



# Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

**“Mejoras cognitivas en un modelo animal con 4-((Z)-benzilideno)-2-((E)-stiril)oxazol-5(4H)-ona como un fármaco anticolinesterasa”**

TESIS

Para obtener el título de Químico Farmacobiólogo presenta:

**Bibiana Roselly Cota Ramírez**

Bajo la Dirección de la Dra. Aracely Serrano Medina

Tijuana, B.C., a septiembre de 2018.

**Universidad Autónoma de Baja California**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

FOLIO No.27


Tijuana, B. C., a 10 de agosto de 2018

C. Bibiana Roselly Cota Ramirez  
Pasante de Químico Farmacobiólogo  
Presente

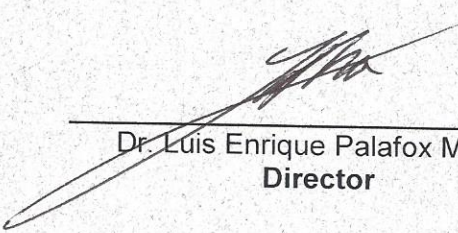
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
Opción Tesis

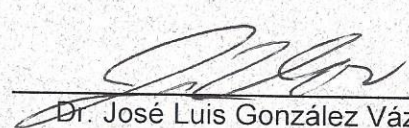
Es propuesto, por la Dra. Aracely Serrano Medina quien será el responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Mejoras Cognitivas en un Modelo Animal con 4-((Z)-benzilideno)-2-((E)-stiril)oxazol-5(4H)-ona como un Fármaco Anticolinesterasa", el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII.- ANEXOS

  
Dra. Aracely Serrano Medina  
Directora de Tesis



  
Dr. Luis Enrique Palafox Maestre  
Director

  
Dr. José Luis González Vázquez  
Subdirector

## INDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Hoja de aprobación.....	2
Resumen.....	4
Agradecimientos.....	6
Dedicatoria.....	8
<b>CAPITULO I INTRODUCCION</b>	
1.1 Antecedentes.....	10
1.2 Objetivo general.....	12
1.3 Objetivos específicos.....	13
1.4 Justificación.....	13
<b>CAPITULO II MARCO TEORICO</b>	
2.1 Receptores $\alpha 7$ nicotínicos de la acetilcolina ( $\alpha 7$ nAChR).....	16
2.2 La Acetilcolinesterasa (AChE).....	19
2.3 Acetilcolinesterasa en memoria y cognición.....	21
2.4 Papel de $\alpha 7$ nAChR en la enfermedad de Alzheimer.....	22
2.5 Inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa.....	24
<b>CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1 Material y reactivos .....	26
3.2 Ensayos in vivo.....	27
3.2.1 <i>Modelo animal</i> .....	27
3.2.2 <i>Preparación y administración de los compuestos</i> .....	27
3.3 Determinación de mejora en el déficit cognitivo inducido por escopolamina.....	28
3.3.1 <i>Prueba del laberinto Y modificado</i> .....	28
3.3.2 <i>Prueba de reconocimiento a objetos nuevos (ORT)</i> .....	29
3.4 Determinación de Mejora Cognitiva a través de $\alpha 7$ - nAChR.....	29
3.5 <i>Análisis estadístico</i> .....	30
<b>CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1 Síntesis y caracterización farmacológica previa de compuestos de tipo oxazolonas.....	32
4.2 Determinación de mejora en el déficit cognitivo inducido por escopolamina.....	33
4.2.1 Memoria de trabajo espacial para Y-laberinto modificado.....	34
4.2.2 Reconocimiento de objetos (ORT) modelo de retardo de tiempo...	36
4.3 Determinación de Mejora Cognitiva a través de $\alpha 7$ - nAChR.....	39
<b>CAPITULO V CONCLUSIONES</b> .....	43
Referencias.....	44

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo comúnmente relacionado con la edad; existen tratamientos para la enfermedad los cuales son inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa (AChE), tales como la tacrina y donepezil. Previamente se sintetizaron cinco oxazolonas, así como su evaluación para su actividad funcional *in vitro*, determinando las constantes de inhibición ( $K_i$ ) y la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ).

El objetivo de este proyecto fue evaluar la actividad funcional *in vivo* del compuesto 4-((Z)-benzilideno)-2-((E)-stiril)oxazol-5(4H)-ona, (**Az16**) determinando la dosis mínima efectiva mediante el modelo de reconocimiento de objetos (ORT) y mediante el laberinto en Y modificado (LYM).

El efecto de los compuestos para mejorar la memoria episódica a corto plazo, se evaluó mediante el modelo de ORT basado en una preferencia innata de los ratones para explorar un objeto novedoso (cilindro rojo) en lugar de uno familiar (cubo amarillo) dentro de una caja negra. Se utilizaron ratones ICR de ~7 semanas. Una hora antes de comenzar el experimento se administró vía intraperitoneal el compuesto a diferentes dosis (5, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ M/kg) posteriormente, treinta minutos antes de comenzar el experimento, se administró 1 mg/kg de escopolamina para inducir amnesia. Se determinó el tiempo de exploración entre los objetos y posteriormente el índice de discriminación (DI) de un grupo control, tacrina como estándar de referencia, grupo amnésico y de cada una de las diferentes dosis de prueba.

Se determinó que la dosis mínima efectiva de la oxazolona para contrarrestar el efecto de la escopolamina fue de 100µM/Kg o 27.52 mg/Kg. En este experimento los ratones con amnesia inducida por la escopolamina pasaron el mismo tiempo explorando objetos novedosos y familiares ( $p < 0.05$ ), mientras que los ratones del grupo control o los ratones amnésicos tratados con los compuestos de ensayo exhibieron un tiempo de exploración significativamente diferente entre los objetos, lo que refleja una mejora significativa del estado amnésico ( $p < 0.05$ ).

La oxazolona 4-((*Z*)-benzilideno)-2-((*E*)-stiril)oxazol-5(4H)-ona (**Az16**) actúa como un fármaco anticolinesterasa con potencias en la escala micromolar para modelos animales, por lo que pudiera ser un blanco farmacológico para futuros estudios farmacocinéticos.

## AGRADECIMIENTOS

- Beca otorgada por la beca SEP para incorporación de nuevos profesores de tiempo completo con número programático UABC-PTC-620.
- A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, por haberme dado la oportunidad de estudiar la carrera de Químico Farmacobiólogo, por tener buenos maestros muy preparados impartiendo las materias de la carrera y por permitirme desarrollarme mostrando los conocimientos adquiridos durante mis estudios a través de modalidades académicas que me permitieron realizar este proyecto y presentar mi tesis.
- A la Facultad de medicina y Psicología, Por haberme permitido realizar los experimentos de este proyecto en sus instalaciones y a sus trabajadores recibirme amigablemente me sentí muy cómoda trabajando en esa Facultad todas las personas que me auxiliaron en algún determinado momento se portaron muy amables y eso habla muy bien de toda la Facultad.
- Al Centro de graduados del ITT especialmente al Dr. Ignacio Rivero Espejel, Por haberme permitido trabajar con sus compuestos.
- A los Profesores, Dr. José Manuel Cornejo, Por orientarme siempre que lo requerí, aconsejarme y apoyarme durante la realización del proyecto y al momento de querer presentar la tesis. Dra. Alejandra Chávez Santoscoy, Por haber creído en mí y recomendarme para involucrarme en proyectos de investigación también por impulsarme siendo yo su alumna de licenciatura a querer investigar más allá de lo que nos enseñan en las clases.

- A la Dra. Aracely Serrano, Por darme la oportunidad de trabajar con ella por creer en mí, ser mi guía por su comprensión, paciencia, tiempo, valiosos consejos a lo largo del proceso de la investigación por impulsarme hacer algo más por la confianza que ha depositado en mí le voy a estar eternamente agradecida trabajar muy cómoda bajo su dirección es una persona muy preparada y capaz que amerita admiración, es muy dedicada como profesionista y como persona es extraordinaria muy humana, comprensiva y siempre busca la manera de ayudar a los demás.



## **DEDICATORIA**

A mis padres:

**Juan Luis y Rosario Aidee**

Por su apoyo y motivación incondicional siempre que les comenté lo que quería hacer tuve la misma respuesta “como tú quieras nosotros te apoyaremos siempre hasta donde podamos y si no a ver cómo le hacemos” y nunca recibí un “No” como respuesta al momento de plantearles alguna actividad que quería realizar, he llegado hasta donde estoy gracias al apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida y por eso este trabajo se los dedico a ustedes dicen que nadie sabe cómo ser padres, pero para mí ustedes son los mejores padres del mundo.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Antecedentes

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo comúnmente relacionado con la edad; existen tratamientos para la enfermedad los cuales son inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa (AChE) (Arunrungvichian et al., 2015)

El receptor de acetilcolina  $\alpha 7$  nicotínico (nAChR) es una reconocida diana farmacológica para las demencias de envejecimiento y ciertos trastornos del desarrollo. Los nAChR más abundantes en la corteza cerebral y el hipocampo, áreas cerebrales asociadas con la cognición y la memoria, son los subtipos  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$ . La expresión del receptor  $\alpha 7$  no se limita a la corteza cerebral y el hipocampo, sino también se encuentran en regiones límbicas subcorticales, regiones talámicas y ganglios basales. (Taly, A. et al., 2009). La activación de  $\alpha 7$ -nAChR por compuestos agonistas, es decir, PNU-282987; conduce a procesos procognitivos y actividades neuroprotectoras. Estos hallazgos apoyan el papel de agonistas  $\alpha 7$ -nAChR en la mejora de la cognición cuando surgen déficits (Hanssen et al., 2007).

En el campo de la química medicinal, la familia de compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno como heteroátomos en la estructura de anillo de cinco y seis miembros desempeña un papel importante. Las oxazolonas son de esos compuestos heterocíclicos de cinco miembros que se encuentran en tres formas isoméricas, una según la ubicación del grupo carbonilo y de acuerdo con la ubicación del doble enlace que contiene (Bala et al., 2011),

Las oxazolonas son importantes en la síntesis de diversos fármacos, el esqueleto de oxazolona muestra diversas actividades biológicas, tales como,

antimicrobiano (Naganagowda G., et al. 2011), antidiabético (Mariappan G., et al., 2011), antivírico (Pinto I.L., et al., 1996 ), antimicótico (Bala S. et al., 2012), anticancerígeno (Jat R., et al., 2012), cardioprotector (Dobhal Y. et al., 2014), alérgeno de contacto (Kupera F. et al., 2011), antiinflamatorio, antiobesidad, antidepressivo (Akram W. et al., 2014), anti-VIH (Witvrouw M. et al., 2002), antiangiogénico (Sierra F. et al., 2002), anticonvulsivo (Fared G. et al., 2013), sedante (Khan K, et al., 2006), inhibidor de la tirosinasa, (Abdel-Aty et al., 2009) fungicida y herbicida (Abdel-Aty et al., 2009) .

Recientemente Cavas et al., 2017 sintetizaron un grupo de oxazolonas y las caracterizaron farmacológicamente como inhibidores de la Acetilcolinesterasa (AChE) recomendando una mayor investigación que involucre estudios in vivo.

Por otra parte, Zangh et al., 2014 afirman que algunos derivados de oxazolona actúan como potentes agonistas de los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChRs) y recomiendan utilizarlos como insecticidas ya que actúan como la acetilcolina causando una excitación nerviosa continua que provoca la muerte del insecto.

Previamente se sintetizaron cinco compuestos derivados de oxazolonas sustituidas, se caracterizaron farmacológicamente, obteniendo una alta afinidad en escala micromolar a la acetilcolinesterasa (AChE); además de comportarse como inhibidores reversibles. El compuesto derivado de oxazolona sustituidas 4-((Z)-benzilideno)-2-((E)-stiril)oxazol-5(4H)-ona (**Az16**) por su gran afinidad a la enzima, se evaluó para determinar una mejora cognitiva en memoria a corto plazo. Se utilizó como estándar de referencia la tacrina, un inhibidor de acetilcolinesterasa

centralmente activo y el PNU-282987 un agonista de  $\alpha 7$ -nAChR. Se seleccionó que PNU-282987 fuera un representante de la referencia agonista  $\alpha 7$ -nAChR para la comparación de perfiles *in vivo*. Se evaluó el antagonismo funcional del MLA para verificar que el realce cognitivo estuvo mediado por la activación de  $\alpha 7$ -nAChR. La escopolamina, un antagonista muscarínico, se utiliza para perjudicar la neurotransmisión colinérgica, demostrada para provocar déficit en pacientes con Alzheimer e inducir estado amnésico (amnesia inducida farmacológica).

El compuesto **Az16** se utilizó para la mejora cognitiva en la amnesia inducida farmacológicamente en ratones utilizando dos modelos conductuales: Estos dos modelos reflejan diferentes tipos de memoria para el análisis de déficit: memoria de trabajo espacial para Y-laberinto modificado (LYM) y memoria episódica de corto plazo para caja de reconocimiento de objetos (ORT).

El compuesto se evalúa también por sus efectos sobre diferentes tipos de deterioro de la memoria mediante el uso de modelos de ratón para los déficits cognitivos. Se utilizaron dos modelos de pruebas de comportamiento, es decir, **Y-laberinto** modificado (LYM), reconocimiento de objetos (**ORT**) en ratones, para evaluar estos agonistas de  $\alpha 7$ -nAChR en mejoras cognitivas para memoria a corto y largo plazo en modelo de ratón amnésico inducido por escopolamina

## 1.2 Objetivo general

Evaluar el efecto *in vivo* de novedosos compuestos derivados del compuesto 4-((Z)-benzilideno)-2-((E)-stiril)oxazol-5(4H)-ona (**Az16**) sobre el sistema nervioso central de ratones con déficit de memoria y su influencia en la mejor de la cognición.

### 1.3 Objetivos específicos

1.- Determinar la mejora del déficit cognitivo inducido por escopolamina:

- Obtener el porcentaje de exploración al brazo desconocido utilizando la prueba del laberinto Y modificado.
- Obtener el índice de discriminación a nuevos objetos analizando la prueba de reconocimiento a objetos nuevos.

2.- Determinación de la Mejora Cognitiva a través  $\alpha 7$ nAChR mediante su desaparición con MLA

- Obtener la dosis mínima efectiva y el mecanismo de acción del compuesto 2-estiril-4-benzoiloxazolin-5-ona (**Az16**)
- Obtener el índice de discriminación a nuevos objetos por la prueba de reconocimiento a objetos nuevos (ORT)

### 1.4 Justificación

El  $\alpha 7$ hAChR es un receptor homopentamérico con cinco subunidades que rodean un poro de iones que regula la permeabilidad de cationes sobre todo a  $Ca^{+2}$ . La expresión de este subtipo de receptor no se limita a la corteza cerebral y el hipocampo, también se encuentra en las regiones subcorticales límbicas, regiones talámicas y los ganglios basales. La activación de los receptores  $\alpha 7$ hAChR's por compuestos agonistas como el PNU-282987 y otros compuestos agonistas importantes, conducen a actividades pre cognitivas y neuroprotectoras. Estos resultados apoyan el papel de los agonistas de los receptores  $\alpha 7$ hAChR's en la mejora de la cognición cuando surgen déficits. 4-((Z)-benzilideno)-2-((E)-stiril)oxazol-5(4H)-ona (**Az16**) basados en oxazolonas sustituidas, se ha caracterizado

previamente y el compuesto presentó una alta afinidad en la escala de nanomolar a la acetilcolinesterasa (AChE) por lo que podrían ser potencial farmacológico para el tratamiento de trastornos cognitivos y en enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, su selectividad y su influencia sobre la cognición no se han establecido *in vivo*.

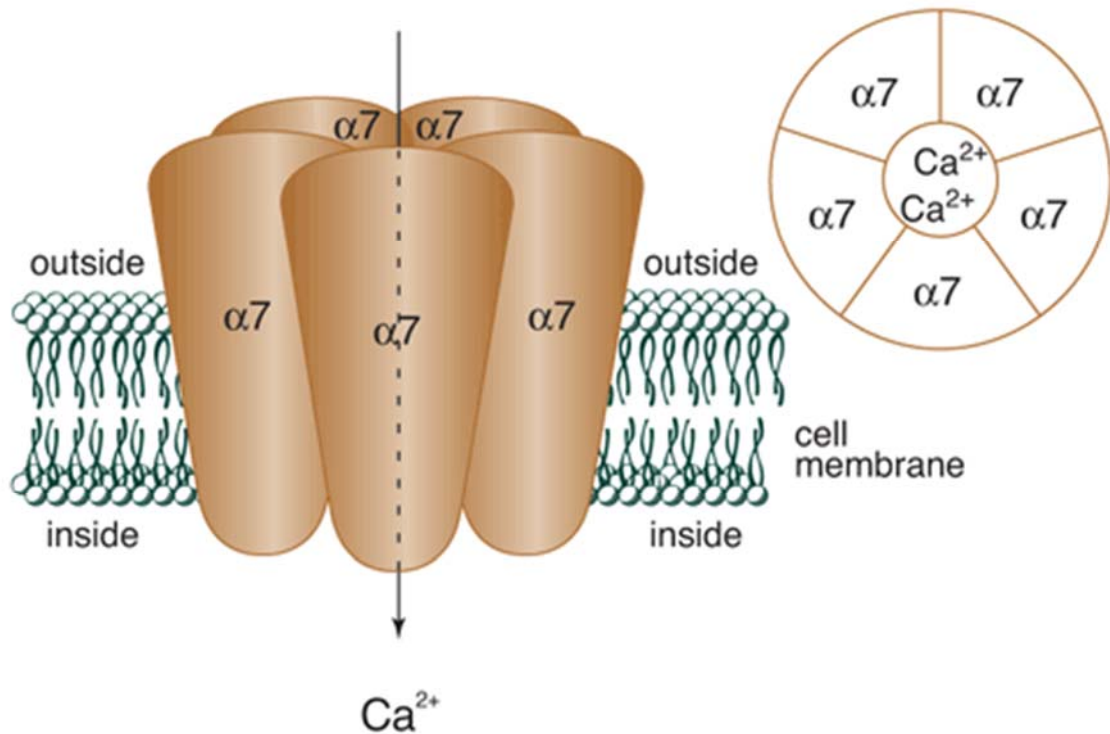
**CAPITULO II**  
**MARCO TEORICO**

## 2.1 Receptores $\alpha 7$ nicotínicos de la acetilcolina ( $\alpha 7$ nAChR)

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) son miembros de la familia Cys-loop, son receptores neurotransmisores excitatorios, activados por el neurotransmisor endógena acetilcolina (ACh), los nAChR están presentes en el sistema nervioso central (SNP) y periférico (SNP). En el SNC, se encuentran presinápticamente donde modulan la liberación de varios neurotransmisores: dopamina, noradrenalina, GABA, glutamato (Turner, JR y Kellar, KJ 2005) y postsinápticamente, también están presentes en células no neuronales donde controlan múltiples funciones. Estas proteínas alostéricas integrales tienen una masa molecular aproximada de 290 kDa. Basado en estudios estructurales, los nAChRs neuronales (Morales-Pérez, C. et al., 2016) y musculares (Unwin, N. 2005) consisten en cinco subunidades dispuestas alrededor de una membrana central que abarca un poro que es permeable a los cationes. Este canal catiónico no específico permite que los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  se difundan a través de la membrana, dando como resultado la despolarización de la membrana (**Figura 1a-b**). Cada subunidad tiene un gran dominio extracelular N-terminal (ECD), un dominio transmembrana (TMD), que comprende cuatro segmentos y un dominio citoplasmático variable (Morales-Pérez, C. et al., 2016; Unwin, N. 2005; Taly, A. et al. 2009) (**Figura 1a**).

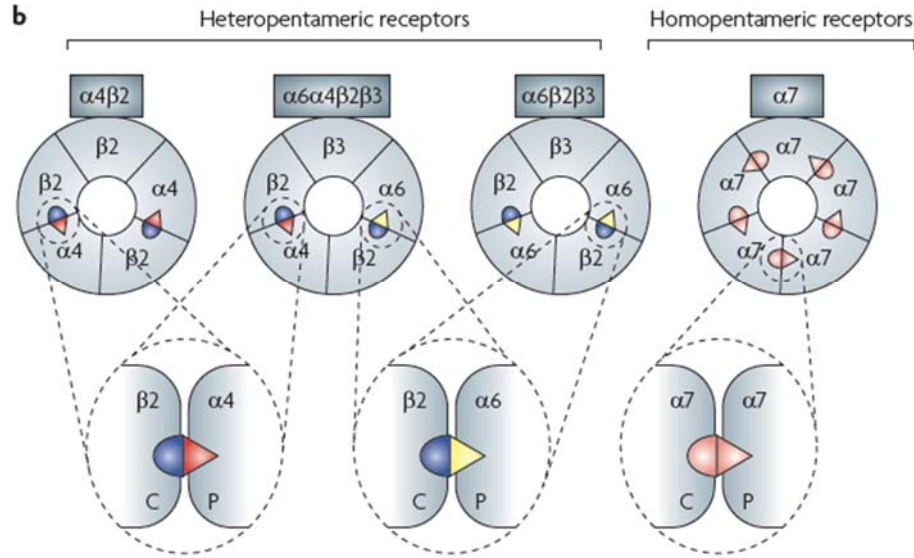
El receptor  $\alpha 7$  nicotínico de acetilcolina ( $\alpha 7$ nAChR) es un objetivo terapéutico potencial para el tratamiento de los déficits cognitivos asociados con la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y el trastorno por déficit de atención con hiperactividad. La activación de  $\alpha 7$ nAChR

mejora la activación sensorial y la función cognitiva en modelos animales y en ensayos clínicos tempranos (Dinklo et al., 2011)

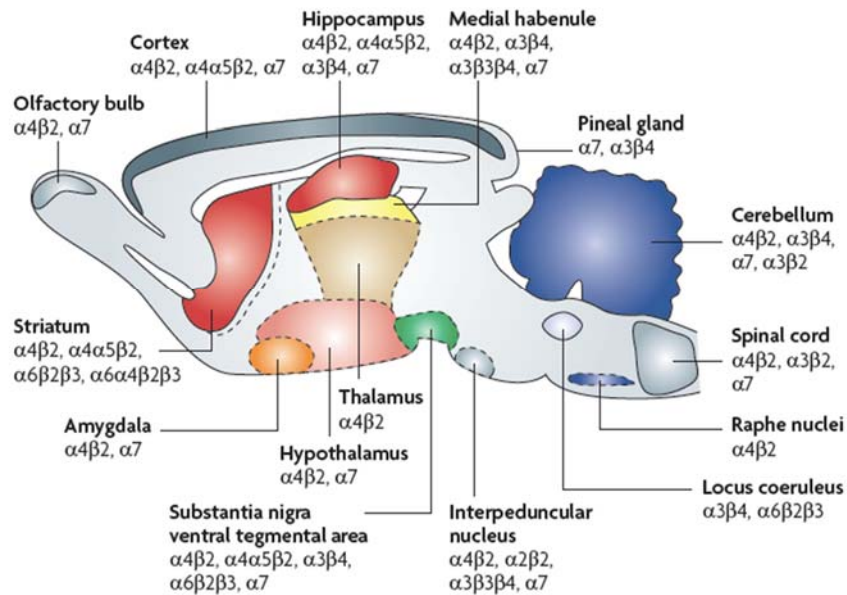


**Figura 1. a)** Vista paralela del  $\alpha 7$  nAChR **b)** Vista apical del  $\alpha 7$ nAChR. (Figura tomada de Davis and Fiebre., 2006).

Los nAChR neuronales comprenden solo subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y pueden ensamblarse en homopentámeros o heteropentámeros (**Figura 2**), esto les confiere una variedad de formas posibles de ensamblaje que conducen a una amplia diversidad de subtipos de nAChR, cada subtipo tiene farmacología, fisiología diferente y distribución a través del SNC (Gotti, C. et al., 2006; Taly, A. et al., 2009) (**Figura 3**), el  $\alpha 7$ nAChR, por ejemplo, es altamente expresivo en el hipocampo y la corteza, donde modula la cognición, procesamiento sensorial, atención y memoria de trabajo.



**Figura 2.** Posibles ensamblajes de subunidades para formar subtipos funcionales, los triángulos representan la cara principal del sitio de unión, mientras que la C o el semicírculo representa la cara complementaria (Gotti, C. et al. 2006, figura tomada de Taly, A. et al. 2009).



**Figura 3.** Amplia distribución de nAChR en el cerebro (Gotti, C. et al., 2006, figura tomada de Taly, A. et al., 2009).

El  $\alpha 7$ nAChR es el único receptor homopentamérico expresado en el cerebro, y se encuentra que es expresivo en la amígdala, la región olfativa, la corteza, la médula espinal, el hipocampo, el cerebelo y el hipotálamo (**Figura 3**). Controla diferentes procesos tales como: cognición, aprendizaje, memoria, emoción incluyendo ansiedad y depresión, procesamiento sensorial.

El  $\alpha 7$ nAChR no neuronal participa en el control de la proliferación, la adhesión, la migración, la secreción, la supervivencia y la apoptosis (Taly, A, Charon, S. 2012). Como se describió anteriormente, están presentes y juegan un papel fundamental en las funciones fisiológicas clave que emergen como un objetivo importante para el tratamiento de varias enfermedades y trastornos, como el Alzheimer y la esquizofrenia.

## **2.2 La Acetilcolinesterasa (AChE)**

El papel primordial de la acetilcolinesterasa (AChE) es la hidrólisis rápida del neurotransmisor acetilcolina (ACh) de los receptores nicotínicos (nAChRs) en las sinapsis colinérgicas. La reacción de hidrólisis procede por ataque nucleófilo al grupo carbonilo, acilación de la enzima y liberación de ACh. Posteriormente, se hidroliza la enzima acilada dando ácido acético, regenerándose la enzima. Los inhibidores que actúan sobre el centro activo de la enzima impiden la unión de una molécula de sustrato o su hidrólisis, mediante el bloqueo del sitio por su alta actividad reaccionando irreversiblemente con la serina próxima al centro catalítico. La AChE, es una enzima presente en la terminación postsináptica, hidroliza rápidamente a la ACh, lo que conlleva la repolarización de la membrana o de la

placa basal en las conexiones neuromusculares y las prepara para la llegada de un nuevo impulso. Así pues, la función normal de la ACh depende de su rápida hidrólisis por la AChE, que permite la brevedad y unidad de los impulsos propagados sincrónicamente. El ácido acético liberado pasa a sangre, mientras que la colina es recuperada por las neuronas para la síntesis de nuevas moléculas de neurotransmisor. La transmisión de los impulsos nerviosos entre dos neuronas tiene lugar en la sinapsis o conexión entre ambas. Esta sinapsis está formada por la membrana presináptica, la hendidura sináptica y la membrana postsináptica. El impulso nervioso se transmite de la siguiente manera:

1) La llegada de un potencial de acción despolariza la membrana presináptica, lo que provoca la apertura de canales iónicos.

2) El  $\text{Ca}^{2+}$  entra y el aumento de su concentración hace que las vesículas de la ACh, se unan a la membrana y liberen, por exocitosis a la ACh en la hendidura sináptica.

3) En la membrana postsináptica están los receptores de la ACh lo que provoca la apertura de los canales iónicos en esta membrana. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y de otros cationes produce la despolarización y excitación de la membrana postsináptica, y esa despolarización se propaga hasta la siguiente célula nerviosa o a la placa motora correspondiente.

4) La ACh después de actuar es rápidamente inactivada por la AChE para que pueda repolarizarse la membrana y pueda transmitir sucesivamente nuevos impulsos nerviosos, [Taylor, P. 2017]

### 2.3 Acetilcolinesterasa en memoria y cognición

La acetilcolina es uno de los neurotransmisores más estrechamente involucrados en funciones de memoria, consolidación, y recordar. Es un mensajero químico clave utilizado por tus neuronas para transmitir señales entre sí que garantizan nuestro procesamiento cognitivo, así como nuestros pensamientos básicos.

El trabajo de la acetilcolinesterasa es controlar la excitación colinérgica que ocurre en el cerebro por la señalización de la acetilcolina en la hendidura sináptica. Una vez que la acetilcolina ha sido ligada a su receptor ( $\alpha_7$ nAChRs), para crear lo que se conoce como un potencial de acción y ejercer el efecto a nivel neuronal para la memoria y cognición, además de controlar el sistema nervioso parasimpático.

Si la AChE se encuentra inhibida ya sea por un inhibidor reversible o irreversible existe una sobre estimulación neuronal ya que la acetilcolina está unida a su receptor porque no es hidrolizada por la AChE; entonces ocurre la sobre estimulación ayudando a los pacientes con déficit de memoria que carecen del neurotransmisor acetilcolina. Una sobre estimulación en el sistema nervioso parasimpático por la acumulación de la ACh puede causar coma y la muerte en el paciente, pero los inhibidores reversibles de la AChE logran controlar la acumulación del neurotransmisor sólo para realizar las funciones cognitivas (Taylor, P. 2017).

## 2.4 Papel de $\alpha 7$ nAChR en la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa mundial más común de demencia y se cree que se duplica cada 20 años, representa el 70% de todos los casos de demencia. La demencia es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por el deterioro en la cognición y la memoria, la función (incluida la coordinación motora) y el comportamiento (Reitz, C. et al., 2011; Buckingham, S. D. y otros, 2009). La EA se caracteriza por la acumulación de depósitos de las placas de 39-42 aminoácidos amiloide- $\beta$  ( $A\beta$ ), y ovillos neurofibrilares, compuestos de proteína tau hiperfosforilada, pérdida neuronal y una pérdida sináptica prominente (Spiers-Jones, TL; Hyman, BT, 2014).

El sistema colinérgico juega un papel importante en la cognición, los estudios han demostrado que es importante en la memoria a largo plazo. Las neuronas colinérgicas degenerarán con el envejecimiento, dando lugar a una hipofunción colinérgica que dará como resultado una disminución progresiva de la cognición, jugando un papel clave en las primeras etapas de la enfermedad. Los nAChR son mediadores importantes de la señalización colinérgica en la modulación del aprendizaje y la función de la memoria.

El  $\alpha 7$  nAChR está altamente expresado en el hipocampo y la corteza, la primera mención es una región muy afectada en AD (Gotti, C. et al., 2006). La interacción entre  $A\beta$  y  $\alpha 7$ nAChR se ha demostrado ampliamente (Wang, H. Y. y otros 2000, Dineley, K. T. 2007; Oz, M. et al., 2013). Los primeros experimentos mostraron interacción entre  $\alpha 7$  nAChR y  $A\beta$  en placas seniles de cortes cerebrales de pacientes que padecían AD (Wang, H. Y. y otros 2000, Lombardo, S. y Maskos

U. 20015). Los estudios de competencia realizados incubando  $\alpha 7$  nAChR con  $A\beta$  y usando  $^{125}I$ - $\alpha$ -Bungarotoxin para desplazar a  $A\beta$ , mostrando una cantidad disminuida de  $A\beta$  se unen a  $\alpha 7$  nAChR, lo que demuestra que ambos, la toxina y el péptido compiten por el mismo ortostérico sitio.

Existen discrepancias reportadas en la literatura sobre las consecuencias funcionales de la interacción nAChR- $A\beta$ , algunas de ellas reportan inhibición, por ejemplo, Pettit, D.L. et al. informaron en 2001 que  $A\beta$  1-42 inhibe las respuestas al bloquear  $\beta 7$  nAChR postsinápticamente en las interneuronas del hipocampo de rata. Por otro lado, la activación se informó en concentraciones picomolares de  $A\beta$  1-42 por Dineley, K. T. et al. en 2002 utilizando un sistema de oocitos de *Xenopus* que expresa  $\alpha 7$  nAChR. Antes de tratar de concluir algo, es importante tener en cuenta que los resultados son variables porque utilizaron diferentes enfoques y diferentes concentraciones de  $A\beta$ . Cuando tratamos de traducir la información de los ratones a los humanos, a una relevancia más fisiológica, no ha sido completamente exitosa. Lo que está claro es que el  $\alpha 7$  nAChR desempeña un papel en la AD, se deben realizar más estudios para comprender mejor la enfermedad. Teniendo en cuenta la heterogeneidad de AD, es muy posible que sea necesario un enfoque multitarget. La única terapia aprobada para AD son los inhibidores de la acetilcolinesterasa (galantamina, donepezilo y rivastigmina) y la memantina, un bloqueador del receptor NMDA. Con costos de salud estimados de miles de millones de dólares por año y que afectan a 36 millones de personas en todo el mundo, según los NIH, se espera que la cifra aumente a 115 millones para el año 2050 a menos que se desarrollen terapias más efectivas.

## **2.5 Inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa**

En farmacología, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, inhibidor de la colinesterasa, anticolinesterasa o anticolinesterásico, es un compuesto químico que inhibe a la enzima AChE impidiendo que se destruya la acetilcolina liberada, produciendo como consecuencia un aumento en la concentración y en la duración de los efectos del neurotransmisor. Los inhibidores reversibles interaccionan con la enzima cerca del sitio catalítico sin producir complejos covalentes. Este grupo está compuesto por tres grandes familias: tacrinas, con numerosos análogos (velnacrina, suronacrina y 7-metoxitacrina y amiridina), las N-bencilpiperidinas (donezepilo) y los alcaloides (galantamina y huperzina A) (Colevic et al., 2017).

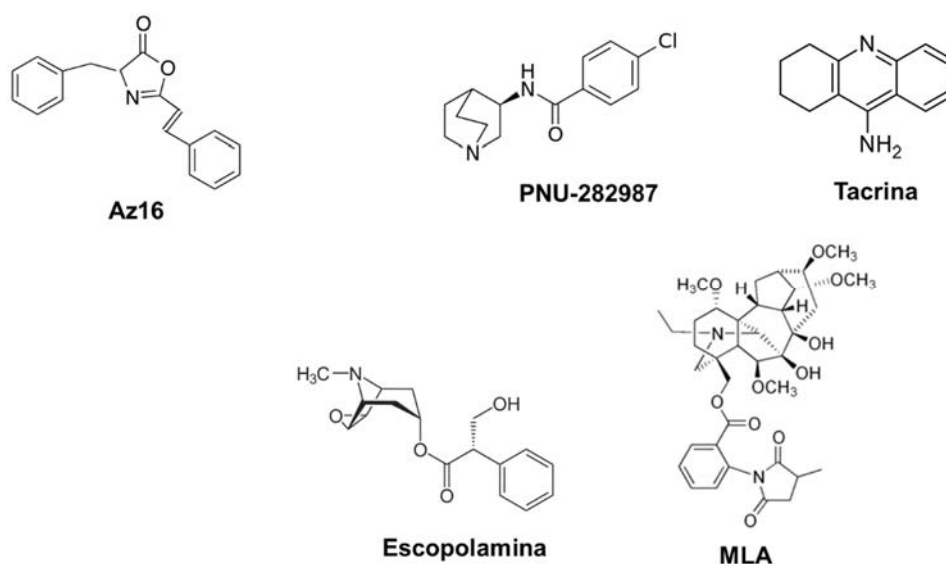
Entre algunos ejemplos de los fármacos inhibidores de la AChE está la Tacrina que es un anti-colinesterasa de acción central y un agonista colinérgico indirecto (parasimpatomimético). Fue el primer inhibidor de la colinesterasa de acción central aprobada para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, y fue comercializada bajo el nombre de Cognex. La tacrina fue primeramente sintetizada por Adrien Albert en la Universidad de Sídney. También actúa como inhibidor de la histamina N-metiltransferasa. También está como ejemplo el Donepezilo, derivado de la piperidina, es un inhibidor específico y reversible de la acetilcolinesterasa que se utiliza para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer leve y moderada. Su efecto inhibe la hidrólisis de la acetilcolina, compensando de esta forma la pérdida de función de las neuronas colinérgicas que se da en esta enfermedad. (Hagstrom, D. et al., 2017), (Colevic et al., 2017).

**CAPITULO III**

**PARTE EXPERIMENTAL**

### 3.1 Material y reactivos

Para este proyecto, se utilizaron diversos compuestos para realizar la parte experimental (Figura 4). Tacrina, un inhibidor central de la acetilcolinesterasa activa y PNU-282.987 un agonista de  $\alpha 7nAChR$ , fueron empleados como estándares de referencia. Se utilizó escopolamina para inducir amnesia a corto plazo. Se determinó la mejora cognitiva mediada por  $\alpha 7hAChR$ 's mediante su desaparición después del pretatamiento con metilcaconitina (MLA) un antagonista selectivo de  $\alpha 7hAChR$ 's. Todos los compuestos de prueba descritos anteriormente se adquirieron en Sigma Aldrich México. Los compuestos derivados de oxazolonas, fueron previamente sintetizados y caracterizados por el Dr. Ignacio Rivero Espejel, Investigador del Centro de graduados e Investigación. La caracterización farmacología de los compuestos fue previamente analizada por la Dra. Aracely Serrano Medina en el laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Medicina y Psicología.



**Figura 4.** Estructura química de los compuestos utilizados como estándares de referencia y compuestos para provocar el déficit de memoria, así como el compuesto de prueba

## **3.2 Ensayos in vivo.**

### **3.2.1 Modelo animal.**

Se utilizaron ratones macho ICR de 6 semanas de edad suministradas por el bioterio de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California. Se agruparon cinco ratones por jaula con hidratación y alimentación bajo libre demanda. Se mantuvieron bajo ciclos de iluminación por periodos de 12 horas. (Luz de 6:00 a 18:00 horas) con temperatura y humedad controlada. Se ambientaron en el laboratorio al menos 7 días antes de comenzar los experimentos.

### **3.2.2. Preparación y administración de los compuestos.**

Se utilizó Tacrina, PNU-282987 y los compuestos de prueba los cuales se prepararon como una solución utilizando solución salina (SS) como vehículo. Los compuestos escopolamina y la metilcaconitina (MLA) se prepararon también como una solución disolviéndolos con solución salina al 0.9% (SS). Todos los compuestos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.). El compuestos de prueba (**Az16**) se administró 1 hora antes de comenzar con los experimentos del comportamiento, la escopolamina 30 min antes y la MLA se inyectó 5 minutos antes de los compuestos de prueba.

## **3.3 Determinación de mejora en el déficit cognitivo inducido por escopolamina.**

El compuesto **Az16** por ser el más potente inhibidor, se evaluó para determinar su mejora cognitiva en la amnesia inducida farmacológicamente con escopolamina en ratones utilizando dos modelos conductuales. Estos dos modelos reflejan diferentes tipos de memoria para el análisis de déficit de memoria o cognición: Memoria de trabajo espacial para Y-laberinto modificado y memoria episódica a corto plazo para ORT. De acuerdo con

los resultados que se obtienen de los modelos anteriores, se determina la dosis mínima efectiva de acuerdo a la respuesta comparándola con los fármacos estándares de referencia. Para realizar los siguientes experimentos se utilizó el método realizado por Arunrungvichian et al. 2015. Los ratones se dividieron en cuatro grupos: (i) grupo vehículo, los cuales recibieron SS al 0.9%, (ii) grupo amnesia, recibieron escopolamina; (iii) grupo control positivo estándar, recibieron tacrina y (iv) grupo de prueba, recibieron Az16 a cinco dosis diferentes (5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}/\text{kg}$ ) y dosis únicas de PNU PNU-282987 sólo para laberinto en Y. Todos los ratones se aclimataron en el laboratorio al menos 30 min antes de los experimentos.

### **3.3.1. Prueba del laberinto Y modificado.**

Los ratones fueron separados al azar dentro de los diferentes grupos de tratamiento. Los ratones fueron administrados con los compuestos de prueba y escopolamina 1h y 30 min respectivamente, antes de la fase de muestreo. En esta fase donde un brazo del laberinto Y fue cerrado por el tabique negro, cada ratón fue puesto al final de un brazo y se le permitió moverse a través de dos brazos durante 5 minutos para familiarizarse con los dos brazos abiertos. Después de 30 min de descanso, todos los brazos fueron abiertos y al ratón se le permitió moverse libremente a través de los tres brazos. El área del laberinto y el tabique se limpiaron con etanol al 70% entre cada experimento para remover señales olfativas. El número de entradas en cada brazo se contó visualmente siempre y cuando el ratón acceda a cada brazo al menos 10 cm. El porcentaje de exploración al brazo desconocido se calculará con la siguiente ecuación:

**Porcentaje de exploración al brazo desconocido =**

$$\frac{\text{Número de entradas al brazo desconocido}}{\text{Número de entradas a todos los brazos}} \times 100$$

### **3.3.2. Prueba de reconocimiento a objetos nuevos (ORT).**

Para realizar esta prueba se utilizó una caja (52 × 52 × 40 cm<sup>3</sup>) y diferentes objetos. Los objetos que se utilizaron tuvieron diferentes formas y colores visuales para ser discriminados. Dentro de una caja negra, se colocó un objeto familiar y un objeto nuevo. Se colocaron 10 cm desde la pared lateral de la caja de manera equilibrada. El área de la caja y de los objetos se limpió con etanol al 70% entre cada experimento para eliminar señales de olor. Los ratones fueron divididos al azar dentro de los diferentes grupos de tratamiento. En el día 1 al inicio del experimento, se les permitió a los ratones explorar libremente la caja de campo abierto durante 5 min para que se habitúen con el área. En el día 2 los compuestos de prueba se administraron 1h y la escopolamina 30 min antes de la fase de muestra respectivamente (**fase de adquisición**). Los ratones se colocaron en la caja para explorar dos objetos idénticos. Después de 10 min de la aclimatación en sus cajas, un objeto fue cambiado por un objeto nuevo, y los ratones se les permitió explorar esos objetos por 5 min en la fase de prueba (**fase de retención**). El tiempo de exploración de cada objeto se registró siempre y cuando la nariz de los ratones se aproximase a los objetos dentro de 3 cm o si logran tocar a los objetos. El índice de discriminación (DI) se calculó con el tiempo de exploración de los nuevos objetos (TN) más el tiempo de exploración de los objetos familiares (TF); **DI = TN-TF/(TN + TF)**.

### **3.4. Determinación de Mejora Cognitiva a través de $\alpha 7$ - nAChR.**

Para desarrollar este experimento se utilizó el método ORT, según (Arunrungvichian et al. 2015): Para verificar que el mecanismo de acción de los compuestos sobre la mejora de cognitiva mediada por  $\alpha 7$ -nAChRs, se escogieron las dosis efectivas mínimas del compuesto **Az16** resultado de los experimentos anteriores.

En este experimento el protocolo fue el mismo como se ha mencionado anteriormente para ORT excepto por la administración de MLA, un antagonista selectivo  $\alpha 7$ -nAChR, se inyectó a los ratones 5 min antes que de los compuestos de prueba en la fase de muestra (día 2) para bloquear la mejora de la cognición de los compuestos de prueba. La dosis de los compuestos de prueba se seleccionó dependiendo de la determinación de la dosis mínima efectiva. El tiempo de exploración de cada objeto se registrará si la nariz del ratón llega a 3 cm o tocar los objetos. El índice de discriminación (DI) se calculará mediante el uso de la ecuación  $(TN - TF) / (TN + TF)$ ; TN y TF representados como tiempo de exploración de objetos nuevos y conocidos, respectivamente.

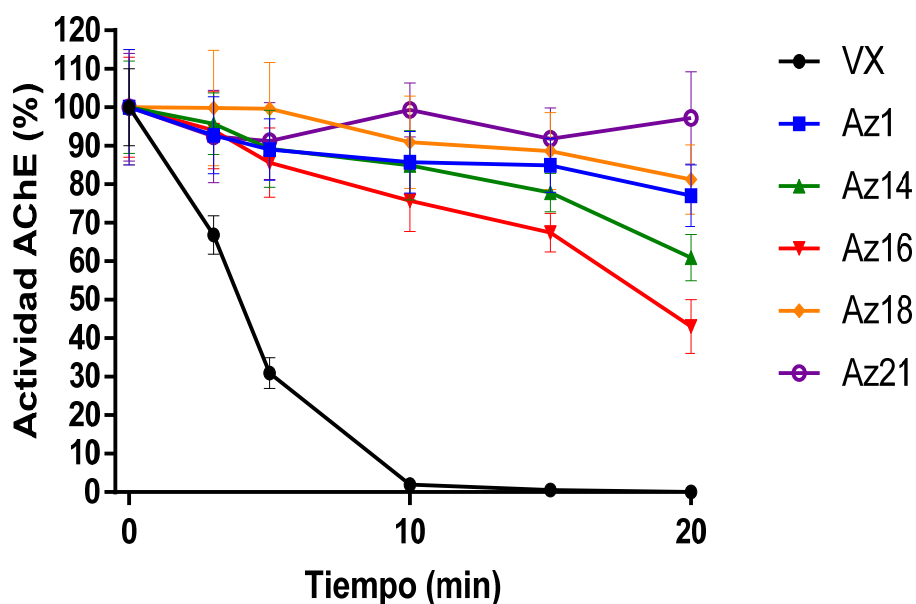
### **3.5 Análisis estadístico.**

Todos los resultados se representaron como promedios  $\pm$  desviación estándar (SD) para cada grupo de datos. Para realizar el análisis estadístico se utilizó SigmaStat32. Las diferencias de  $p < 0,05$  se consideraron significativas. Para la determinación de la mejora del déficit cognitivo inducido por escopolamina en la prueba de laberinto-Y modificado, ORT, los resultados entre los grupos de prueba y el grupo de amnesia se analizaron con ANOVA de una vía, seguido del test LSD de Fisher., excepto para el tiempo de exploración entre la muestra y la fase de prueba en ORT, estos datos se analizaron mediante la prueba t-Student. Para la determinación de la mejora cognitiva a través de  $\alpha 7$ -nAChR, se utilizó ANOVA, seguido del test LSD de Fisher para comparar el DI entre grupos de ensayo y del vehículo en el protocolo para la búsqueda de la dosis mínima efectiva y se comparó con y sin la administración de MLA para establecer un mecanismo de acción. Los tiempos de exploración entre la muestra y la fase de prueba se analizaron mediante la prueba t-Student para datos apareados.

**CAPITULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1 Síntesis y caracterización farmacológica previa de compuestos de tipo Oxazolonas.

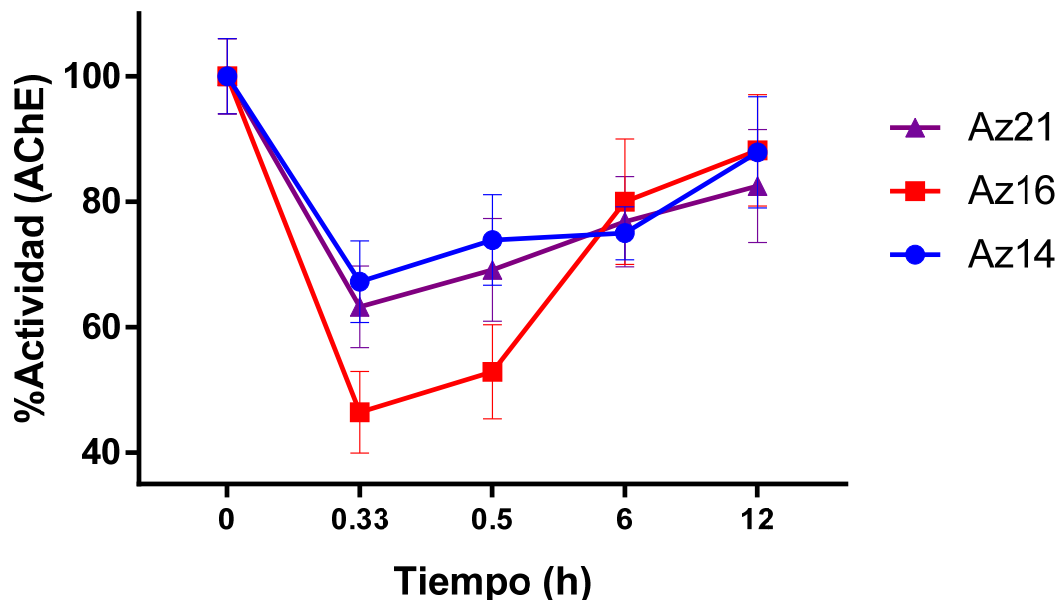
Previamente se sintetizaron y caracterizaron químicamente cinco compuestos derivados de azlactonas sustituidas, por el Centro de Graduados e Investigación. De acuerdo a la caracterización farmacológica, se obtuvo una alta afinidad a la acetilcolinesterasa en orden decreciente de los compuesto Az16>Az14>Az1>Az18>Az2, demostrando una inhibición enzimática ~50% (**Figura 5**), comparandolos con un potente inhibidor irreversible como estándar de referencia VX (agente nervioso).



**Figura 5.-** Caracterización farmacológica de los compuestos de tipo oxazolonas. Demostración de de la cinética de inhibición enzimática.

Por otra parte, se evaluó la reversibilidad de la enzima inhibida por los compuestos derivados de oxazolonas (cinética enzimática reversible), obteniendo

que el compuesto **Az16** tiende a comportarse como el inhibidor reversible más potente. (**Figura 6**). Por lo tanto la oxazolona **Az16**, por su gran afinidad a la enzima, se evaluó para determinar una mejora cognitiva tanto en memoria a corto y largo plazo en modelos animales.



**Figura 6.-** Gráfica de reversibilidad de la AChE inhibida con los compuestos derivados de azlactonas. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  DS.

#### 4.2 Determinación de mejora en el déficit cognitivo inducido por escopolamina.

Se obtuvieron ratones con déficit de memoria (amnésicos), la amnesia fue inducida farmacológicamente en los ratones vía administración de escopolamina como dosis única 30 min antes de comenzar el experimento para evaluar el fármaco estándar de referencia y el compuesto **Az16** a cinco diferentes dosis.

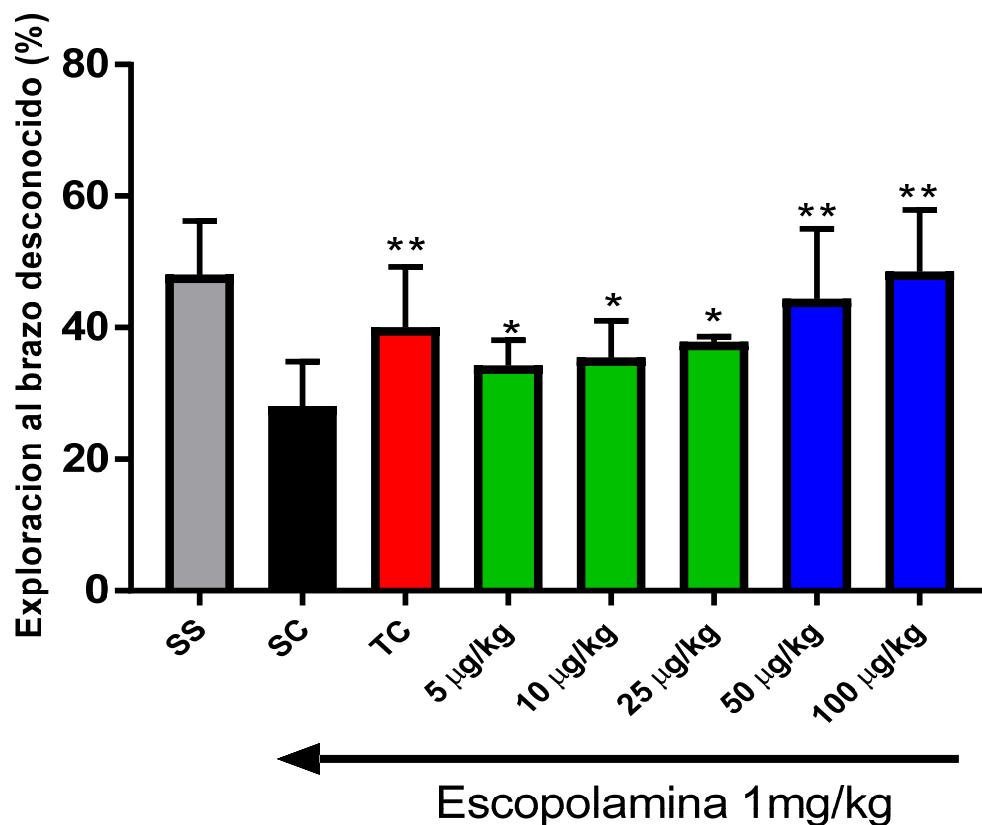
#### 4.2.1 Memoria de trabajo espacial para Y-laberinto modificado.

Se realizó la evaluación de la memoria espacial a corto plazo mediante el modelo laberinto en Y modificado. Se evaluaron diferentes dosis del compuesto Az16 5,10,25,50 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , así como los compuestos de prueba. En la **Figura 7** se pueden observar los resultados obtenidos los cuales se midieron mediante el porcentaje al brazo desconocido, obteniendo para la escopolamina un 28%, para la tacrina 40% y para el vehículo el 48%. En cuanto a las diferentes dosis evaluadas del compuesto Az16 se pueden observar en la **Tabla 1**. Con los resultados obtenidos se puede determinar que se tuvo una dosis mínima efectiva de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  del compuesto Az16 para generar una mejor cognitiva comparada con el resultado obtenido con tacrina (1mg/kg) ya que con este compuesto se puede observar que se invierte el déficit cognitivo inducido por la escopolamina. También es importante mencionar que con 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  del compuesto Az16 se obtuvo un mayor porcentaje significativo comparado con la tacrina ( $P= 0.01$ ).

<b>DOSIS</b>	<b>% EBD</b>
Vehículo	48 $\pm$ 8.2
Escopolamina	28 $\pm$ 6.8
Tacrina	<b>40 <math>\pm</math> 9.2</b>
5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Az16	34 $\pm$ 3.9
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Az16	35.43 $\pm$ 3.9
25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Az16	37.63 $\pm$ 3.9
50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Az16	<b>44.39 <math>\pm</math> 3.9</b>
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Az16	<b>48.52 <math>\pm</math> 3.9</b>

**Tabla 1.** Resultados del porcentaje de entradas al brazo desconocido. Prueba de laberinto en Y modificad. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  SD.

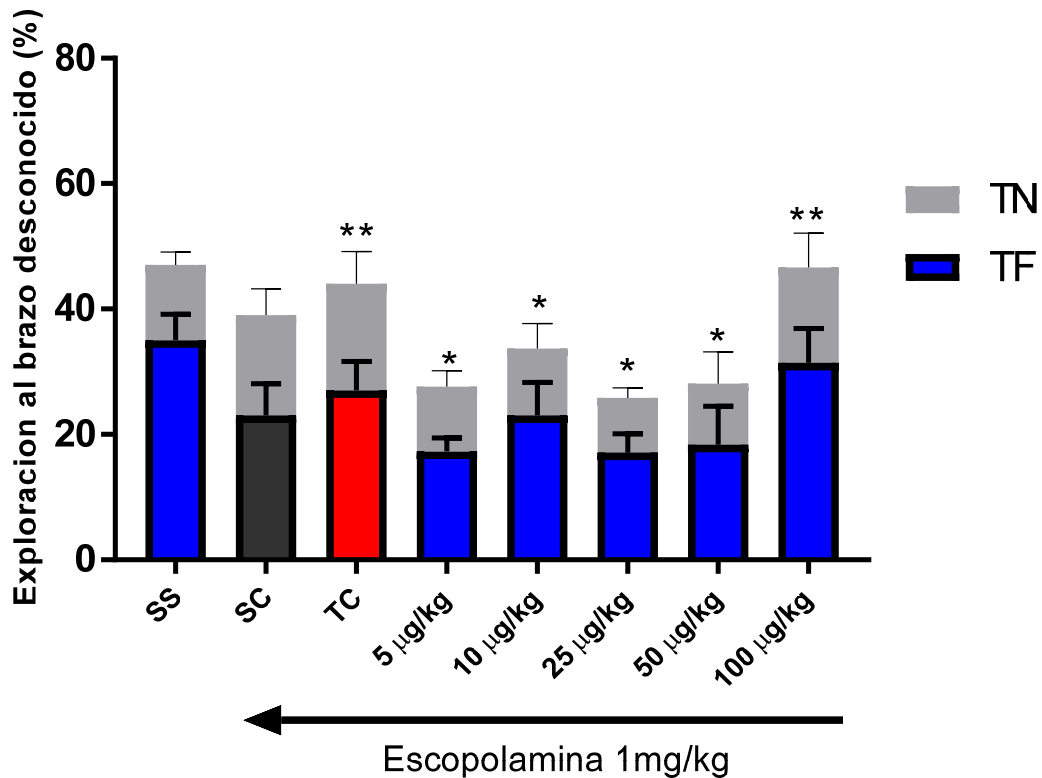
Un aumento de la exploración del brazo novedoso (novedad), cuando se compara con el grupo tratado con escopolamina, indica que el compuesto puede compensar los déficits colinérgicos y mejorar la memoria de trabajo espacial. En estos experimentos el brazo desconocido para la exploración del grupo de control deberá ser significativamente mayor que la del grupo tratado con escopolamina, (ratones en estado amnésico). La tacrina, así como los compuestos de prueba deberán invertir el déficit cognitivo inducido por la escopolamina con un mayor porcentaje de exploración en el brazo novedoso (novedad) que el ratón amnésico. ( $p < 0.005$ , One way ANOVA whit Fisher's LSD post hoc comparison).



**Figura 7.** Porcentaje de exploración al brazo desconocido. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SD, \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$  frente al grupo tratado con escopolamina, one way ANOVA comparación Fisher's LSD post hoc.

#### 4.2.2 Reconocimiento de objetos (ORT) modelo de retardo de tiempo.

Se realizó la evaluación del retardo del tiempo, memoria a corto plazo mediante la prueba de reconocimiento de objetos (ORT). Se evaluaron diferentes dosis del compuesto Az16 5,10,25,50 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , así como los compuestos de prueba. En la **Figura 8** se pueden observar los resultados obtenidos los cuales se midieron mediante el tiempo de exploración a objetos familiares (F) y el tiempo de exploración a objetos novedosos (N). Obteniendo un mayor tiempo de exploración a objetos novedosos con la dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . El efecto de los compuestos para mejorar la memoria episódica (no espacial) a corto plazo, que por lo general se altera en pacientes con Alzheimer, se evalúa mediante una ORT basada en una preferencia innata de ratones para explorar un objeto novedoso en lugar de uno familiar. El tiempo de exploración diferente entre dos objetos (familiares vs novedosos) después del tratamiento se refiere a la capacidad de los ratones para memorizar el objeto explorado. En este experimento, los ratones con amnesia inducida por la escopolamina pasaron aproximadamente el mismo tiempo explorando objetos novedosos y familiares ( $p < 0,05$ , paired Student's t test), mientras que los ratones del grupo control (SS) o los ratones amnésicos tratados con el compuesto de ensayo a diferentes dosis, exhibieron un tiempo de exploración significativamente diferente entre los objetos, lo que refleja una mejora significativa del estado amnésico ( $p < 0,05$ , paired Student's t test).



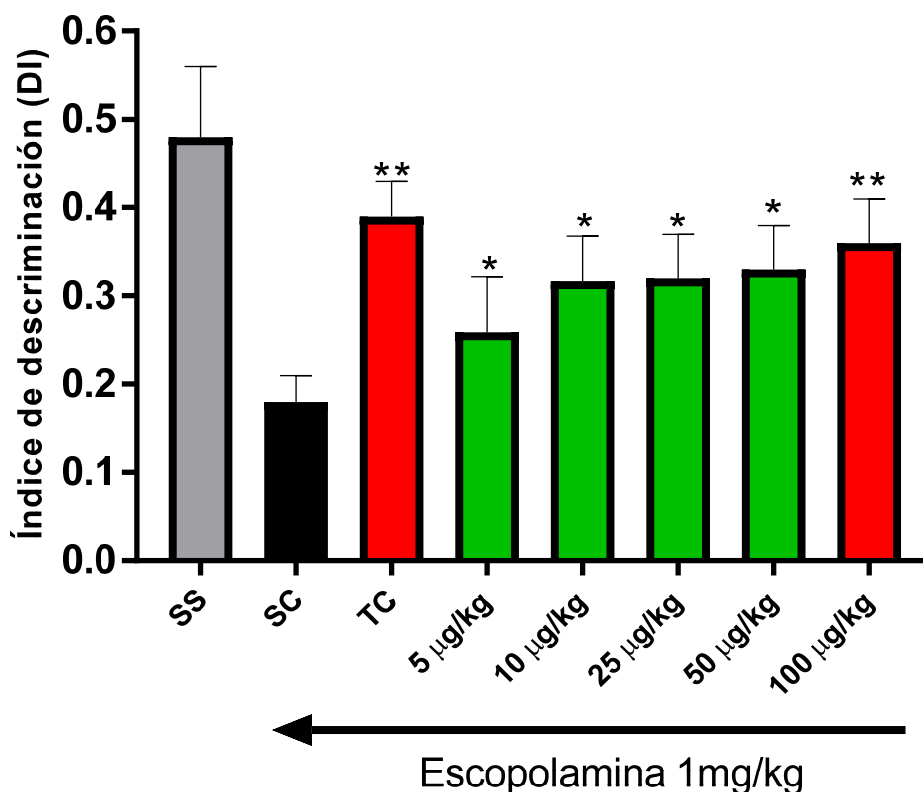
**Figura8.** Mejora cognitiva en la amnesia inducida por escopolamina (ORT). Los tiempos de exploración para objetos familiares (F) y noveles (N). n= 6–10 ratones/ grupo; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs grupo vehículo (TC), **one-way ANOVA with Fisher’s LSD post hoc comparison.**

Utilizando ambos conjuntos de datos, se calcula el índice de discriminación (DI) y se utiliza para evaluar la capacidad de los ratones para discriminar entre objetos familiares y novedosos (**Figura 9**). El DI más alto refleja la compensación para los déficits colinérgicos y la mejora en la memoria episódica a corto plazo (Tabla 2). La DI del grupo de control debe ser mayor que el grupo tratado con escopolamina, que refleja su capacidad para discriminar entre objetos familiares y novedosos. Tacrina a 1 mg/kg mejora significativamente la memoria episódica a corto plazo (p <0,05), comprobado por el aumento del DI en comparación con el

grupo amnésico. ( $p < 0,05$ , One way ANOVA with Fisher's LSD post hoc comparison).

DOSIS	% DI
Vehículo	$0.480 \pm 0.082$
Escopolamina	$0.180 \pm 0.030$
Tacrina	<b><math>0.390 \pm 0.040</math></b>
5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Az16	$0.259 \pm 0.063$
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Az16	$0.317 \pm 0.051$
25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Az16	$0.320 \pm 0.05$
50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Az16	$0.330 \pm 0.042$
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Az16	<b><math>0.360 \pm 0.056</math></b>

**Tabla 2.** Reconocimiento de objetos (ORT) modelo de retardo de tiempo. Índice de discriminación (DI). Los resultados se muestran como medias  $\pm$  SD.



**Figura 9.** Índice de discriminación ( $\text{TN} - \text{TF} / \text{TN} + \text{TF}$ ) del compuesto Az16. En la fase de prueba ORT con el protocolo del retardo del tiempo.  $n = 6-10$  ratones/grupo; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs grupo escopolamina (SC), one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc comparison.

#### 4.3 Determinación de Mejora Cognitiva a través de $\alpha 7$ - nAChR.

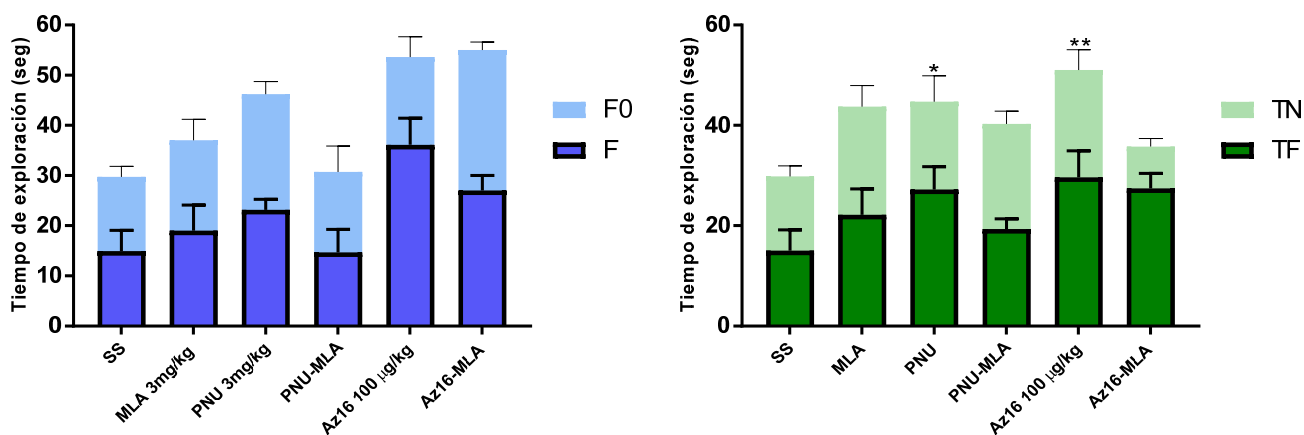
Para verificar que el mecanismo de acción del compuesto **Az16** sobre la mejora de cognitiva mediada por  $\alpha 7$ -nAChRs, se analizan las dosis efectivas mínimas de los experimentos anteriores, utilizando un antagonista selectivo  $\alpha 7$ -nAChR, la MLA.

Se inyectó metilciconitina (MLA) para bloquear la respuesta colinérgica  $\alpha 7$ -nAChR, y se utiliza el modelo ORT. Los tiempos de exploración entre dos objetos tanto en la fase de muestra como en las fases de prueba, los ratones que recibieron MLA no son significativamente diferentes; lo que indica que la propia MLA no mejora la memoria episódica. Los tiempos de exploración entre los objetos nuevos y familiares del grupo control y los grupos de pre tratamiento con MLA no son significativamente diferentes (**Figura 10**). Esto indica que los compuestos median la mejora episódica de memoria a través de  $\alpha 7$ -nAChRs, ya que MLA es un antagonista selectivo de  $\alpha 7$ -nAChR.<sup>9</sup>

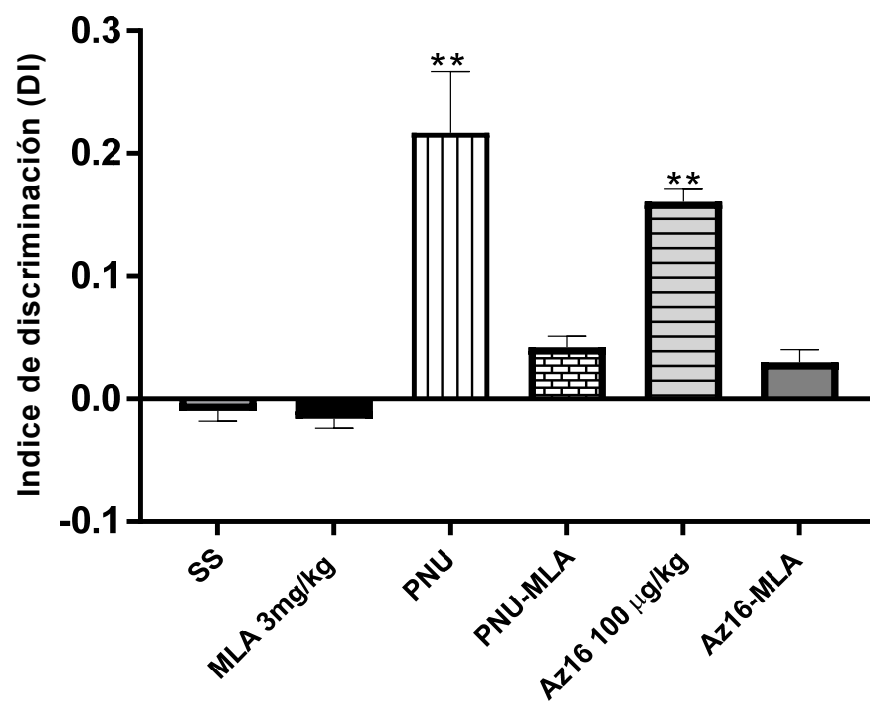
Evaluando el DI (**Figura 11**) los ratones que recibieron el vehículo no reconocen el objeto que habían explorado en la fase de muestra y el MLA no exhibió mejora cognitiva; por lo tanto, el DI en ambos grupos fue cercano a cero. Los resultados confirman el efecto previamente informado de MLA que MLA no mejora la memoria, más bien puede perjudicar la memoria. Para el compuesto de prueba **Az16**, el DI fue significativamente mayor que las del grupo control lo que indica mejora de la memoria en ratones. ( $p < 0.05$  vs control group, one way ANOVA with Fisher's LSD post hoc comparison).

La base para la acción de MLA podría surgir de un deterioro cognitivo directo por el propio antagonista o antagonismo competitivo de los compuestos de prueba.

Sin embargo, una prueba de reconocimiento deteriorada (previamente reportada) ocurrió después de un intervalo de 24 h. Además, el déficit cognitivo inducido por MLA se asocia con hipermotilidad de ratones, estas diferencias en el intervalo de tiempo de administración y la falta de hipermotilidad (Aún no detectada en nuestro estudio con Y maze) indican que el bloqueo del aumento cognitivo inducido por el compuesto de prueba **Az16** está mediado a través del antagonismo del agonista colinérgico indirecto en  $\alpha 7$ -nAChR como se observa en las diferencias de DI con y sin MLA.



**Figura 10.** Tiempos de exploración a objetos idénticos (F0 y F) en la fase de muestra Fase (A) y objetos familiares (F) y nuevos (N) en la fase de prueba (B). La ORT se utiliza para establecer que el mecanismo de acción mediado a través de  $\alpha 7$ -nAChRs.



**Figura 11.** Índice de discriminación  $(TN - TF / TN + TF)$  del compuesto Az16 en la fase de prueba de ORT para establecer el mecanismo de acción. \*\* $p < 0.01, 0.001$  vs grupo vehículo. One-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc comparison.

**CAPITULO V**  
**CONCLUSIONES**

Se evaluó el efecto *in vivo* de la oxazolona 4-((Z)-benzilideno)-2-((E)-stiril)oxazol-5(4H)-ona (**Az16**) sobre el sistema nervioso de ratones con déficit de memoria.

Se determinó la dosis mínima efectiva que mejora el déficit cognitivo inducido por escopolamina mediante la prueba del laberinto Y modificado, obteniendo un mayor porcentaje de entradas al brazo desconocido utilizando 100 $\mu$ M/kg de la oxazolona **Az16**. Se determinó la dosis mínima efectiva comparándola con la mejora cognitiva mediada por tacrina.

Se determinó la dosis mínima efectiva que mejora el déficit cognitivo inducido por escopolamina mediante la prueba de reconocimiento de objetos nuevos, obteniendo mayor índice de discriminación (DI) utilizando 100 $\mu$ M/kg de la oxazolona **Az16**. Se determinó la dosis mínima efectiva comparándola con la mejora cognitiva mediada por tacrina.

Se determinó el mecanismo de acción del compuesto Az16 sobre  $\alpha$ 7nAChR, aquí se demostró que ejerce un efecto importante sobre el sistema nervioso colinérgico, ya que revierte el bloqueo del antagonista nicotínico MLA.

Nuestros resultados indican que el compuesto **Az16** evaluado farmacológicamente puede ser un fármaco inhibidor reversible de la acetilcolina; sin embargo también podría ser un buen candidato a comportarse como agonista de los  $\alpha$ 7nAChRs, lo cual sería muy beneficioso para ser aplicado como insecticida o como fármaco para la enfermedad de Alzheimer; sin embargo aún quedan muchos estudios que realizar con los compuestos derivados de las oxazolonas y caracterizar el agonismo de los compuestos estudiados.

## REFERENCIAS

1. Abdel-Aty S.A., Pesticidal Effects of Some Imidazolidine and Oxazolone Derivatives, *World Journal of Agricultural Sciences*, 2009; 5, 105-113.
2. Akram W.A.M., Lakshmi S., Shankar B., Gouda T.S., Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Oxazolone Derivatives, *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS)*, 2014, 3, 2-21.
3. Arunrungvichian, K.; Fokin, V. V.; Vajragupta, O.; Taylor, P. Selectivity optimization of substituted 1,2,3-triazoles as  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor agonists. *ACS Chem Neurosci*. 2015, 6, 1317-30.
4. Bala S., Saini M., Kamboj S., Methods for synthesis of Oxazolones, A Review *International Journal of ChemTech Research CODEN*, 2011,3,1102-1118. 2.
5. Bala S., Saini M., kamboj S., and Saini V. ; Synthesis of 2-[4-(substituted benzylidene)-5Oxo-4,5-dihydro-oxazol-2-ylmethyl]-isoindole-1,3-dione Derivatives as Novel Potential Antimicrobial Agents, *Iranian journal of pharmacology & therapeutics*, 2012,11,45-52.
6. Cavas L., Topcam G., Gundogdu-Hizliates C., Ergun Y., Neural Network Modeling of AChE Inhibition by New Carbazole-Bearing Oxazolones. *Interdiscip Sci*. 2017
7. Colovic, Mirjana B.; Krstic, Danijela Z.; Lazarevic-Pasti, Tamara D.; Bondzic, Aleksandra M.; Vasic, Vesna M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology . *Current Neuropharmacology*, 2013,11, 315-335.

8. Davis, T.J. and Fiebre, C.M., Alcohol actions on neuronal nicotinic acetylcholines receptors. *Alcohol Res Healt.* 2006,29,179-185
9. Dineley, K. T. Beta-amyloid peptide–nicotinic acetylcholine receptor interaction: the two faces of health and disease. *Front Biosci.* 2007, 12, 5030–5038.
10. Dineley, K. T.; Bell, K. A. Bui, D.; Sweatt, J. D.  $\beta$ -amyloid peptide activates  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 25056-25061.
11. Dineley, K. T.; Pandya, A. A.; Jakel, J. L. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 2015, 36, 96-108.
12. Dinklo T, Shaban H, Thuring JW, Lavreysen H, Stevens KE, Zheng L, Mackie C., Grantham C, Vandenberg I, Meulders G. Characterization of 2-[[4-Fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-4-(4-pyridinyl)-5-thiazolemethanol (JNJ-1930942), a Novel Positive Allosteric Modulator of the  $\alpha$ 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *ASPET*,2011, 336,560-574.
13. Dobhal Y., Rawat R., Parcha V., Sharma R., and Chaudhary R., Design, synthesis and evaluation of phenyl oxazolone derivatives as Cardioprotective Drugs, *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014,2, 1712-1722.
14. Fareed G., Afza N., Versiani A.M., Fareed N., Mughal R.U., Kalhoro A.M., Iqbal L. and Lateef M., Synthesis, spectroscopic characterization and pharmacological evaluation of oxazolone derivatives, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2013,78,1127–1134.

15. Gotti, C.; Riganti, L.; Vailati, S.; Clementi, F. Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. *Curr Pharm Des.* 2006,12, 407–28.
16. Gotti, C.; Zoli, M.; Clementi, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006, 27, 482-491.
17. Gopalakrishnan SM, Philip BM, Gronlien JH, Malysz J, Anderson DJ, Gopalakrishnan M, Warrior U, Burns DJ. Functional Characterization and High-Throughput Screening of Positive Allosteric Modulators of  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in IMR-32 Neuroblastoma Cells. *Ass Drug Dev Technol.* 2011,9,635-645.
18. Hagstrom, D., Hirokawa H., Zhang, L., Radić, Z., Taylor, P., Collins, E.M. Planarian cholinesterase: in vitro characterization of an evolutionarily ancient enzymes to study organophosphorus pesticide toxicity and reactivation. *Arch Toxicol.* 2017,91, 2834–2847.
19. Hansen Scott B and Taylor Palmer. Galanthamine and Non-competitive Inhibitor Binding to ACh-binding Protein: Evidence for a Binding Site on Non- $\alpha$ -subunit Interfaces of Heteromeric Neuronal Nicotinic Receptors. *J Mol Biol.* 2007, 369, 895-901.
20. Jat R.L., Mishra R., and Pathak D., Synthesis and anticancer activity of 4-benzylidene-2- phenyloxazol-5(4h)-one derivatives, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012, 4, 0975-1491.
21. Khan K.M. et.al., Oxazolones: new tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure– activity relationships, *Bioorg Med Chem*, 2006,14, 6027–33.

22. Kuperá F.C., Radonjica M., Triel V.J., Stieruma R., Groota J.R., Artsc H.E J., Oxazolone (OXA) is a respiratory allergen in Brown Norway rats, *Toxicology*, 2011, 59– 68. 20.
23. Lombardo, S.; Maskos, U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*. 2015, 96, 255-62.
24. Mariappan G., Saha B.P., Datta S., kumar D., and Haldar K.P., Design, synthesis and antidiabetic evaluation of oxazolone derivatives, *J. Chem. Sci*, May 2011, 123, 335–341
25. Naganagowda G., and Petsom A., Synthesis and Antimicrobial Activity of Oxazolone, Imidazolone and Triazine Derivatives Containing Benzothiophene. *Bull Korean Chem. Soc.*, 2011, 32, 794-804.
26. Morales-Perez C., Colleen M. Noviello R., Hibbs E., X-ray structure of the human  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor. *Nature* 2016, 538, 411–415.
27. Oz, M.; Lorke, D. E.; Yang, K. H.; Petroianu, G. On the interaction of beta-amyloid peptides and  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2013, 0, 618–30.
28. Pettit, D. L.; Shao, Z.; Yakel, J. L.  $\beta$ -Amyloid1-42 peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J. Neurosci*. 2001, 21, 1-5.
29. Pinto I.L., West A., Debouckm C.M., DiLella A.G., Gorniak J.G., O'Donnell K.C., O'Shannessy D.J., Patel A., and Jarvest R.L., Novel, selective mechanism-based inhibitors of the herpes proteases, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1996, 6, 2467-2472.

30. Reitz, C.; Brayne, C.; Mayeux, R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neurology*, 2011,7,137–152.
31. Saxena A., [Qian](#) N., Kovach IM., Kozikowski AP., Pang YP., Vellom DC., Radić Z., Quinn D., Taylor P, Doctor BP. Identification of amino acid residues involved in the binding of Huperzine A to cholinesterases . *Protein Sci.* 1994,3,1770-1778.
32. Spires-Jones, T.L., Hyman, B.T. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2014, 82, 756-771.
33. Taly, A.; Charon, S.  $\alpha 7$  Nicotinic acetylcholine receptors: a therapeutic target in the structure era. *Curr Drug Targets*, 2012,13, 695-706.
34. Taly, A.; Corringer, P. J.; Guedin, D.; Lestage, P.; Changeux, J. P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 2009,8,733-50.
35. Taylor, P. Anticholinesterase agents. In: L.L. Brunton (Eds.), Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 13th end. McGraw Hill companies, New York. 2017, pp.163–176.
36. Tikdari M.A., Fozooni S., and Hamidian H., Dodecatungstophosphoric Acid (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>), Samarium and Ruthenium (III) Chloride Catalyzed Synthesis of Unsaturated 2-Phenyl-5(4H)-oxazolone Derivatives under Solvent-free Conditions *Molecules*, 2008,13,3246-3252
37. Turner J. R.; Kellar K. J. Nicotinic cholinergic receptors in the rat cerebellum: multiple heteromeric subtypes. *J Neurosci.* 2005,25, 9258–9265.

38. Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 2005,346, 967–989.
39. Wang, H. Y.; Lee, D. H. S.; Davis, C. B.; Shank, R. P. Amyloid peptide A $\beta$ 1-42 binds selectively and with picomolar affinity to  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 2002,75, 1155-1161.
40. Wang, H.-Y.; Lee, D. H. S.; D'Andrea, M. R.; Peterson, P. A.; Shank, R. P.; Reitz, A. B.  $\beta$ -Amyloid-42 binds to  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* 2000,275, 5626-5632.
41. Wang, J.; Papke, R. L.; Stokes C.; Horenstein N. A. Potential state-selective hydrogen bond formation can modulate activation and desensitization of the  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 2012,287, 21957-69.
42. Witvrouw M., Pannecouque C., Clercq D.E., Fernandez-Alvarez E., Marco L.J. Inhibition of human immunodeficiency virus type (HIV-1) replication by some diversely functionalized spirocyclopropyl derivatives. *Arch. Pharm. Med. Chem.*, 1999; 352,163-166.
43. Zhang W., James D. Barry, Daniel Cordova, Stephen F. McCann, Eric A. Benner, Kenneth A. Hughes. Discovery, synthesis, and evaluation of N-substituted amino-2(5H)-oxazolones as novel insecticides activating nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2014,24, 2188–2192

