoza-Fonseca M., Vázquez-Alcántara I., Trujillo-Ferrara J. *Inhibition of acetylcholinesterase by two aryl derivatives, 3a-Acetoxy-5H-pyrrolo(1,2-a) (3,1)benzoxazin-1,5-(3aH)-dione and cis-N-p-Acetoxy-phenylisomaleimide*. J. Enz. Inhib. Med. Chem. 2006; 21: 133-138.
76. Greig NH., Lahiri DK., Sambamurti K. *Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy*. Int Psychogeriatr 2002; 14 suppl 1: 77-93.
77. Jeyarasasingam G., Yeluashvili M., Quik M. *Tacrine, a reversible acetylcholinesterase inhibitor, induces myopathy*. Neuroreport 2000; 11: 1173-1176.
78. Ogura H., Kosasa T., Kuriya Y., Yamanishi Y. *Comparison of inhibitory activities of donepezil and other cholinesterase inhibitors on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in vitro*. Methods Find Exp Clin Pharmacol 2000; 22: 609-613.
79. Luigia Trabace., Addolorata Coluccia., Silvana Gaetani., Maria Tattoli., Raffaele Cagiano., Claudio Pietra., Keit M., and Vincenzo Cuomo. *In vivo neurochemical effects of the acetylcholinesterase inhibitor ENA713 in rat hippocampus*. Brain research 2000; 865: 268-271.
80. Darvesh S., McDonald RS., Denwell A., Conrad S., Darvesh KV., Mataija D., Gomez G., Caines A., Walsh R., Martin E. *Structure-activity relationship for inhibition of human cholinesterase by alkyl amide phenothiazine derivatives*, Bioorg. Med. Chem. 2005; 13: 211-222.
81. Braida D., Sala M. *Eptastigmine: ten years of pharmacology, toxicology, pharmacokinetics and clinical profiles*. CNS Drug Rev 2001; 7: 369-386.
82. Alhomida AS., Al-Rajhi AA., Kamal MA., Al-Jafari AA. *Kinetic analysis of the toxicological effect of tacrine (Cognex) on human retinal acetylcholinesterase activity*. Toxicology 2000; 147: 33-39.
83. Edwards JA., Brimijoin S. *Divergent Regulation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in tissues on the rat*. J Neurochem 1982; 38: 1393-1403.
84. Roderick W.R. *The isomerism of N-substituted maleimides*. J. Am. Chem. Soc. 1957; 79: 1710.

85. Cotter, R.J.; Sauers, C.K. y Whelan, J.M. *The synthesis of N-Substituted Isomaleimides*. J. Org. Chem. 1961; 26: 10-15.
86. Maxwell DM. *The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds*. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 114: 306-312.
87. Flores-Sandoval CA., Zaragoza IP., Marañón-Ruiz VF., Correa-Basurto J., Trujillo-Ferrara J. *Theoretical study of aryl succinic and maleic acid derivatives*, Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. 2005; 713: 127-134.
88. Giacobini E. *Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy: from tacrine to future applications*. Neurochem int 1998; 32: 413-419.
89. Trujillo-Ferrara J., Vázquez I., Espinoza J., Santillán R., Farfán N., Höpfl H. *Reversible and irreversible inhibitory activity of succinic and maleic acid derivatives on acetylcholinesterase*. Eur J Pharm Sci 2003; 18: 313-322.
90. Trujillo-Ferrara J., Santillán R., Beltrán H.I., Farfán N., Höpfl H. *¹H and ¹³C NMR spectra for a series of arylmaleamic acids, arylmaleimides, arylsuccinamic acids and arylsuccinimides*. Magn. Reson. Chem. 1999; 37: 682-686.
91. Espinosa Raya J., Correa-Basurto J., Vázquez Alcántara JI., Trujillo-Ferrara J G. *Effects of succinic acid derivatives on acetylcholinesterase activity in mice brain*. Chem-Biol Inter 2005; 157-158: 379-380
92. Correa, B.J. *Amidas e Imidas con o sin carbonilo α , β insaturado, derivados de ácido para-aminobenzoico con actividad anticolinesterásica*. Tesis para obtener el título de Médico Cirujano y Partero. ESM IPN. México D.F. 2000
93. Kitz R., Wilson IB. *Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase*. J. Biol. Chem. 1962; 273: 3245.
94. Grisaru D., Sternfeld M., Eldor A., Glick D., Soreq H. *Structural roles of acetylcholinesterases variants in biology and pathology*. Eur. J. Biochem. 1999; 264: 672-686.
95. Baker BR. Biochem. Pharmacol. 1962; 11, 1155.
96. Kaydos AJ., Smith LD. J. Org. Chem. 1963; 48:1096.
97. Melicke A., Albuquerque EX. *Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease*. Eur J Pharmacol 2000; 393: 165-170.
98. Baker BR., Alumaula PI. J. Pharm. Sol. 1963; 52, 912.
99. Nemani R., Lee EVC. Arch. Biochem. Biophys. 1993; 300:24.

100. Kenzie N., Richard O. J. Am. Chem. Soc. 1941; 63:2583.
101. Roderick WR., J. Am. Chem. Soc. 1057; 79:1710.
102. Tawney PO., Snider RH., Bryan CE., Conger RP., Dovel FS., Kelly RJ., Stilleler CH. J. Org. Chem. 1960; 25:56.
103. Houk KN., Strozier RW. *Lewis acid catalysis of Diels-Alder reactions*. J. Am. Chem. Soc. 1973; 95: 4094-4096
104. Gazquez JL., Mendez F. *The Hard and Soft Acids and Bases Principle: An Atoms in Molecules Viewpoint*. J. Phys. Chem. 1994; 98: 4591-4593.
105. Campiani G, Fattorusso C, Butini S, Goeta A, Agnusdei M, Gemma S, Persico M, Catalanotti B., Savini L., Nacci V., Novellino E., Holloway HW., Greig NH., Belinskeda T., Federko JM., Saxena A. *Development of molecular probes for the identification of extra interaction sites in the mid-gorge and peripheral sites of butyrylcholinesterase (BuChE) rational design of novel, selective, and highly potent BuChE inhibitors*. J. Med. Chem 2005; 48: 1919-1929.
106. Guo J., Hurley MM., Wright LB., Lushington GH., *A docking score function for estimating ligand-protein interactions: application to acetylcholinesterase inhibition*. J Med Chem 2004; 47: 5492-5500.
107. Darvesh S., McDonald RS., Penwell A., Conrad S., Darvesh KV., Mataija D., Gomez G., Caines A., Walsh R., Martin E, *Structure-activity relationship for inhibition of human cholinesterases by alkyl phenothiazine derivatives*. Bioorg. Med. Chem. 2005; 13: 211-222.
108. Bonting SL., RM. Featherstone. *Ultramicro assay of the cholinesterase*. Arch. Biochem. Biophys. 1956; 61:89
109. Suresh CH. *Molecular electrostatic potential approach to determining the steric effect of phosphine ligands in organometallic chemistry*. Inorg Chem. 2006; 45: 4982-4986.
110. Patricia M M. *Síntesis y relación estructura actividad de arilimidias sustituidas de acción anticolinesterasa*. para obtener el grado de maestría en ciencias con especialidad en farmacología. ESM IPN. México D.F. 2005.