

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



**“ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE  
NOVEDOSOS COMPUESTOS DERIVADOS DE OXAZOLONAS  
SOBRE LA ACETILCOLINESTERASA HUMANA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA:

**Q.F.B. ALMA MARISOL RAMÍREZ RUIZ**

DIRECTORA DE TESIS  
**DRA. ARACELY SERRANO MEDINA**

CO-DIRECTORA DE TESIS  
**DRA. ANA LAURA MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

Tijuana B.C., Diciembre del 2021.

## Hoja de aprobación

## **Dedicatoria**

Por ser la pieza fundamental y el motor que hace girar mi existencia, el presente trabajo está dedicado a mis hijos: Andy, Michelle, Natalie y Sebastian.

## Agradecimientos

Pasado el tiempo llego la hora de terminar este maravilloso proyecto, el cual me dejo un gran aprendizaje tanto profesional como personal. Para poder cumplir con esta meta, debo agradecer a todas las personas que compartieron sus conocimientos y que compartieron su tiempo conmigo para poder terminar este trabajo.

Agradezco a la mi directora de tesis, la Dra. Aracely Serrano por la confianza que deposito en mí para la realización de este proyecto, por enseñarme y por guiarme durante los últimos dos años.

Agradezco a los miembros de mi comité de tesis, a la Dra. Martha Elena Ávila Cossío por brindarme su apoyo, enseñanza y consejos. A mi codirectora, la Dra. Ana Laura Martínez Martínez.

Al Dr. Ignacio A. Rivero Espejel por proporcionarnos los compuestos que se evaluaron en este estudio. Al Dr. Arturo Estolano Cobian, por su apoyo.

También quiero agradecer a la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Tijuana por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos para poder realizar los experimentos, de igual manera agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías por permitirme usar eventualmente los equipos del laboratorio de Biofarmacia, por ello también agradezco al Dr. José Manuel Cornejo Bravo, además de que también me brindo apoyo como asesor.

Sin duda alguna el agradezco infinitamente a mi familia; a mis hijos: Andy, Michelle Natalie y Sebastian por haberme permitido iniciar y terminar este proyecto, agradezco que me prestaran el tiempo de ustedes para poderlo dedicar al estudio, por lo que este logro lo comparto con ustedes, ya que también les pertenece.

Y antes de todo, ofrezco las gracias infinitas a Dios por permitir y poner en mi camino a este esplendido equipo de trabajo y por darme fuerzas físicas y mentales y no permitir que los inconvenientes ni las perdidas me apartaran de la meta que me había fijado desde el principio. Por último agradezco a todos los que de alguna manera influyeron en mí, ya sea con palabras de ánimo, críticas, comentarios, etc. En este punto me refiero a mis compañeros de estudio y a mis compañeros de trabajo.

## Índice

Hoja de aprobación.....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimientos.....	iv
Vita y área de estudio .....	xiii
Resumen.....	xv
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	6
1.2 Justificación .....	11
1.3 Hipótesis .....	12
1.4 Objetivos.....	13
<b>CAPÍTULO II. TEORÍA GENERAL .....</b>	<b>14</b>
2.1 Enzimas .....	15
2.2 Clasificación.....	17
2.3 Cinética Enzimática .....	18
2.4 Modelo de Michaelis-Menten .....	19
2.5 Inhibidores enzimáticos.....	21
2.5.1 Inhibidor reversible.....	22
2.5.2 Inhibidor irreversible.....	27
2.6 Acetilcolina y sistema nervioso autónomo.....	28
2.7 Receptores de la acetilcolina .....	30
2.7.1 Receptores nicotínicos .....	30
2.7.2 Receptores muscarínicos.....	33
2.8 Acetilcolinesterasa .....	35
2.9 Inhibidores de la acetilcolinesterasa.....	39
2.9.1 Inhibidores reversibles .....	39
2.9.2 Inhibidores irreversibles .....	41
2.10 Oxazolonas.....	44
<b>CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>46</b>
3.1 Materiales y reactivos .....	47
3.2 Preparación de los compuestos.....	48

3.3 Ensayo Ellman. ....	49
3.4. Prueba de cribado para determinar la actividad catalítica de los compuestos sobre la enzima. ....	51
3.5. Determinación de la potencia de los compuestos con mayor porcentaje de actividad inhibitoria mediante la $CI_{50}$ con la AChE humana.....	53
3.7. Determinación de la constante de inhibición y el tipo de inhibición mediante la ecuación de Michaelis-Menten para analizar la afinidad de los compuestos sobre la enzima. ....	55
3.5 Determinación de la capacidad de los compuestos para unirse con la enzima mediante un acoplamiento molecular de los compuestos sobre la estructura de AChE-Donepezilo. ....	58
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
4.1 Prueba de cribado para determinar la actividad inhibitoria de los compuestos sobre la enzima. ....	60
4.2 Determinación de la potencia de los compuestos con mayor porcentaje de actividad inhibitoria mediante la $CI_{50}$ con la enzima AChE .....	63
4.3. Determinación de la constante de inhibición ( $K_i$ ) y el tipo de inhibición mediante la ecuación de Michaelis-Menten para analizar la afinidad de los compuestos sobre la enzima. ....	67
4.4. Determinación de la capacidad de los compuestos para unirse con la enzima mediante un acoplamiento molecular de los compuestos sobre la estructura de la AChE-donepezilo.....	79
<b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
REFERENCIAS .....	91

## Lista de símbolos y abreviaturas

La siguiente lista corresponde a los símbolos y abreviaturas usados en el presente estudio.

<b>Símbolo/abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
Ala	Alanina
Asp	Asparagina
Asn	Aspartato
Arg	Arginina
ATCh	Acetiltiocolina
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca <sup>+</sup>	Ion calcio
CAS	Sitio catalítico activo
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
DFP	Fluorofosfato de diisopropilo
DS	Desviación estándar
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2- nitrobenzoico (Reactivo de Ellman)
E	Enzima
EA	Enfermedad de Alzheimer
EC	Enzyme Commission Numbers
EC 3.1.1.7	Acetilcolinesterasa
EI	Complejo enzima-inhibidor
ES	Complejo enzima-sustrato
ESI	Complejo enzima-sustrato-inhibidor
Gly	Glicina
Glu	Ácido glutámico
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
His	Histidina
ITT	Instituto Tecnológico de Tijuana
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
K <sup>+</sup>	Ion potasio
K <sub>1</sub>	Constante de velocidad de la formación de ES
K <sub>-1</sub>	Constante de velocidad de la disociación de ES.
K <sub>2</sub>	Constante de velocidad de la formación y liberación del producto del sitio activo.
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición

$K_m$	Constante de afinidad de la enzima por un sustrato (constante de Michaelis-Menten).
Leu	Leucina
LGICs	Canales iónicos controlados por ligando
Log	Logaritmo
M	Concentración molar
mAChR	Receptor muscarínico de la acetilcolina
Min	Minuto
mM	Concentración milimolar
N	Numero de repeticiones
$Na^{+2}$	Ion sodio
nAChR	Receptor nicotínico de la acetilcolina
Nm	Nanómetros
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
OF	Organofosforado
P	Producto
PAS	Sitio periférico aniónico
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
Phe	Fenilalanina
Ppm	Partes por millón
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media
S	Sustrato
Ser	Serina
SNA	Sistema nervioso autónomo
Stock	Solución de almacenamiento
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UI	Unidad internacional
UV/V	Ultravioleta/Visible
Val	Valina
$V_0$	Velocidad inicial de la reacción
$V_{max}$	Velocidad máxima
Vx	O-etildiisopropilaminoetilmetilfosfonotiolato (agente nervioso)
A	Alfa
$\alpha 7$ -nAChRs	Receptores nicotínicos alfa 7
$\alpha Ki$	Constante de disociación del complejo ESI
%	Porcentaje
°C	Grado centígrado
$\mu L$	Microlitro
$\mu mol$	Micromol
3D	Tercera dimensión
Å	Amstrong

## Lista de tablas

<b>Capítulo II</b>		Pág.
<b>Tabla 2.1.</b> Clasificación y subclasificación de las enzimas		18
<b>Tabla 2.2</b> Distribución de los receptores de tipo muscarínico		35
<b>Capítulo III</b>		
<b>Tabla 3.1</b> Contenido de la mezcla de reacción para leer la actividad enzimática a una longitud de onda de 412 nm por un minuto.		52
<b>Tabla 3.2.</b> Preparación de las concentraciones finales con las que se llevó acabo la determinación de la $CI_{50}$ , para cada compuesto.		54
<b>Tabla 3.3.</b> Concentraciones de sustrato y compuesto. Utilizadas para obtener la constante de inhibición ( $K_i$ ).		56
<b>Capítulo IV</b>		
<b>Tabla 4.1.</b> Resultados de la actividad catalítica de los compuestos sobre la enzima AChE.		61
<b>Tabla 4.2.</b> Resultados de $CI_{50}$ de los siete compuestos que presentaron mayor porcentaje de inhibición.		67
<b>Tabla 4.3.</b> Resultados de las $K_i$ , el valor de $\alpha$ , $V_{max}$ y $K_m$ para cada compuesto evaluado bajo un modelo mixto en el programa estadístico GraphPad Prism 8.0		78
<b>Tabla 4.4.</b> Energías de unión de los compuestos con la enzima.		80

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Capítulo I. Introducción</b>	
<b>Figura 1.1.</b> Estructura de la oxazolona	7
<b>Capítulo II. Teoría general</b>	
<b>Figura 2.1.</b> Estructura de las enzimas	15
<b>Figura 2.2.</b> Complejo enzima-sustrato.	17
<b>Figura 2.3.</b> Diagrama de Michaelis-Menten	21
<b>Figura 2.4.</b> Representación esquemática de Inhibición competitiva.	23
<b>Figura 2.5.</b> Representación esquemática de Inhibición no competitiva	24
<b>Figura 2.6.</b> Representación esquemática de Inhibición acompetitiva.	25
<b>Figura 2.7.</b> Representación esquemática de la inhibición no competitiva mixta.	26
<b>Figura 2.8.</b> Estructura química de la Acetilcolina (ACh).	28
<b>Figura 2.9.</b> Distribución de las vías colinérgicas en el cerebro.	29
<b>Figura 2.10.</b> Conformación de los nAChR.	31
<b>Figura 2.11.</b> Distribución de los nACh en el cerebro.	33
<b>Figura 2.12.</b> Estructura del mAChR.	34
<b>Figura 2.13.</b> Esquema de la AChE.	37
<b>Figura 2.14.</b> Esquema tridimensional de la AChE humana	38
<b>Figura 2.15</b> .Estructura química de las oxazolonas o azlactona.	44
<b>Capítulo III. Parte experimental</b>	
<b>Figura 3.1.</b> Estructuras químicas.	48
<b>Figura 3.2.</b> Mecanismo químico del método de Ellman.	49
<b>Capítulo IV. Resultados</b>	
<b>Figura 4.1.</b> Porcentaje de inhibición enzimática dos concentraciones de inhibición.	62
<b>Figura 4.2.</b> Estructuras químicas de los ocho compuestos que inhibieron a la enzima entre el 50% y el 75%.	63
<b>Figura 4.3.</b> Gráficas de curvas dosis-respuesta de las siete oxazolonas ensayadas.	64
<b>Figura 4.4.</b> Gráficas de curvas dosis-respuesta individuales.	66
<b>Figura 4.5.</b> Gráficas de Michaelis-Menten para cada compuesto.	71

<b>Figura 4.6.</b> Gráficas de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos de los siete compuestos derivados de oxazolonas	76
<b>Figura 4.7.</b> Superficie de la cavidad del sitio activo de la AChE.	82
<b>Figura 4.8.</b> Interacciones que presenta el compuesto E16 con los diferentes aminoácidos que forman la superficie de la cavidad del sitio activo de la AChE	83
<b>Figura 4.9.</b> Ángulos y distancias entre el compuesto E16 y los diferentes aminoácidos con los que presenta interacciones.	84

## **Vita y área de estudio**

Alma Marisol Ramirez Ruiz nacida en la Ciudad de Jerez de García Salinas en el estado de Zacatecas, México, el 18 de septiembre de 1980.

Realice estudios medio superiores en el CBTIS 237 en la ciudad de Tijuana B.C., egresando como técnico en programación. En el año 2001 ingrese a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías de la Universidad Autónoma de Baja California donde comencé mis estudios profesionales y de donde egrese como Químico Farmacobiólogo en el año 2006. Durante mi preparación profesional realice un año de internado más seis meses de prácticas profesionales en el Hospital General Regional no. 1 del IMSS. El servicio social profesional lo lleve a cabo en la farmacia del Hospital Infantil de las Californias.

Desde el 2006 hasta la fecha me encuentro trabajando en el Hospital General Playas de Rosarito en el área de laboratorio clínico, donde realizo múltiples funciones operativas destacando la toma y proceso de muestras biológicas, así como la captura y validación de resultados. Rotando por las diferentes áreas del laboratorio como lo son Hematología, Química sanguínea, Coagulación, Serología, Urianálisis, Coproanálisis, Microbiología y Banco de Sangre.

Desde el 2009 a la fecha me he desempeñado como docente de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja Californiana Campus Tijuana impartiendo los laboratorios de Bioquímica Básica, Biofísica, Fisiología y Fisiopatología a los alumnos de la carrera de Medicina.

Actualmente concluyendo estudios de posgrado bajo el programa de Maestría en Ciencias Médicas perteneciente la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California, con el proyecto titulado: Estudio de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa humana utilizando compuestos novedosos derivados de oxazolonas.

## Resumen

La acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) es una enzima muy importante en la sinapsis colinérgica y su principal función es terminar el impulso nervioso al hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina (ACh) en colina y acetato en la hendidura sináptica y con ello modular la neurotransmisión. Por lo que las investigaciones que involucren la inhibición de esta enzima tienen un gran interés en el área de la biomedicina, al desarrollar medicamentos para el tratamiento de patologías donde la concentración del neurotransmisor esta disminuido. En la agroquímica, la inhibición de la AChE tiene particular interés con el desarrollo de compuestos utilizados en el control de plagas de cultivo.

En la presente investigación “Estudio sobre la actividad inhibitoria de novedosos compuestos derivados de oxazolonas sobre la acetilcolinesterasa humana” se utilizaron ocho compuestos derivados de oxazolonas y tres intermediarios sintéticos, donde se evaluó la capacidad de estos compuestos para inhibir a la AChE humana utilizando el método espectrofotométrico de Ellman. Se llevó a cabo una prueba de cribado para conocer la capacidad inhibidora de los compuestos sobre la enzima, se determinó la potencia de los compuestos que inhibieron por arriba del 50% a la enzima en la prueba de cribado al obtener la  $CI_{50}$ , se determinó la constante de inhibición ( $K_i$ ) y se conoció el modo de inhibición de cada compuesto. Por último, se realizó un análisis de acoplamiento molecular del compuesto del que se obtuvieron los mejores resultados en las determinaciones antes explicadas. Obteniendo como resultados, siete compuestos que inhiben a la enzima por arriba del 50% de manera reversible, cinco compuestos se

caracterizaron como inhibidores competitivos, uno como no competitivo y uno como acompetitivo. De los siete compuestos sobresale el compuesto E16 como la ozaxolona que inhibe a la enzima en mayor porcentaje, con una  $K_i$  de  $2.08 \pm 0.36 \mu\text{M}$  y una  $CI_{50}$  de  $9.2 \pm 2.3 \mu\text{M}$ . El análisis de acoplamiento molecular refleja que el compuesto E16 se une a la enzima en el sitio activo y presenta una interacción  $\pi$ - $\pi$  entre uno de los anillos aromáticos del compuesto y el Trp86 del subsitio aniónico (SA). Con base en los resultados, el compuesto E16 puede ser una opción para ser utilizado como fármaco anticolinesterasa o como insecticida.

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

Las enzimas son moléculas especializadas que se encargan de catalizar las reacciones necesarias para la existencia de los sistemas biológicos (Voet, Voet, & Pratt, 2016) y se destruyen por calor húmedo a 100 °C (Alef & Nannipieri, 1995). Para que el organismo mantenga su homeostasis debe existir un equilibrio dinámico o de regulación enzimática adecuado entre estas moléculas y sus sustratos (Quintero Lizaola et al., 2003). Esta reacción se lleva a cabo en un lugar específico de la enzima, llamado sitio catalítico y el método sencillo y más utilizado para evaluar la velocidad de las reacciones catalizadas por las enzimas (cinética enzimática) es el método de Michaelis–Menten, el cual es útil no solo para medir la velocidad de la reacción sino también nos permite conocer la afinidad de la enzima por un sustrato y la afinidad de una molécula inhibidora por la enzima, así mismo es de utilidad para determinar el modo de inhibición. Al hablar de inhibición enzimática nos referimos a las moléculas que interaccionan con la enzima impidiendo que ésta realice la reacción con un sustrato. De tal manera, que los inhibidores enzimáticos tienen su aplicación al ser utilizados como fármacos para tratar algunos padecimientos, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (EA), un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza principalmente por un declive de las funciones cognitivas y pérdida de memoria como consecuencia de una disminución en la cantidad de neuronas productoras del neurotransmisor acetilcolina (ACh) y por lo tanto, una disminución en la concentración del neurotransmisor, el cual es rápidamente hidrolizado por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Rodríguez et al., 2017). Por otra parte, la inhibición enzimática también ha encontrado aplicación en el campo de la agroquímica al utilizar compuestos que inhiben la AChE en contra de las plagas de cultivo por lo que su aplicación directa es en el uso de insecticidas o pesticidas.

La Acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7), es una enzima serina hidrolasa presente en las sinapsis del sistema nervioso colinérgico de los vertebrados y artrópodos, incluyendo a los insectos y termina la transmisión sináptica colinérgica por hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (Quinn, 1987; Taylor et al., 1995). La inhibición irreversible de AChE es el mecanismo principal de acción de muchos ésteres organofosforados (OF), incluidos pesticidas y agentes nerviosos altamente tóxicos. Estos compuestos ejercen toxicidad aguda a través de la fosforilación del oxígeno de la serina del sitio activo AChE (López-Durán et al., 2018). Por lo tanto, la hidrólisis deteriorada de la acetilcolina conduce a la acumulación del neurotransmisor en los receptores muscarínicos y nicotínicos. La siguiente sobreestimulación de los receptores colinérgicos periféricos y centrales causa la interrupción de las funciones vitales del cuerpo, paro respiratorio y finalmente la muerte (Grob & Harvey, 1953; Holmstedt, 1959). En cambio, los inhibidores reversibles son compuestos que evitan la hidrólisis de la ACh por un lapso de tiempo, por lo que el efecto será revertido espontáneamente. En este grupo de compuestos se encuentran los insecticidas de carbamato, que provocan efectos que pueden ser reestablecidos aproximadamente a las 24 o 48 hrs de la exposición, por lo que presentan una toxicidad menor respecto a los OF (Marrero, Gonzalez, Guevara, & Eblen, 2017). También, en este grupo de inhibidores se encuentran los compuestos utilizados con fines terapéuticos, como es el caso de los fármacos empleados en el tratamiento de EA (Rodríguez et al., 2017).

La mayoría de los compuestos heterocíclicos de cinco y seis miembros que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno tienen una enorme importancia en el campo

de la química médica (Aaglawe, Dhule, Banhekar, Wakte, & Shinde, 2003). Las oxazolonas son compuestos heterocíclicos de cinco miembros que contienen nitrógeno y oxígeno como heteroátomos. Las posiciones C-2 y C-4 de la oxazolona son responsables de sus actividades biológicas tan diversas. Las oxazolonas desempeñan un papel importante en la síntesis de una variedad de moléculas orgánicas, incluidos aminoácidos (Lamb & Robson, 1931), aminoalcoholes, tiamina (Ismail, 1991) y péptidos (Madje, Ubale, Bharad, & Shingare, 2010). Ciertas oxazolonas naturales y sintéticas también poseen actividades biológicas importantes, como antiinflamatorios (Gökşen et al., 2007), antimicrobianos (Argade, Kalrale, & Gill, 2008; Tandon, Coffen, Gallant, Keith, & Ashwell, 2004), anticancerígenos (Jat, Mishra, & Pathak, 2012), anti-VIH (Witvrouw, Pannecouque, De Clercq, Fernández-Alvarez, & Marco, 1999), antiangiogénicos (Perron-Sierra, Pierré, Burbridge, & Guilbaud, 2002), anticonvulsivos (Fareed et al., 2013), antitumorales, inmunomoduladores, sedantes (Khan et al., 2006; Mesaik et al., 2004), fungicidas y herbicidas (Abdel-aty, 2009), antidiabéticos (Mariappan, Saha, Datta, Kumar, & Haldar, 2011) y cardioprotectores (Print et al., 2014). Por esta razón, los derivados de oxazolona desempeñan un papel vital en la fabricación de diversos medicamentos de interés terapéutico, importantes para la industria médica (Conway, Devine, & Paradisi, 2009; Taile, Hatzade, Gaidhane, & Ingle, 2009). En investigaciones previas se destaca que la síntesis de derivados de oxazolona se lograron por condensación de aldehídos con *N*-benzoil / *N*-acetilglicina en presencia de reactivos y catalizadores diversos como ZnO/Ac<sub>2</sub>O (M.A. Pasha, Jayashankara, Venugopala, & Rao, 2007), KF / NaOAc (Bautista et al., 2002), TsCl/DMF (Moghanian, Shabanian, & Jafari, 2012), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Kashyap, Chetry, & Das,

1998), Nano- MgO (Sadeq, Chandrappa, & Mohamed, 2013), sales de Bi (III) (Khodaei, Khosropour, & Jomor, 2003), ZnCl<sub>2</sub> (Rao & Venkataraman, 1994) y Pb (OAc)<sub>2</sub> (Cavelier & Verducci, 1995). O bien, mediante reacciones de ácido hipúrico con aldehídos en presencia de 2-cloro-4,6,dimetoxi,1.3.5 triazina/*N*-metilmorfolina a 75°C (Siddaiah, Basha, Sudhakar, Srinuvasarao, & Kumar, 2013).

En esta investigación se evaluó la actividad inhibitoria que tienen los compuestos derivados de oxazolonas sobre la enzima acetilcolinesterasa humana (AChE). Actualmente los fármacos anticolinesterasa que son utilizados como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer carecen de efectividad, ya que no curan la enfermedad y provocan efectos secundarios que repercuten en la salud ya comprometida del paciente, entre estos efectos se puede mencionar la hepatotoxicidad producida por tacrina (Fuentes & Slachevsky, 2005). Por otra parte, los compuestos usados como pesticidas en contra de las plagas de cultivo, son altamente tóxicos para el ser humano por lo que su uso está regulado a nivel mundial (Ferrer, 2003; OMS, 2018; Schaaf, 2013).

Existen varias investigaciones en las cuales se afirma que los compuestos derivados de oxazolonas producen un efecto inhibitorio sobre la AChE, por lo que este tipo de compuestos podrían ser una alternativa como tratamiento en enfermedades neurodegenerativas o bien se podrían usar como pesticidas.

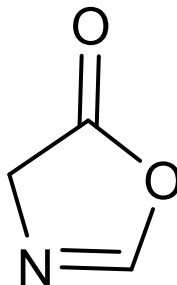
## 1.1 Antecedentes

Una disminución en la concentración de acetilcolina puede causar desórdenes importantes en el sistema nervioso, provocando enfermedades neurodegenerativas como lo es la enfermedad de Alzheimer. (Cavas, Topcam, Gundogdu-Hizliates, & Ergun, 2017). Por otra parte, un aumento en su actividad conlleva a la estimulación continua de los receptores nicotínicos o muscarínicos, provocando una excitación continua en la placa neuromuscular, efecto indeseado que puede llevar al deceso del organismo que lo padezca (Estrada, Berrouet, & Giraldo, 2016). Por lo tanto, realizar estudios que involucren la inhibición de la enzima AChE es de suma importancia en el ámbito biomédico y en el de la agroquímica.

Actualmente, los inhibidores de la AChE se pueden encontrar como fármacos auxiliares en el tratamiento del Alzheimer, aunque ayudan a controlar la enfermedad se ha visto que no son del todo efectivos ya que no curan el padecimiento, además de provocar efectos adversos severos, como el daño hepático y de origen gastrointestinal (Fuentes & Slachevsky, 2005) . Otro uso de los inhibidores de la AChE es como pesticidas contra las plagas de cultivo, en este caso, los compuestos que actualmente son usados con este fin, han demostrado ser muy dañinos para las personas que los manipulan, por lo que existe la necesidad de encontrar otras alternativas (Bernardino, Torres, Sanchez, & Reyes, 2019; Serrano-Medina et al., 2019).

Una alternativa pueden ser los compuestos derivados de oxazolonas. Existen estudios diversos que fundamentan que los compuestos derivados de oxazolonas

tienen actividad inhibitoria sobre la AChE (Cavas et al., 2017; Zhang et al., 2014). Estos son compuestos heterocíclicos que tienen como heteroátomos a un nitrógeno y a un oxígeno en su estructura (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Estructura de la oxazolonas.

Su estructura la podemos encontrar en fármacos diversos tales como, antimicrobianos, sedantes, antidiabéticos, antivíricos, anti-HIV, antimicóticos, anticancerígenos, fungicidas, herbicidas, antiinflamatorios y anticonvulsivos (Bala, Saini, Kamboj, & Saini, 2012; Sharada, Aparna, Saba, Sunitha, & Viveka, 2014).

Recientemente, Cavas et al. (2017) sintetizaron un grupo de tres oxazolonas portadoras de carbazol, las cuales fueron caracterizadas con ensayos *in vitro* usando el método de Ellman modificado para trabajar con un lector de micro-placas (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961). La actividad de la enzima AChE de anguila eléctrica fue medida bajo concentraciones diferentes de sustrato, en este caso utilizaron acetiltiocolina (ATCh) en concentraciones de 0.2 a 1.2 mM, las temperaturas de reacción oscilaron entre 25°C a 80°C y el pH del medio ensayado fue de 6.0 a 9.0 en presencia y ausencia del inhibidor. Logrando determinar la

concentración óptima de sustrato, que en este caso fue de 1.0 mM. Por otra parte, el pH y temperatura óptimos fueron 8.5 y 25°C respectivamente. Caracterizaron a dos compuestos como inhibidores reversibles mixtos y uno como inhibidor acompetitivo. También desarrollaron una red neuronal artificial, en la cual observaron coeficientes de correlación altos, entre los resultados experimentales y los proporcionados por la red neuronal artificial, por lo que, constataron que la técnica implementada permite predecir la inhibición enzimática. Con base en sus resultados, sugirieron que se realicen más estudios que incluyan ensayos *in vitro*, donde se evalúen estos compuestos como inhibidores de la AChE, ya que hasta antes de esta publicación, no existe ningún estudio científico en donde se evalúen estos compuestos como inhibidores enzimáticos ya que solamente se habían estudiado sus propiedades ópticas, por lo que se puede decir que esta investigación es el primer estudio donde se evalúan este tipo de compuestos como inhibidores de la AChE. Por otra parte también sugirieron que se realicen estudio *in vivo*, una vez que se realicen las pruebas de toxicidad pertinentes (Cavas et al., 2017).

Por otra parte, Zang et al. (2014), Sintetizaron y evaluaron una clase novedosa de compuestos derivados de oxazolonas *N* amino sustituidas y, afirmaron con base en sus resultados, que estos compuestos actúan sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolina, por lo que indicaron que los compuestos estudiados son agonistas potentes de tales receptores, razón por la cual proponen usarlos como insecticidas en contra de las plagas de cultivo. La actividad insecticida se evaluó rociando plantas de follaje con los compuestos y, se determinó que la mortalidad de los insectos ocurrió en promedio de 6 días de tratamiento, demostrándose que son

efectivos en contra de pulgones, mosca blanca y especies de saltamontes, así mismo se determinó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en partes por millón (ppm) de cada compuesto ensayado y para cada organismo no deseado. Los valores de CL<sub>50</sub> que se obtuvieron oscilaron entre 0.5 a 250 ppm. La efectividad de los compuestos fue evaluada en conjunto con un potente insecticida de referencia, el imidacloprid, un compuesto que pertenece al grupo de los neocotinicoides. Posteriormente, para determinar la acción funcional sobre los nAChR de los insectos, se utilizó un cultivo celular de neuronas de embriones de cucaracha americana, el cual fue cargado con una sonda sensible al calcio; obteniendo como resultado una movilización de este ion conforme se adiciona el compuesto, indicando agonismo de los receptores nicotínicos. Se determinaron valores de la concentración media efectiva (CE<sub>50</sub>) para el mejor compuesto ensayado, la cual fue de 3.4 µM, comparado con 0.9 y 0.4 µM para la nicotina y el imidacloprid respectivamente. Se concluyó que los compuestos derivados de oxazolonas *N*-sustituidas actúan sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolina y sugirieron que sean utilizados como insecticidas; además que se realicen más estudios a fondo.

En un estudio de tesis reciente se evaluó el efecto de un compuesto derivado de oxazolonas sobre el sistema nervioso de ratones con déficit de memoria inducida por escopolamina (Cota, 2018) se determinó que la dosis mínima efectiva del compuesto evaluado para generar una mejora cognitiva comparada con la que se obtuvo con el uso de un fármaco anticolinesterásico de referencia como lo es la tacrina, fue de 50 µg/kg. También se realizó un experimento en el que se utilizó un compuesto antagonista selectivo de los receptores α7-nAChRs de la acetilcolina

para bloquear la respuesta colinérgica, la cual se revirtió con la administración del compuesto derivado de oxazolonas evaluado en este estudio, por lo que se determinó que el compuesto de prueba ejerce efecto sobre el sistema nervioso colinérgico al revertir el bloqueo de tales receptores. Por lo anterior se concluyó, que el compuesto estudiado puede ser un fármaco inhibidor reversible de la acetilcolinesterasa pero que también puede comportarse como agonista de los receptores nicotínicos de la acetilcolina, por lo que podría ser usado como insecticida y sugiere se realicen más estudios.

## 1.2 Justificación

Actualmente, se han aprobado medicamentos del grupo de inhibidores de las colinesterasas para el tratamiento de la enfermedad de alzheimer (EA), como la rivastigmina, el donepezil y la galantamina y, el antagonista del receptor de *N*-metil-D-aspartato (NMDA), memantina. Sin embargo, este tipo de tratamiento no es totalmente efectivo, debido a que pueden producir hepatotoxicidad, acciones sobre la placa neuromuscular, calambres e incontinencia urinaria, entre otras manifestaciones indeseadas. Por lo tanto, la búsqueda de medicamentos nuevos, implica posibilidades terapéuticas diferentes. Por otra parte, los compuestos OF y los carbamatos son útiles como pesticidas, pero su toxicidad representa un problema de salud pública a nivel mundial, por lo que se requiere encontrar compuestos nuevos que sean efectivos, sin presentar un riesgo para la salud de las personas que los manipulan, por lo que los compuestos derivados de oxazolonas, podrían ser una opción farmacológica, así como su uso insecticida.

### **1.3 Hipótesis**

Los compuestos derivados de oxazolonas producirán un efecto farmacológico inhibitorio sobre la enzima acetilcolinesterasa humana en estudios *in vitro*.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

El objetivo general de este estudio es evaluar el efecto farmacológico inhibitorio de compuestos derivados de oxazolonas sobre la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa humana, utilizando técnicas espectrofotométricas.

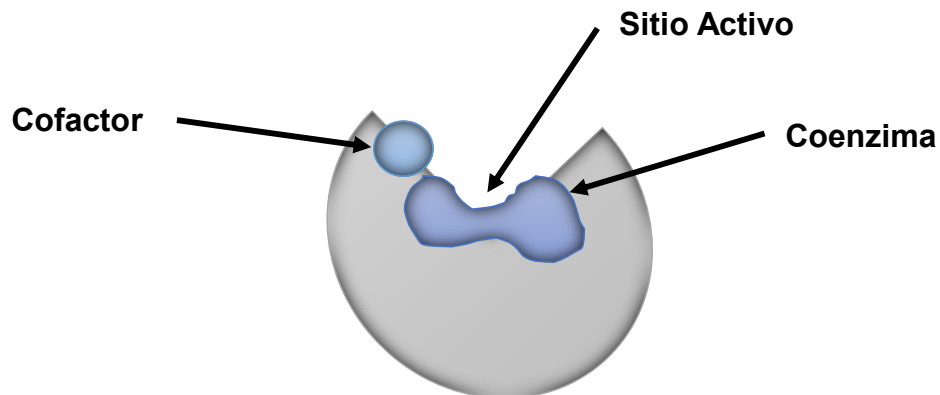
### **1.4.2 Objetivos Específicos**

1. Realizar una prueba de cribado para determinar el grado de inhibición que producen 8 compuestos derivados de oxazolonas y 3 intermediarios sintéticos sobre la enzima AChE.
2. Determinar la potencia de los compuestos con fracción de inhibición mayor sobre la AChE mediante la dosis inhibitoria media (CI<sub>50</sub>).
3. Determinar la constante de inhibición (K<sub>i</sub>) y el tipo de inhibición mediante la ecuación de Michaelis-Menten para conocer la afinidad de los compuestos por la enzima AChE.
4. Determinar la capacidad de los compuestos para unirse con la enzima mediante el estudio de acoplamiento molecular de los compuestos sobre la estructura de la AChE-donepezilo.

## **CAPÍTULO II. TEORÍA GENERAL**

## 2.1 Enzimas

Las enzimas son moléculas que, por excelencia, catalizan las reacciones necesarias para la existencia de los sistemas biológicos (Voet et al., 2016). Estas moléculas son de gran interés y desde que se descubrieron, se han convertido en un punto clave en las investigaciones del área médica. Las enzimas son proteínas, que tienen función catalítica, este término se refiere a que tienen la capacidad de degradar, conservar y transformar sustratos específicos (Mckee & Mckee, 2009; Nelson & Cox, 2015). Muchas enzimas poseen moléculas adicionales no proteicas o iones metálicos, que participan y extienden la capacidad catalítica de la enzima, a estas moléculas se les conoce como grupos prostéticos, cofactores y coenzimas (Figura 2.1) (Murray et al., 2013).



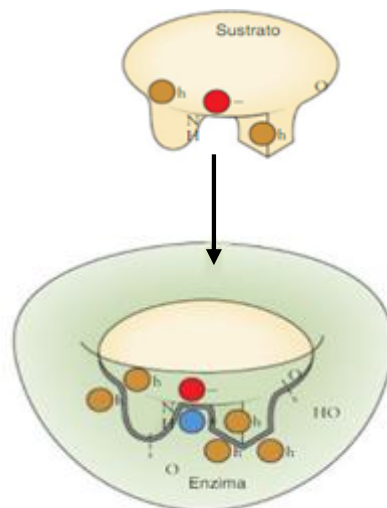
**Figura 2.1.** Estructura de las enzimas (Murray et al., 2013).

Las enzimas tienen varias propiedades que las distinguen, (Mckee & Mckee, 2009; Nelson & Cox, 2015; Stryer, Berg, & Tymoczko, 2015; Voet et al., 2016) entre las más importantes se encuentran las siguientes:

1. Velocidad de reacción muy elevada. Las reacciones catalizadas por las enzimas tienen una velocidad mucho mayor que las reacciones sin catálisis.
2. Condiciones de reacción más suaves. La catálisis enzimática requiere de ciertas condiciones para producirse, como lo es: temperatura inferior a los 100 °C, presión atmosférica y pH casi neutro. Diferenciando así la catálisis química.
3. Especificidad. Las enzimas reaccionan y actúan sobre un sustrato específico, o un grupo de ellos, donde la distribución de carga del sustrato permite la entrada e interacción con el sitio activo de la enzima.
4. Capacidad de regulación. Gracias a su estructura y tamaño, las enzimas pueden autorregularse en respuesta a las concentraciones de sus sustratos.

Las reacciones catalizadas por las enzimas son llevadas a cabo en un lugar específico de la molécula llamado centro activo (Stryer et al., 2015) o sitio de unión (Voet et al., 2016). El centro activo es el microambiente en forma de hoyo en donde la enzima interacciona con el sustrato, para formar el complejo Enzima-Sustrato (ES). Consiste en un hueco en la superficie de la enzima que es complementario a la forma del sustrato, en donde los residuos de aminoácidos que forman el sitio activo, se encuentran ordenados de manera específica para atraer al sustrato, de

tal manera, que cualquier molécula diferente al sustrato, tanto en forma, como en conformación de grupos funcionales, no podrá unirse a la enzima. (Figura 2.2). Dicha unión entre el sustrato y la enzima se da por interacciones reversibles como, enlaces electrostáticos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas y también lo hará por enlaces covalentes produciendo interacciones irreversibles (Stryer et al., 2015; Voet et al., 2016).



**Figura 2.2.** Complejo enzima-sustrato. La unión entre el sustrato y la enzima tienen complementariedad geométrica (Voet et al., 2016).

## 2.2 Clasificación

Las enzimas se clasifican de acuerdo a un sistema internacional, creado por la Enzyme Commission (EC) de la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) para evitar imprecisiones y ambigüedades (Feduchi, Romero, Yáñez, Blasco, & García-Hoz, 2015; International Union of Biochemistry and

Molecular Biology, 2021). De acuerdo a este sistema las enzimas se clasifican según el tipo de reacción que cataliza en 6 clases y subclases como se puede apreciar en la Tabla 2.1. En esta clasificación, se asignan dos nombres a cada enzima (el nombre aceptado o recomendado y el nombre sistemático) y un número de clasificación formado por cuatro números y las letras EC, que provienen del inglés Enzyme Commission. Por ejemplo, la para la enzima EC 3.1.1.7, su nombre sistemático es acetilcolina acetil hidrolasa y el nombre aceptado o recomendado es acetilcolinesterasa.

**Tabla 2.1.** Clasificación y subclasificación de las enzimas (Feduchi et al., 2015).

Clase	Subclase
1. Oxidorreductasas	Deshidrogenasas, oxidasas, reductasas, peroxidasas, catalasas, oxigenasas, hidroxilasas.
2. Transferasas	Transaldolasas y transcetolasas, fosforiltransferasas, quinasas, fosfomutasas.
3. Hidrolasas	Esterasas, glucosidasas, peptidasas, fosfatasas, tiolasas, fosfolipasas, amidasas, desaminasas, ribonucleasas.
4. Liasas	Descarboxilasas, aldolasas, hidratasas, deshidratasas, sintasas, liasas.
5. Isomerasas	Racemasas, epimerasas, isomerasas, mutasas.
6. Ligasas	Sintetasas, carboxilasas.

### 2.3 Cinética Enzimática

La cinética enzimática es el estudio de la catálisis enzimática, el cual proporciona información sobre las velocidades de la reacción, permitiendo hacer un seguimiento de las reacciones enzimáticas para medir la afinidad de las enzimas

por los sustratos e inhibidores, además ofrece información importante sobre los mecanismos de reacción. La cinética enzimática también es útil para describir cómo se regulan las rutas metabólicas en los sistemas biológicos. Al medir la velocidad de la reacción bioquímica, se obtiene el cambio en la concentración de un reactante o de un producto por unidad de tiempo, esto quiere decir que la velocidad de la reacción es proporcional a la frecuencia con la que las moléculas reaccionan para formar el producto. Para esto, se deben tener en cuenta ciertas condiciones como son el pH del medio en que se está llevando la reacción, la temperatura y la fuerza iónica entre la enzima y el sustrato, así como el orden de reacción. Este puede ser de primero, segundo y de orden cero (Mckee & Mckee, 2009).

#### **2.4 Modelo de Michaelis-Menten**

El modelo de Michaelis–Menten es un método sencillo y el más utilizado para evaluar la velocidad de una reacción catalizada por enzimas, consiste en cuantificar el incremento del producto de la reacción en función del tiempo a concentraciones diferentes del sustrato (Stryer et al., 2015). La ecuación de Michaelis-Menten ha sido usada por más de 100 años para evaluar la cinética enzimática (Cornish-Bowden, 2015) y en la actualidad investigaciones diversas confirman que la ecuación de Michaelis-Menten sigue siendo un modelo excelente que permite describir la actividad catalítica de las enzimas (Xue, Liu, & Ou-Yang, 2006).

Cuando el sustrato (**S**) se une al sitio activo de la enzima (**E**) se forma un complejo intermediario (**ES**), durante el estado de transición, el sustrato se convierte

en producto el cual después de un breve periodo de tiempo se disocia de la enzima.

Lo anterior se representa con la fórmula siguiente:



Donde:

$k_1$ : constante de velocidad de la formación de ES.

$k_{-1}$ : constante de velocidad de la disociación de ES.

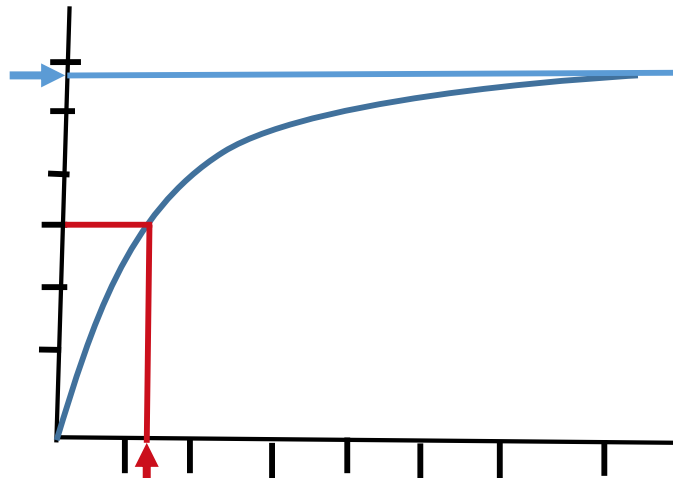
$k_2$ : constante de velocidad de la formación y liberación del producto del sitio activo.

Según el modelo de Michaelis-Menten,  $k_{-1}$  es despreciable en comparación con  $k_1$  y, la velocidad de formación de ES, es igual a la velocidad de su degradación durante el mayor tiempo de la reacción (Mckee & Mckee, 2009; Stryer et al., 2015). Leonor Michaelis y Maud Menten introdujeron una constante nueva, que hoy en día se conoce como la constante de Michaelis ( $k_m$ ), cuyo valor corresponde a la afinidad de la enzima por un sustrato. De este modelo se obtiene la ecuación siguiente:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Donde  $V_{max}$  es la velocidad máxima que puede alcanzar la reacción.  $K_m$  es la concentración de sustrato a la que se obtiene una velocidad igual a la  $V_{max} / 2$  y,

refleja la afinidad de la enzima por el sustrato, cuando menor sea el valor de  $K_m$  mayor será la afinidad de la enzima por la formación del complejo ES (Mckee & Mckee, 2009) y  $[S]$  es la concentración del sustrato. La actividad enzimática se mide en unidades internacionales (UI). Una UI se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto (Mckee & Mckee, 2009; Stryer et al., 2015), o también se puede definir como la cantidad de enzima capaz de transformar 1.0  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto a 25 °C. (Feduchi et al., 2015) Este modelo también se puede representar gráficamente (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Diagrama de Michaelis- Menten.

## 2.5 Inhibidores enzimáticos

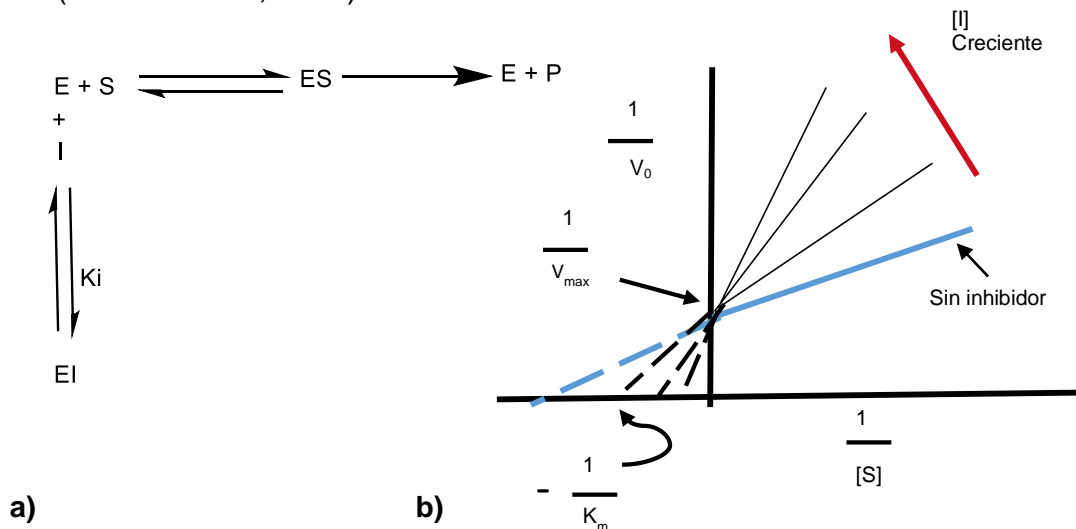
Un inhibidor enzimático es una sustancia, molécula o ion que se une a la enzima disminuyendo su actividad. Esta inhibición es la manera biológica de controlar los mecanismos enzimáticos, siendo este mecanismo de inhibición muy importante para regular las vías metabólicas (Stryer et al., 2015). Estas moléculas

que reducen la actividad enzimática, se encuentran como fármacos, conservadores alimenticios e inclusive venenos, por ejemplo el uso de agentes nerviosos con fines bélicos (Cavalcante et al., 2020). El estudio de la inhibición enzimática es de gran utilidad, ya que permitirá describir el mecanismo de reacción catalizada por las enzimas, pero resulta muy importante para la búsqueda y fabricación de fármacos (Feduchi et al., 2015). Los inhibidores de las enzimas pueden ser reversibles o irreversibles.

### **2.5.1 Inhibidor reversible**

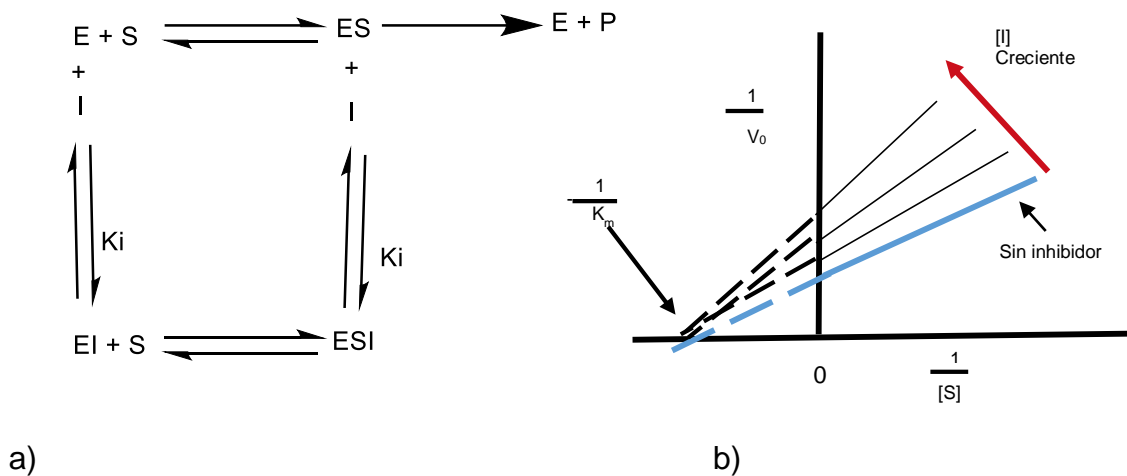
Un inhibidor reversible es aquella molécula que se une a la enzima mediante interacciones no covalentes de forma reversible, entonces, el complejo enzima-inhibidor (**EI**) se disocia rápida y fácilmente (Feduchi et al., 2015; Stryer et al., 2015). La inhibición reversible se origina cuando el efecto ocasionado por el compuesto inhibidor puede ser contrarrestado al aumentar la concentración del sustrato, o bien cuando se elimina la molécula inhibitoria, siempre y cuando la enzima no sufra ningún cambio (Mckee & Mckee, 2009). Dentro de la inhibición reversible, encontraremos tres tipos diferentes de inhibición:

a) **Inhibición competitiva**, se observa cuando el inhibidor se une a la enzima en el mismo sitio que el sustrato, en otras palabras compite con el sustrato para unirse con la enzima en el sitio activo (Stryer et al., 2015) por lo tanto, en la inhibición competitiva no se formará el complejo enzima-sustrato (**ES**) y tampoco se formará el producto (Figura 2.4). En este caso, se formará el complejo enzima-inhibidor (**EI**), el cual se disocia con facilidad dejando a la enzima libre nuevamente para unirse al sustrato. Este tipo de inhibición se puede superar al aumentar la concentración del sustrato, de tal manera que la  $V_{max}$  no cambia, pero  $k_m$  sí aumenta (Mckee & Mckee, 2009). El inhibidor suele ser una molécula de estructura diferente pero semejante al sustrato (Feduchi et al., 2015).



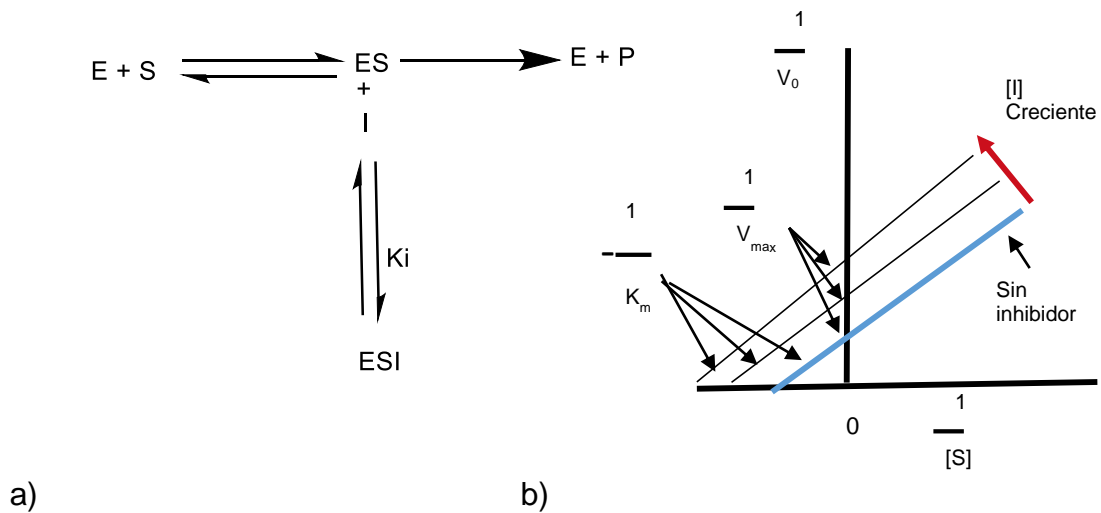
**Figura 2.4.** Representación esquemática de Inhibición competitiva. a) Ecuación que representa la inhibición competitiva en presencia y ausencia de inhibidor (Feduchi et al., 2015). b) Gráfica de Lineaweaver-Burk, para ejemplificar el tipo de inhibición competitiva. Al graficar  $1/V$  frente  $1/[S]$  en presencia de varias concentraciones del inhibidor, no se modifica el intercepto en el eje vertical, como consecuencia la  $V_{max}$  no se modifica. En cambio, el intercepto en el eje horizontal si se modifica, observando que  $K_m$  aumenta. (Mckee & Mckee, 2009).

b) **Inhibición no competitiva.** En este tipo de inhibición enzimática, el inhibidor se une a la molécula de la enzima en un sitio alostérico, diferente al sitio activo, y al unirse, cambiará la conformación de la enzima impidiendo que el sustrato se una a la enzima y por lo tanto no se formará producto. El inhibidor se unirá con la enzima en sitios diferentes favoreciendo la formación de los complejos **EI** y **ESI** con la generación de producto insignificante, este tipo de inhibición es a menudo una inhibición mixta porque afecta la unión del sustrato a la enzima, así como la formación de producto, en este caso  $V_{max}$  disminuye y  $K_m$  permanece sin cambios (Figura 2.5) (Murray et al., 2013; Nelson & Cox, 2015).



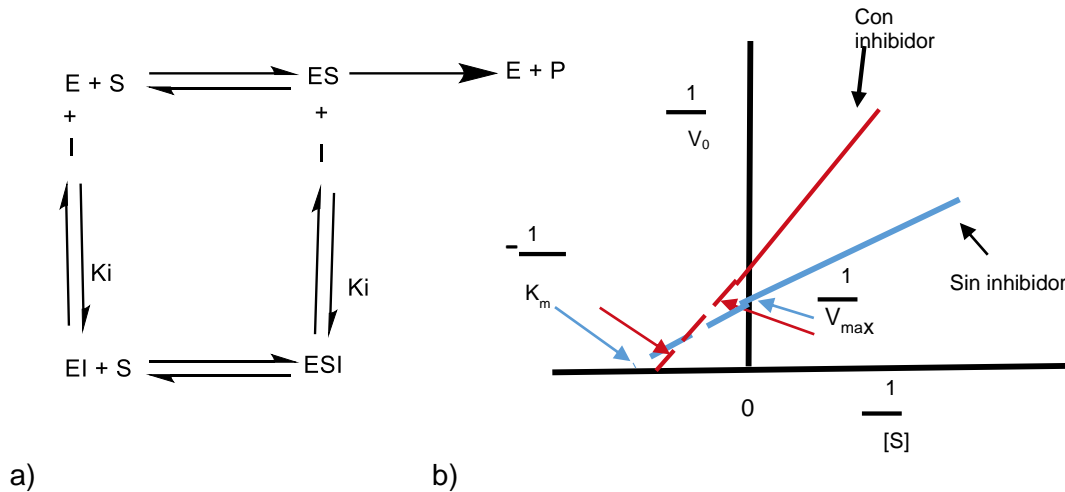
**Figura 2.5.** Representación esquemática de Inhibición no competitiva. a) Ecuación que representa la inhibición no competitiva en presencia y ausencia de inhibidor (Feduchi et al., 2015). b) Gráfica de Lineaweaver-Burk, para representar el tipo de inhibición no competitiva pura. Al graficar  $1/v$  frente  $1/[S]$  en presencia de varias concentraciones del inhibidor, las líneas interceptan el mismo punto en el eje horizontal, por lo que  $K_m$  no cambia. Por el contrario  $V_{max}$ , si se modifica (Mckee & Mckee, 2009).

c) **Inhibición acompetitiva o incompetitiva.** Es aquella inhibición enzimática en la que el inhibidor solo se une al complejo enzima-sustrato, interfiriendo con la formación de producto (Figura 2.6). Este tipo de inhibición no puede superarse al aumentar la concentración del sustrato, por lo que el valor de  $V_{max}$  y  $K_m$  disminuyen (Stryer et al., 2015).



**Figura 2.6.** Representación esquemática de Inhibición acompetitiva. a) Ecuación que representa la inhibición acompetitiva en presencia y ausencia de inhibidor (Feduchi et al., 2015). b) Gráfica de Lineaweaver-Burk, para representar el tipo de inhibición acompetitiva. Al graficar  $1/v$  frente  $1/[S]$  en presencia de varias concentraciones del inhibidor, se observa que las líneas se desplazan hacia arriba y hacia la izquierda, indicando decremento de  $K_m$  y  $V_{max}$  (Mckee & Mckee, 2009).

d) **Inhibidor mixto.** Este tipo de inhibidores enzimáticos pueden unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima–sustrato y, hacen referencia a la combinación de dos tipos de inhibidores, inhibidores competitivos y los inhibidores no competitivos. Se caracterizan porque alteran los valores de  $V_{max}$  y de  $K_m$ . En este caso de la inhibición no competitiva mixta, el valor de la  $V_{max}$  disminuye y  $K_m$  incrementa (Voet et al., 2016)(Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Representación esquemática de la inhibición del tipo no competitiva mixta. a) Ecuación que representa la inhibición no competitiva mixta en presencia y ausencia de inhibidor b) Gráfica de Lineaweaver-Burk, para ejemplificar el tipo de inhibición no competitiva mixta (Mckee & Mckee, 2009). Al graficar  $1/V$  frente  $1/[S]$  en presencia y ausencia de inhibidor, las líneas se interceptan en algún lugar del segundo cuadrante, pero cercano a la línea horizontal. Nótese en la línea con inhibidor, el valor de  $V_{max}$  disminuye y  $K_m$  aumenta

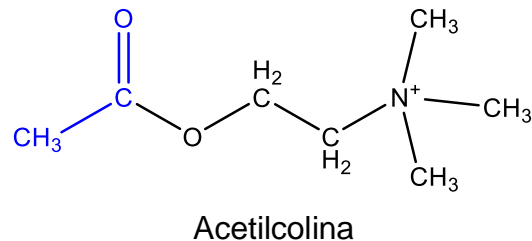
### **2.5.2 Inhibidor irreversible**

Los inhibidores irreversibles son moléculas que se unen a la enzima mediante enlaces covalentes y no tienen el comportamiento cinético de Michaelis-Menten (Feduchi et al., 2015). Este tipo de moléculas son útiles para explicar los grupos funcionales del centro activo de la enzima, los cuales se pueden identificar después que son modificados por el inhibidor (Stryer et al., 2015). Los inhibidores irreversibles se dividen en tres categorías:

- a) Inhibidores irreversibles reactivos específicos de grupo. Son aquellas moléculas que reaccionan con las cadenas laterales de los aminoácidos en el centro activo, modificando la estructura de la enzima.
- b) Inhibidores irreversibles análogos del sustrato (marcados por afinidad). Son moléculas muy parecidas al sustrato y se unen por enlaces covalentes a los residuos de aminoácidos en el centro activo de la enzima.
- c) Inhibidores irreversibles suicidas. Son sustratos modificados, que se unen a la enzima covalentemente y la inactivan de manera permanente.

## 2.6 Acetilcolina y sistema nervioso autónomo

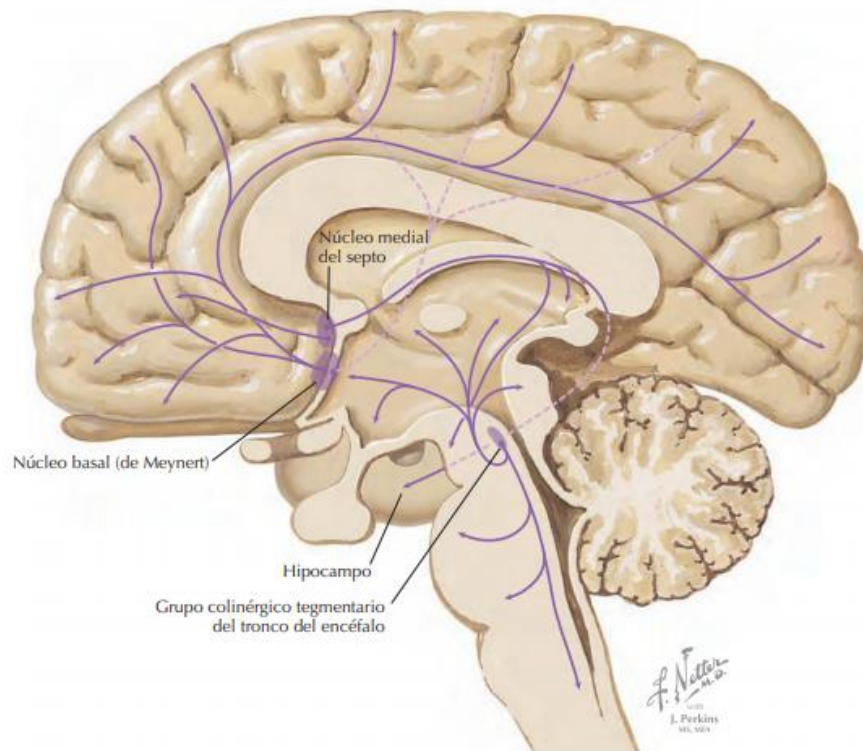
El sistema nervioso autónomo (SNA), también conocido como sistema nervioso visceral, vegetativo o involuntario, se distribuye por todo el cuerpo y las funciones que regula son aquellas que se efectúan sin que se tenga control sobre ellas, está constituido por estructuras diversas como los nervios, ganglios y plexos, que se distribuyen por todo el cuerpo, incluyendo corazón, vasos sanguíneos, vísceras, músculo liso y glándulas. La transmisión del impulso proveniente del SNA hacia los tejidos que inerva, se da en los ganglios nerviosos, a través de la vía parasimpática. Estos ganglios son estructuras complejas donde se lleva a cabo la sinapsis entre las neuronas. Esta sinapsis es posible gracias a la participación de los neurotransmisores, en este caso, la acetilcolina (ACh) (Brunton, 2018) (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** Estructura química de la Acetilcolina (ACh). Un éter de ácido acético y colina (Flores & Segura, 2005).

Un neurotransmisor es una sustancia química secretada por las neuronas, cuya función es transmitir información entre las neuronas o, entre neuronas y células efectoras. En los humanos, los neurotransmisores son de vital importancia para el mantenimiento de las funciones cognitivas, el tono muscular y en la regulación de la función cardíaca; también son los responsables de la regulación del sueño, la

memoria, la conciencia, el aprendizaje, los estados de ánimo, y el apetito (Ashmawy et al., 2019). La ACh es sintetizada en las neuronas a partir de colina y acetil –CoA mediante la enzima acetiltransferasa y, se encuentra tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Figura 2.9) (Brunton, 2018). Todas las regiones de la corteza cerebral, están inervadas por acetilcolina, por lo que la función cortical está determinada en gran medida por la sinapsis colinérgica. La transmisión de señales se da a través de dos grupos de receptores: los receptores muscarínicos (mAChR) y los receptores nicotínicos (nAChR).



**Figura 2.9.** Distribución de las vías colinérgicas en el cerebro. Las neuronas colinérgicas centrales se localizan en el núcleo basal de Meynert y los núcleos septales. Las neuronas del núcleo basal proyectan axones colinérgicos hacia la corteza cerebral y las neuronas colinérgicas septales lo hacen al hipocampo. Estas proyecciones colinérgicas participan en la activación cortical y la memoria, sobre todo la consolidación de la memoria a corto plazo (Felten & Shetty, 2010).

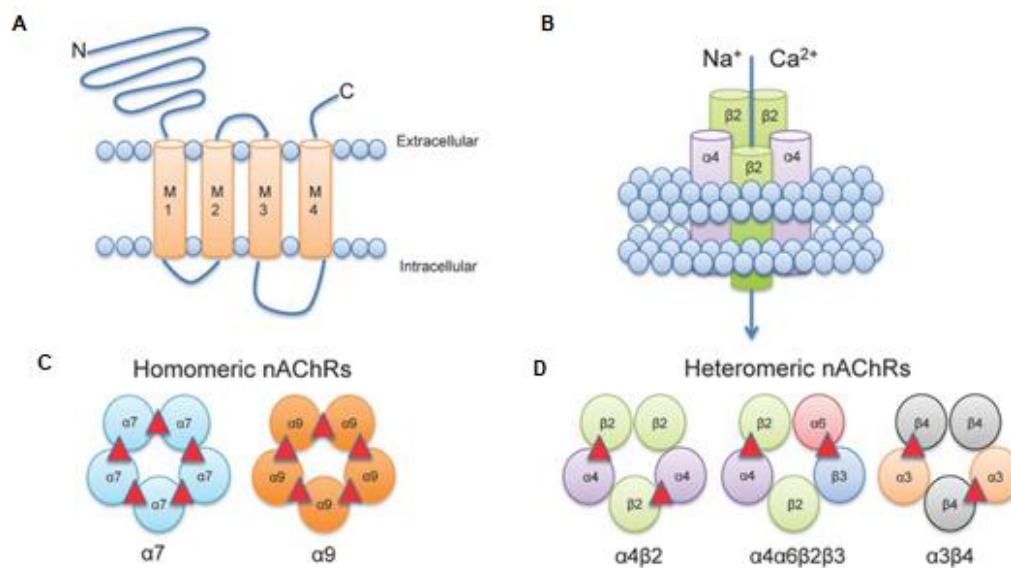
## **2.7 Receptores de la acetilcolina**

Los receptores de la acetilcolina son macromoléculas de naturaleza proteínica que se encuentran en las membranas de las células nerviosas postsinápticas. Estos receptores reconocen a la ACh cuando es liberada al espacio sináptico y por acción de esta, modifican la conformación de la membrana, provocando cambios en ella, haciéndola más permeable a los iones, principalmente al sodio y al potasio, alterando el potencial en la membrana postsináptica y teniendo como resultado que la neurona postsináptica participe en la transmisión de impulsos. Se reconocen dos tipos de receptores colinérgicos, los receptores nicotínicos o ionotrópicos (LGICs: Ligand-gated ion channels) y los receptores muscarínicos, acoplados a proteínas G (GPCRs) llamados metabotrópicos (Chen, Cheuk, Shin, & Kwong, 2019; Flores & Segura, 2005; Sanabria, Alvarado, & Monge, 2017).

### **2.7.1 Receptores nicotínicos**

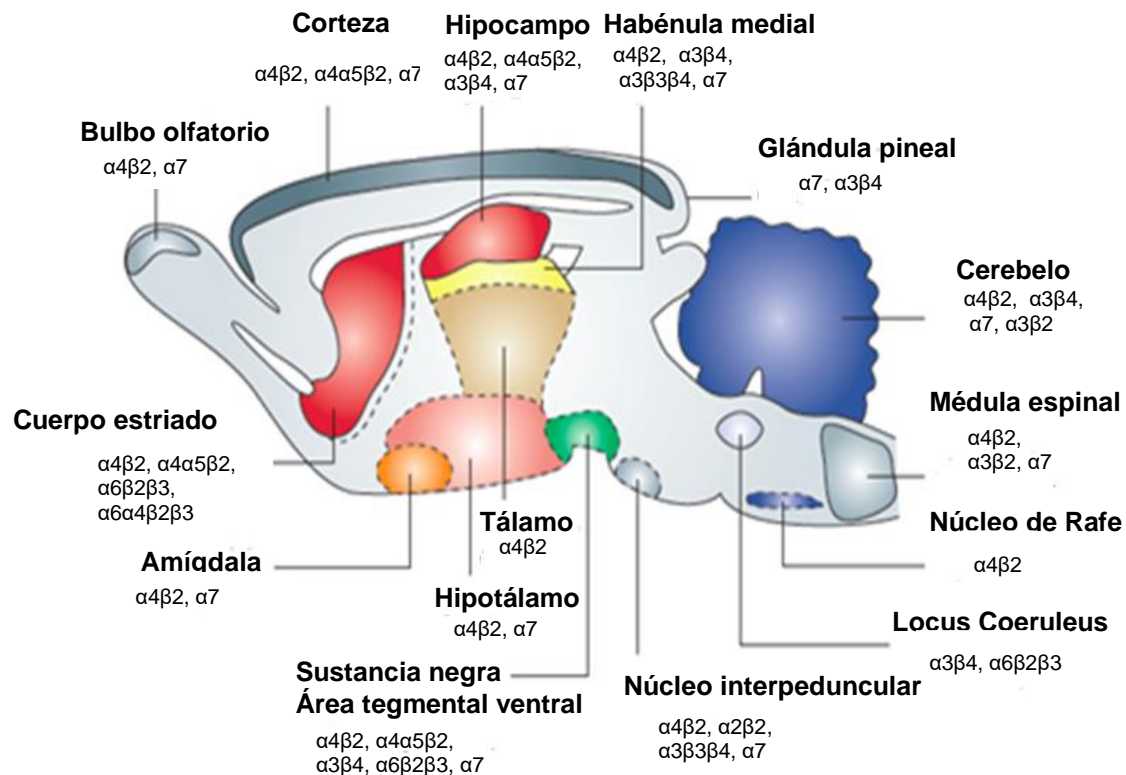
Los receptores nicotínicos de la ACh (nAChR) son una clase importante de receptores excitadores en el sistema nervioso central de los artrópodos y deben su nombre al agonista natural de la ACh (Le Mauff et al., 2020; Pohanka, 2012). Los nAChR son proteínas transmembranales inotrópicas catiónicas, compuestos de 5 subunidades dispuestas alrededor de un poro central, formando un canal catiónico que permite la difusión de los iones  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+2}$  y  $\text{K}^{+}$  a través de la membrana, provocando su despolarización y participan en varios procesos biológicos (Flores & Segura, 2005; Miller & Kamens, 2020). Los nAChR están ampliamente distribuidos

por todo el sistema nervioso central (SNC) donde modulan la liberación de neurotransmisores en las neuronas presinápticas y en el sistema nervioso periférico (SNP) ubicándose en la membrana postsináptica donde median respuestas excitatorias en la sinapsis neuronal rápida (Egleton, Brown, & Dasgupta, 2008). Este tipo de receptores son pentámeros conformados por subunidades distintas ( $\alpha 1 - \alpha 10$ ,  $\beta 1 - \beta 4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) y la conformación más frecuente es la formada por subunidades  $\alpha$  idénticas, una  $\beta$ , una  $\gamma$  y una  $\delta$  organizadas en secuencia formando un poro central (Figura 2.10).



**Figura 2.10.** Conformación de los nAChR. A) Conformación de membrana de una subunidad neuronal nAChR. B) Cinco subunidades se ensamblan para formar una subunidad funcional. C) Los receptores homoméricos constan de subunidades  $\alpha$  solamente. D) Los nAChR de alta afinidad son heteroméricos y consisten en una combinación de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . (Corradi & Bouzat, 2016).

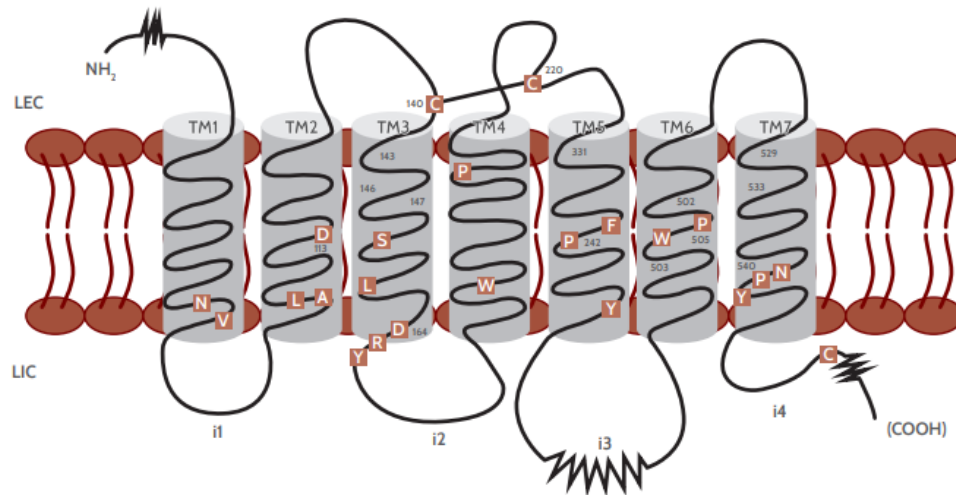
En el sistema nervioso el receptor nicotínico  $\alpha 7$  ( $\alpha 7nAChR$ ) desempeña funciones críticas así como en la vía inflamatoria colinérgica, se ensambla como un homopentámero y es altamente permeable al calcio (Noviello et al., 2021) Se ha observado que en el envejecimiento normal y en algunas enfermedades neurodegenerativas la densidad y número de estos receptores disminuye en la corteza y en el hipocampo, explicando así el déficit en la capacidad de unión a acetilcolina (Chen et al., 2019; Sanabria et al., 2017). Por lo que existe interés importante en el estudio de estos receptores para tratar trastornos del sistema nervioso central como lo son la esquizofrenia, la depresión, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, la adicción al tabaco y la EA (Taly, Corringer, Guedin, Lestage, & Changeux, 2009). La distribución cerebral de estos receptores es homogénea y forman parte de diferentes vías sinápticas, como se muestra en la figura 2.11.



**Figura 2.11.** Distribución de los receptores nicotínicos en el cerebro. ((Gotti, Zoli, & Clementi, 2006). Imagen modificada).

## 2.7.2 Receptores muscarínicos

Los receptores muscarínicos (mAChR) son receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). De manera general, las proteínas G son trímeros heterogéneos formados por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , aunque también hay proteínas G monoméricas. Los GPCRs son glicoproteínas que integran la membrana plasmática con 7 segmentos helicoidales constituidos aproximadamente por 24 aminoácidos que atraviesan la membrana (Figura 2.12).



**Figura 2.12.** Estructura del mACHR. Representación de los siete segmentos transmembrana (TM1 – TM7), bucles extracelulares e intracelulares (i1, i2 y i3), los cuales son importantes porque facilitan el reconocimiento con la proteína G.

La activación de los GCPRs provoca cambios en la concentración de metabolitos en el interior de la célula, lo que provoca efectos de respuesta lenta, pero más duradera, debido a la vida media del metabolito intermediario producido, por lo que a los mACHR también se les conoce como receptores metabotrópicos (Sanabria et al., 2017). De tal manera que las respuestas intracelulares dependen de la proteína G a la cual se acoplan los mACHR, provocando respuestas rápidas o lentas con activación o inhibición de vías de mensaje diversas. Se conocen 5 subtipos de mACHR (M1-M5) que activan vías múltiples de señalización y tienen una función fisiológica muy importante en la conservación de las funciones cognitivas, en la regulación de la contracción muscular y en la frecuencia cardíaca. En ciertas patologías como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, se ha observado que existe una pérdida de la expresión de los receptores M2 en la corteza cerebral (Chen et al., 2019).

Los receptores muscarínicos de ACh se encuentran distribuidos ampliamente en el cerebro. En la Tabla 2.2 se menciona la distribución de estos receptores en el organismo.

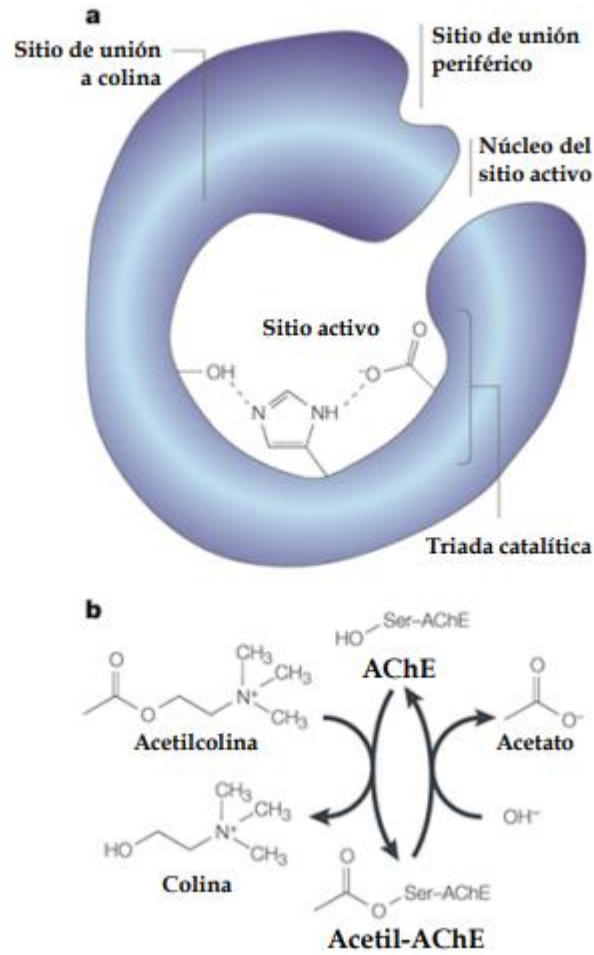
**Tabla 2.2** Distribución de los receptores de tipo muscarínico. ( Flores & Segura, 2005).

M1	M2	M3	M4	M5
Corteza cerebral	Cerebro	Hipocampo	Tubérculo olfatorio	Cuerpo estriado
Ganglios basales	Tronco del encéfalo	Corteza cerebral	Cuerpo estriado	Hipocampo
Tubérculo olfatorio	Hipocampo	Estructuras talámicas	Corteza cerebral	Corteza cerebral
Cerebro medio	Cerebro medio	Cuerpo estriado	Hipocampo	
Hipocampo	Tubérculo olfatorio		Pulmón	
	Corazón			
	Músculo liso			

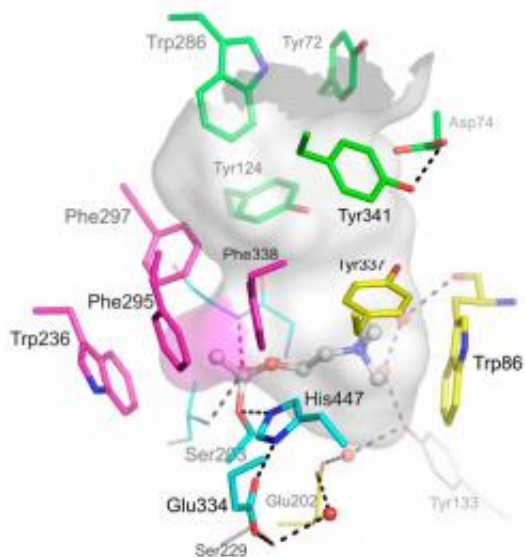
## 2.8 Acetilcolinesterasa

La Acetilcolinesterasa (AChE, E.C. 3.1.1.7) es una enzima serina hidrolasa, según su clasificación, que cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. El sitio activo de la AChE es un desfiladero de 20 Å de profundidad, en el cual se identifican dos sitios de unión del ligando, uno es el sitio catalítico activo (CAS), ubicado en la parte inferior del desfiladero y el segundo es el sitio aniónico periférico (PAS), el cual se ubica en la entrada del desfiladero y por encima del sitio catalítico activo con los residuos de aminoácidos Trp 286, Tyr 124, 72 y 341. El sitio catalítico se divide en dos subunidades; el sitio esterásico con la triada catalítica (compuesta

por unidades de Ser203, His447 y Glu334) y el subsitio aniónico de unión a colina con el Trp86, Tyr337 y Phe338 (numeración de AChE humana). También posee un bolsillo de unión a acilo en donde destacan los residuos de aminoácidos Trp 236 y las Phe 295 y 297, y el orificio oxianiónico formado por residuos de Gly121, Gly122 y Ala204 que interactúan con el oxígeno carbonílico de la ACh (Maraković, Knežević, Vinković, Kovarik, & Šinko, 2016; Rosenberry et al., 2017; Saini & Saxena, 2018). Durante el ataque enzimático de la ACh se forma un éster, un intermediario entre la enzima y el sustrato (acetil-enzima) y la liberación de colina. Al hidrolizarse el intermediario acetil-enzima se obtiene la formación de acetato y enzima activa. La hidrólisis rápida de ACh por la AChE hace de esta última, una de las enzimas más eficientes, ya que una molécula de AChE puede hidrolizar  $6 \times 10^5$  moléculas de ACh por minuto (Brunton, 2018) (Figuras 2.13 y 2.14).



**Figura 2.13.** Esquema de la AChE. a) se ilustra la garganta, el sitio activo con la triada catalítica formada por His-Ser- Glu en un ambiente hidrofóbico. El PAS se observa cerca de la entrada de la garganta. b) En la parte inferior se esquematiza la hidrólisis de la acetilcolina. Imagen tomada y modificada por Loïc Revueltas, 2010. Imagen (Soreq & Seidman, 2001).



**Figura 2.14.** Esquema tridimensional de la AChE humana con una molécula de sustrato, la cual se representa en forma de bola y palo. El bolsillo de unión a acilo se observa de color magenta. Los residuos de aminoácidos de la triada catalítica (Ser 203, His447, Glu334) se representan en barras y los del orificio oxianinónico en líneas, ambos de color azul. Los residuos de los aminoácidos aromáticos claves del bolsillo de unión a colina se muestran de color amarillo. Los residuos del PAS se muestran en color verde. Las moléculas de agua se observan como esferas de color rojo y la densa red de enlaces de hidrógeno esta representada por líneas punteadas (Rosenberry et al., 2017).

La función principal de la AChE es la hidrólisis rápida del neurotransmisor acetilcolina de los receptores nicotínicos en la sinapsis colinérgica (López-Durán et al., 2018; Pouramiri et al., 2017). Para que la acetilcolina pueda realizar su función en la transmisión de impulsos nerviosos debe ser retirada inmediatamente de la placa neuromuscular para evitar la activación de receptores adyacentes, esto es posible gracias a la acetilcolinesterasa (AChE) (Brunton, 2018).

## **2.9 Inhibidores de la acetilcolinesterasa**

La inhibición de AChE, ya sea reversible o irreversible, impide que la enzima destruya a la acetilcolina liberada en la hendidura sináptica de las células nerviosas, teniendo como consecuencia un aumento en la concentración y duración del neurotransmisor, lo que se traduce en una mejora cognitiva en pacientes con deterioro neurológico. (Brunton, 2018). Esto se logra con el uso de compuestos inhibidores de la acetilcolinesterasa también llamados compuestos colinesterásicos o compuestos anticolinesterasa, estos compuestos pueden tener un impacto positivo si se usan para tratar desordenes neurodegenerativos, por ejemplo, en el tratamiento de EA (Saini & Saxena, 2018; Z. Wang et al., 2016). También tienen efectos negativos cuando son utilizados como armas biológicas (Cavalcante et al., 2020) o como pesticidas altamente tóxicos (Ferrer, 2003; Kushwaha, Verma, & Chatterjee, 2016). A continuación, se describirá brevemente la clasificación de estos inhibidores.

### **2.9.1 Inhibidores reversibles**

En esta clasificación de inhibidores se encuentran aquellos compuestos que se unen a la enzima por un tiempo corto, para después disociarse de ella y, por lo tanto, el efecto producido por la inhibición de la acetilcolinesterasa tendrá una duración determinada. Entre los inhibidores reversibles de la AChE de mayor uso encontramos:

### **2.9.1.1 Inhibidores reversibles no covalentes**

Este tipo de inhibidores interactúan con la enzima en un lugar cercano al centro catalítico, compitiendo con la acetilcolina e impidiendo la degradación de esta y, tiene como resultado un aumento en la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica, produciendo una duración prolongada de su efecto. El uso terapéutico de estos inhibidores es en el tratamiento de la enfermedad de EA y en el diagnóstico de la miastenia gravis. En cuanto a su toxicidad, provocan daño hepático. (Brunton, 2018). Por otra parte, también provocan efectos secundarios indeseables como son los calambres, vómitos, diarrea, anorexia y pérdida de peso (López, 2015). Como ejemplos de estos inhibidores podemos mencionar diferentes fármacos: el propidio, el edrofonio, la tacrina, el donepezilo, la galantamina y la fasciculina.

### **2.9.1.2 Inhibidores reversibles del carbamato**

Este tipo de fármacos inhibidores, al igual que el grupo anterior, tienen como objetivo, impedir que la AChE hidrolice a la ACh, para mantener la concentración elevada del neurotransmisor. Algunos de los usos terapéuticos de estos inhibidores son en el tratamiento de la miastenia gravis, la EA y el íleo parálítico. En cuanto a los efectos secundarios que pueden provocar, se encuentran las náuseas, vómito, dolor estomacal, vértigo y broncoconstricción (Brunton, 2018). En esta categoría de inhibidores se encuentran la figostigmina, la neostigmina, la piridostigmina, la rivastigmina y el ambenonio.

### **2.9.1.3 Insecticidas de carbamato**

Los insecticidas del carbamato son compuestos derivados del ácido carbámico. Están catalogados como menos dañinos y menos tóxicos que los compuestos organofosforados por lo que son utilizados en jardinería; sin embargo, se ha demostrado que son peligrosos para organismos acuáticos. El mecanismo de acción que tiene este tipo de compuestos es inhibir la AChE de manera reversible, al unirse al sitio activo de la enzima, produciendo acetilcolinesterasa carbamilada, un complejo inestable que debido a que su enlace es electrovalente en lugar de covalente, permite que la enzima pueda restablecer su actividad frente a la ACh en la sinapsis colinérgica (Ferrer, 2003). Con el uso de este tipo de compuestos se busca inhibir a la AChE para impedir la degradación de la ACh y como consecuencia, la acumulación del neurotransmisor afectará el potencial eléctrico de las células nerviosas, alterando la permeabilidad de las membranas para los iones sodio y potasio, provocando un espasmo muscular, seguido de una parálisis del músculo estriado, falla respiratoria, coma y muerte (Fishel, 2018). Entre los insecticidas representativos de este grupo, se pueden mencionar los siguientes: el carbaril, el propoxur y el aldicarb.

### **2.9.2 Inhibidores irreversibles**

En este grupo se encuentran los compuestos OF. Estos compuestos son éteres del ácido fosfórico, ácido tiofosfórico y otros ácidos fosfóricos y, se caracterizan porque inhiben de forma irreversible a la AChE al unirse al sitio activo de la enzima formando un enlace covalente de manera que sus efectos no se

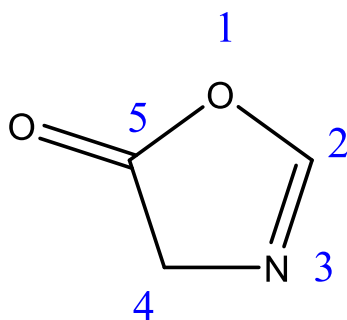
pueden revertir, (Andr & Castillo, 2014) lo que lleva a una pérdida de la función enzimática y provoca una acumulación de ACh en las terminaciones nerviosas, teniendo como consecuencia síndrome colinérgico que lleva a la muerte del organismo con el que tenga contacto (Kushwaha et al., 2016). Su solubilidad alta en lípidos, su peso molecular bajo y su volatilidad alta, facilitan su inhalación, su absorción transdérmica y la penetración en el sistema nervioso central (Scheffel, Thiermann, & Worek, 2015). Entre estos compuestos inhibidores se tiene además a los agentes nerviosos o inhibidores suicidas. Este tipo de sustancias son sustratos modificados que contienen un grupo químico que puede transformarse mediante la reacción originada por el enzima blanco, provocando su inactivación. La interacción con la enzima se da en el sitio activo y genera un grupo muy reactivo que forma un enlace covalente con un residuo aminoácido esencial y bloquea la función de la enzima irreversiblemente (Murray et al., 2013). Entre algunos agentes nerviosos se encuentra el Vx, el ciclosarin, el sarín, el tabun y el DFP. Los pesticidas representativos de este grupo son el paratión, el metilparatión, el malatión, el diazinon y el clorpirifos.

En el caso de los inhibidores de la AChE utilizados en farmacología, se busca mantener por más tiempo el neurotransmisor ACh disponible, para que se lleve a cabo la sinapsis neuronal, esto es útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA, caracterizada por la pérdida de memoria, atención, sueño y aprendizaje. En enfermedades musculares como la miastenia gravis, enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de anticuerpos en contra de los receptores nicotínicos de la acetilcolina circulantes en sangre, así como una

disminución del número de receptores en la placa motora (Herrera Lorenzo, Infante Ferrer, & Casares Albornas, 2009). Estos anticuerpos bloquean la transmisión sináptica acelerando la hidrólisis de la ACh, y en este caso, los inhibidores de la AChE ayudan a mantener concentraciones elevadas del neurotransmisor por más tiempo en la unión neuromuscular, favoreciendo la activación de los receptores presentes y provocando la contracción muscular (Brunton, 2018). En los problemas oculares como el glaucoma, donde hay un deterioro del nervio óptico que, con el tiempo produce ceguera, con el uso de los inhibidores de la AChE se busca aumentar la concentración de ACh en los receptores nicotínicos provocando un aumento de flujo del humor acuoso hacia el exterior reduciendo la presión intraocular (Andr & Castillo, 2014). En el caso de los inhibidores irreversibles como los OF y carbamatos, se busca que actúen contra los insectos de plaga de cultivo de manera efectiva, al evitar la hidrólisis de la ACh, produciendo una acumulación del neurotransmisor en la hendidura sináptica y por ende acumulación en los receptores nicotínicos y muscarínicos, dando como resultado una sobreestimulación de los receptores periféricos y centrales, provocando la interrupción de las funciones vitales del organismo que lo padece, para respiratorio y la muerte (Scheffel et al., 2015).

## 2.10 Oxazolonas

Las oxazolonas o azlactonas son compuestos heterocíclicos de 5 miembros que tienen nitrógeno y oxígeno como heteroátomos que se encuentran en tres formas isométricas, una según la ubicación del carbonilo y dos según la ubicación del enlace doble que contiene (Figura 2.15).



**Figura 2.15** .Estructura química de las oxazolonas o azlactona

Las oxazolonas son intermediarios importantes en la síntesis de varios compuestos como aminoalcoholes aminoácidos y colorantes (Fozooni, Tikdari, & Hamidian, 2008; Tikdari, Fozooni, & Hamidian, 2008; Towns, 1999). Las oxazolonas también son importantes en la fabricación de fármacos con actividad biológica, de tal manera que podemos encontrar el esqueleto de la oxazolonas formando parte de muchos compuestos con función farmacológica, como antibióticos (Fareed et al., 2013; M.A. Pasha et al., 2007; Naganagowda & Petsom, 2017), antidiabéticos (Mariappan et al., 2011), anticonvulsivos (Fareed et al., 2013), antivirales (Pinto et al., 1996), fungicidas y herbicidas (Abdel-aty, 2009), antifúngicos y antimicrobianos (Aparna & Sharada, 2018; Desai, Bhavsar, & Baldaniya, 2009; Sharada et al., 2014) entre otros fármacos. Estudios recientes mencionan que este tipo de compuestos

también presentan inhibición de la AChE y recomendaron con base en sus resultados, realizar una mayor investigación que involucre estudios in vitro (Cavas, et.al. 2017). Por otra parte, también se afirma que los derivados de oxazolonas actúan como agonistas de nAChRs, por lo que representan una alternativa novedosa para ser utilizados como insecticidas y combatir el daño causado al campo por varias especies de plagas (Zhang et al., 2014).

Del contexto anterior, podemos decir que las colinesterasas se han convertido en blanco terapéutico importante para la búsqueda de compuestos nuevos que puedan utilizarse como fármacos auxiliares en el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer o bien en la búsqueda de insecticidas contra de las plagas de cultivo que sean más seguros, menos tóxicos y más eficaces.

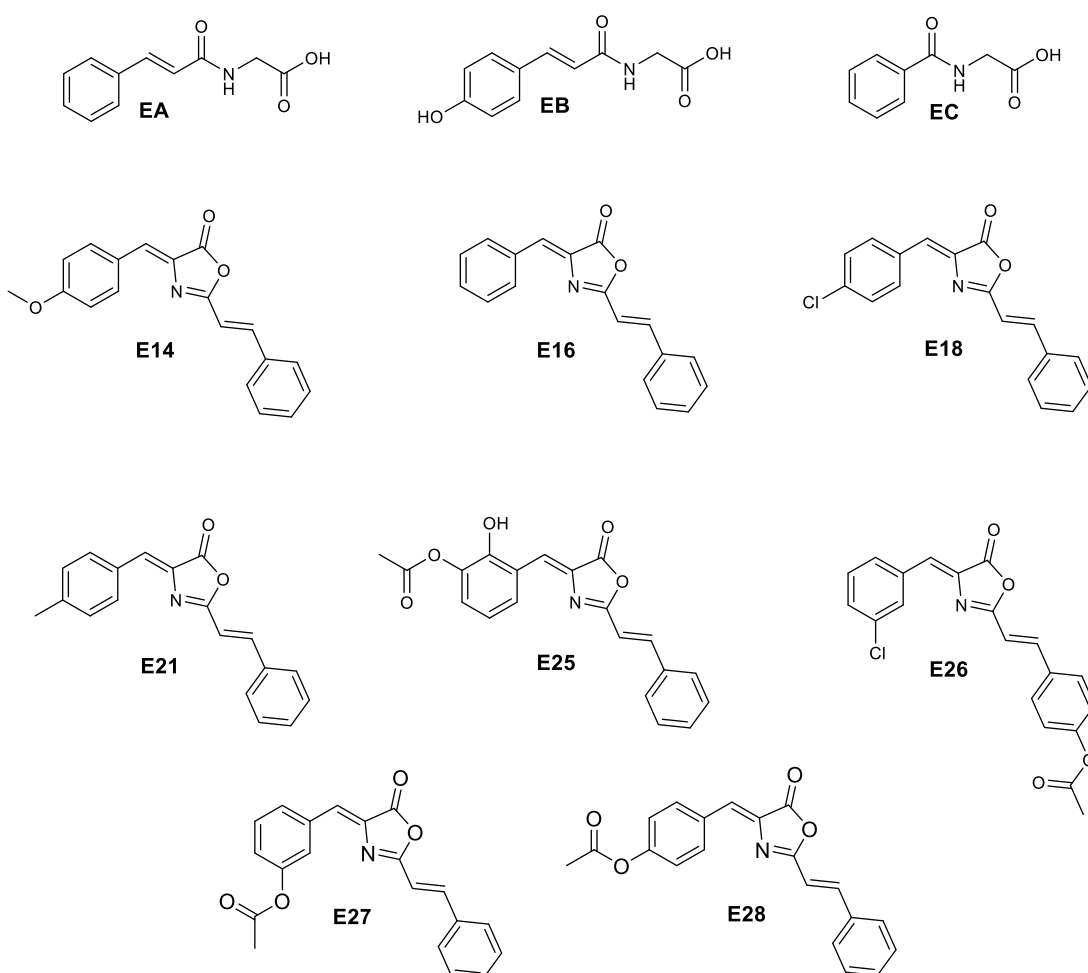
## **CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL**

### 3.1 Materiales y reactivos

1. 8 compuestos derivados de oxazolonas y 3 intermedios sintéticos
2. Enzima acetilcolinesterasa humana marca Sigma Aldrich
3. Acetilcolina (ATCh 28.3 mmol) marca Sigma Aldrich
4. Amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.4 marca Sigma Aldrich
5. Proteína albúmina sérica bovina (BSA) 1% marca Sigma Aldrich
6. Reactivo de Ellman (DTNB 10 mmol) marca Sigma Aldrich
7. Alcohol etílico 96°G.L. Marca Jalmex
8. Tubos eppendorf 1.7 mL y 200  $\mu$ L
9. Puntillas 2,20,1000  $\mu$ L
10. Centrífuga
11. Espectrofotómetro
12. Celdas de reacción de plástico desechable de un paso de luz de 1 cm
13. Micropipetas capacidades de 0.2 a 2  $\mu$ L, 0.5 a 10  $\mu$ L, 2 a 20  $\mu$ L, 10 a 100  $\mu$ L 20 a 200  $\mu$ L y de 100 a 1000  $\mu$ L.
14. Gradillas
15. Mezclador tipo vórtice control de velocidad de 600 a 3200 RPM modelo Genie 2, Scientific Industries, INC, USA
16. Contenedores de plástico para residuos líquidos
17. Agua destilada

### 3.2 Preparación de los compuestos.

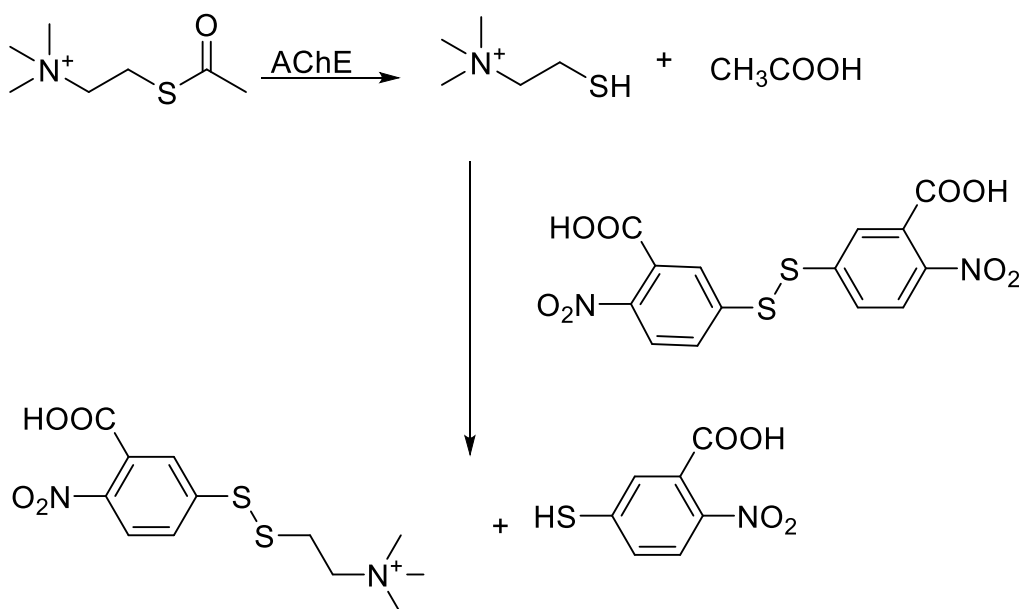
Para la realización de esta investigación se utilizaron ocho compuestos derivados de oxazolonas y tres intermediarios (Figura 3.1), los cuales se sintetizaron y caracterizaron químicamente en el Centro de Graduados e Investigación del ITT en el laboratorio del Dr. Ignacio Rivero Espejel. Cada compuesto se disolvió en alcohol etílico 96 G.L. y se agregó tween 80 al 1%, para posteriormente ser utilizados en la determinación de su capacidad inhibitoria sobre AChE la cual se realizó mediante el ensayo de Ellman.



**Figura 3.1. Estructuras químicas.** Estructuras químicas de los compuestos derivados de oxazolonas que se evaluaron en este estudio.

### 3.3 Ensayo Ellman.

El método de Ellman es el ensayo utilizado comúnmente para medir la actividad de la AChE en estudios *in vitro* y se ha utilizado desde que fue desarrollado en 1961 hasta la actualidad (Ellman et al., 1961). En el ensayo de Ellman se utiliza acetiltiocolina como sustrato y ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), para hacer un seguimiento de la reacción de hidrólisis causada por la enzima, en donde la acetiltiocolina hidrolizada por la AChE libera tiocolina, cuya molécula posee un grupo-SH libre capaz de reaccionar con el DTNB para formar un producto de sustitución y 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB<sup>2-</sup>) (Figura 3.2), el cual tiene un color amarillo; siendo este compuesto el que se medirá espectrofotométricamente a una longitud de onda de 412 nm, para el seguimiento de la catálisis (Ellman et al., 1961; Pohanka, Hrabínova, Kuca, & Simonato, 2011; Rodríguez, Zunino, & Dambolena, 2018).



**Figura 3.2.** Mecanismo químico del método de Ellman (Pohanka et al., 2011)

Para realizar el ensayo de Ellman, se utilizó un espectrofotómetro Jenway modelo 6705 UV/Vis con control de temperatura, Cole-Parmer Reino Unido. Las soluciones de trabajo que se utilizaron fueron preparadas de la siguiente manera.

**A. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 M, pH 7.4.**

Solución 1. Se disolvieron 6 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) en 500 mL de agua destilada.

Solución 2. Se disolvieron 7 g de fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) en 500 ml de agua destilada. Se adicionó la solución monobásica a la dibásica hasta alcanzar un pH de 7.4, aproximadamente se prepararon 700 mL de solución amortiguadora. La solución se conservó en refrigeración.

**B. Solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1%.**

Se pesó 1 g de albúmina bovina y se disolvió en 100 mL de agua destilada, una vez hecha la mezcla se refrigeró para su uso posterior.

**C. Solución amortiguadora de fosfatos con albúmina bovina (PBS 0.1 M, pH 7.4 /0.01%BSA)** Por cada 100 mL de PBS adicionar 1 mL de BSA 1%.

**D. Ácido 5,5'-ditiobis-2- nitrobenzoico (DTNB) 10 mM**

Se pesaron 51.52 mg de DTNB y se diluyeron en 13 mL de PBS 0.1 M, pH 7.4. La mezcla se utilizó para preparar el reactivo de Ellman y el resto se almacenó en alícuotas de 2 mL, las cuales se congelaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### **E. Reactivo de Ellman**

Se prepararon 250 mL de reactivo de Ellman mezclando 242.1 mL de PBS/0.01% BSA con 7.9 mL de DTNB. La mezcla se almacenó a 4°C en frasco ámbar protegida de la luz.

### **F. Acetilcolina (ATCh) 100Mm solución stock**

Se disolvieron 173.50 mg de ATCh en 6 mL de agua destilada fría. Se prepararon alícuotas de 300 µL y se congelaron a -20°C.

### **3.4. Prueba de cribado para determinar la actividad catalítica de los compuestos sobre la enzima.**

Para este experimento se prepararon suficientes tubos eppendorf con 970 µL del reactivo de Ellman, (PBS + BSA al 0.01% + DTNB) los cuales se utilizaron en la determinación de la actividad enzimática para cada compuesto. Se calibró el espectrofotómetro con un blanco de reactivo para cada concentración de los compuestos, colocando en una celda de reacción 970 µL del reactivo de Ellman más lo indicado en la Tabla 3.1 para obtener un volumen final de 1 mL. Para correr los controles, se procedió a colocar en los tubos eppendorf con reactivo de Ellman (970 µL) 9 µL de PBS + BSA al 0.01% y 1 µL de etanol más 10 µL del sustrato (ATCh 5 mM) más 10 µL de la solución de enzima previamente preparada a una concentración de 300 UI, para obtener un cambio de absorbancia de 0.2 a 0.3 Abs/min.

**Tabla 3.1** Contenido de la mezcla de reacción para leer la actividad enzimática a una longitud de onda de 412 nm por 1 minuto.

Reactivo	Problema (μL)	Blanco de reactivo (μL)	Control
PBS. 0.1 M, pH 7.4/BSA 0.01%	9	19	9
Compuesto diluido en etanol	1	1	-
Enzima	10	-	10
Etanol	-	-	1
La mezcla se reservó a temperatura ambiente e inmediatamente se adicionó:			
ATCh 5 mM	10	10	10
Se procedió a leer la actividad en el espectrofotómetro a 412 nm.			

Para realizar el cribado de los compuestos se corrieron los experimentos a dos diferentes concentraciones en la escala micromolar (μM) para tener una concentración final de 100 μM y 300 μM de cada uno. La actividad enzimática se probó a temperatura ambiente por cero minutos (la reacción inició inmediatamente al agregar el sustrato).

Los ensayos se repitieron por triplicado bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para obtener el promedio y la desviación estándar. Una vez obtenidos los datos de la cinética, se calculó el porcentaje de actividad enzimática de acuerdo a la Ecuación 1, para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la Ecuación 2:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\Delta \text{ Abs/min del compuesto}}{\Delta \text{ Abs/min del control}} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$\% \text{ de Inhibición} = 100\% - \underline{\% \text{ Actividad}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Una vez obtenidos los resultados se procedió a graficar el cribado utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0, en donde el eje de las X representó a los compuestos y el eje de las Y representó el % de inhibición enzimática.

### **3.5. Determinación de la potencia de los compuestos con mayor porcentaje de actividad inhibitoria mediante la $CI_{50}$ con la AChE humana.**

Para realizar el estudio de la potencia de los compuestos, se seleccionaron las oxazolonas con una inhibición mayor al 50%, tomado a partir de los resultados de la prueba de cribado. La concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) se midió a una concentración de sustrato fija de 5mM usando ocho concentraciones diferentes de los compuestos, según la Tabla 3.2. Todas las diluciones se llevaron a cabo utilizando etanol como disolvente para preparar las soluciones stock de los compuestos. Para obtener la concentración final de los compuestos se tomó 1 $\mu$ L de la solución stock para obtener una concentración final de solvente no mayor al 1% (Fekonja, Zorec-Karlovsek, El Kharbili, Fournier, & Stojan, 2007; Rodriguez et al., 2018)

**Tabla 3.2.** Preparación de las ocho concentraciones finales con las que se llevó a cabo la determinación de la  $CI_{50}$ , para cada compuesto.

C	M	Log M	[Final] $\mu$ M	[Stock], mM
C1	$1 \times 10^{-7}$	-7	0.1	0.01
C2	$1 \times 10^{-6}$	-6	1	0.1
C3	$1 \times 10^{-5}$	-5	10	1
C4	$5 \times 10^{-5}$	-4.3	50	5
C5	$1 \times 10^{-4}$	-4	100	10
C6	$3 \times 10^{-4}$	-3.52	300	30
C7	$5 \times 10^{-4}$	-3.30	500	50
C8	$1 \times 10^{-3}$	-3	1000	100

La cuantificación de la cinética enzimática se llevó a cabo utilizando el espectrofotómetro anteriormente descrito en la sección 3.1. y en las mismas condiciones de la sección 3.4 de este capítulo.

Para este experimento se prepararon suficientes tubos eppendorf con 970  $\mu$ L del reactivo de Ellman, (PBS + BSA al 0.01% + DTNB) los cuales se utilizaron en las determinaciones de la actividad enzimática para cada concentración de los compuestos. Se calibró el espectrofotómetro con un blanco de reactivo para cada una de las ocho concentraciones diferentes, colocando en una celda de reacción 970  $\mu$ L del reactivo de Ellman más lo indicado en la Tabla 3.1 para obtener un volumen final de 1 mL. Para correr los controles, se procedió a colocar en los tubos eppendorf con 970  $\mu$ L de reactivo de Ellman, más lo indicado en la Tabla 3.1, para obtener un volumen final de 1 mL. La solución enzimática previamente se preparó a una concentración de 300 UI, para obtener un cambio de absorbancia de 0.2 a 0.3 Abs/min.

Los ensayos se repitieron por triplicado bajo las mismas condiciones anteriormente descritas para obtener el promedio y la desviación estándar. Una vez obtenidos los datos de la cinética, se calculó el porcentaje de actividad enzimática de acuerdo a la Ecuación 1, para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la Ecuación 2. Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon a partir de curvas de concentración-respuesta semi-logarítmicas de la concentración de ligando versus la actividad de AChE con respecto al control, utilizando el software GraphPad Prism 8.0.

### **3.7. Determinación de la constante de inhibición y el tipo de inhibición mediante la ecuación de Michaelis-Menten para analizar la afinidad de los compuestos sobre la enzima.**

Para determinar la constante de disociación del conjugado AChE-inhibidor se prepararon 4 concentraciones crecientes del compuesto, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3mM y 0.4 mM, y 5 concentraciones diferentes del sustrato, 5.0 mM, 6.6 mM, 10 mM, 12.5 mM y 20.0 mM, las cuales se prepararon a partir de la solución stock de sustrato a 100 mM, utilizando agua fría como disolvente. La calibración del espectrofotómetro se realizó con un blanco que se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm., colocando en una cubeta de reacción 990  $\mu$ L del reactivo de Ellman con 10  $\mu$ L de sustrato (ACTh 100mM). Se prepararon suficientes tubos ependorff con 970  $\mu$ L del reactivo de Ellman según el procedimiento antes descrito. Se preparó una solución de trabajo de enzima, para lo cual se tomó 1  $\mu$ L de enzima de 1  $\mu$ M y se mezcló con 1000  $\mu$ L de PBS. 0.1 M, pH 7.4/BSA 0.01%, paso posterior se midió su actividad, corriendo un control y se verificó que su actividad se encontrara entre 0.2 y 0.3 Abs/min, para ello se mezclaron 970  $\mu$ L del reactivo de Ellman con 10  $\mu$ L

de sustrato (ACTh 100 mM), 10  $\mu$ L de la enzima y 10  $\mu$ L de PBS. 0.1 M, pH 7.4/BSA 0.01%, se agitó en un mezclador tipo vórtice y se vertió el contenido de la mezcla en una celda de reacción para espectrofotómetro y se tomó la actividad enzimática a 412 nm por 1 minuto.

Para el ensayo se corrieron controles utilizando la solución de enzima y cada una de las concentraciones diferentes del sustrato, según la Tabla 3.3. Para ello se mezclaron 970  $\mu$ L del reactivo de Ellman con 10  $\mu$ L de la enzima más 10  $\mu$ L de etanol, se agitó la mezcla y se adicionaron 10  $\mu$ L del sustrato de concentración menor, inmediatamente se procedió a tomar lectura en el espectrofotómetro. Se realizó el mismo procedimiento para procesar los controles con el resto de los sustratos.

**Tabla 3.3.** Concentraciones de sustrato y compuesto utilizadas para realizar el ensayo y obtener la constante de afinidad ( $K_i$ ).

Oxazolona (mM)	ACTh (mM)				
	0.05	0.066	0.100	0.125	0.2
0 (control)					
0.1					
0.2					
0.3					
0.4					
0.5					

Para el ensayo de inhibición de la enzima se mezclaron 970  $\mu\text{L}$  del reactivo de Ellman con 10  $\mu\text{L}$  de la enzima más 10  $\mu\text{L}$  de la concentración más baja del primer compuesto a ensayar, se agitó la mezcla y se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de sustrato de concentración menor, se leyó la actividad y se verificó que ésta se encontrara entre el 20% y 80% con respecto a la actividad del control para poder seguir con las mediciones de las concentraciones siguientes. Una vez que se leyó la actividad de la enzima inhibida con las concentraciones diferentes del compuesto con el sustrato de concentración menor, se procedió a realizar el mismo procedimiento antes descrito, pero ahora utilizando cada una de las concentraciones diferentes del sustrato. Se realizó el mismo procedimiento para cada compuesto por triplicado. El procesamiento de datos experimentales para definir la afinidad de los inhibidores se realizó mediante un programa de análisis de regresión lineal proporcionado por el software GraphPad Prism 8.0., para obtener la gráfica de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos, en donde la relación de la pendiente y del intercepto representa la constante de afinidad. Todos los datos se muestran como medias  $\pm$  desviación estándar de  $n=3$ .

### **3.5 Determinación de la capacidad de los compuestos para unirse con la enzima mediante un acoplamiento molecular de los compuestos sobre la estructura de AChE-Donepezilo.**

El estudio *in silico* del acoplamiento molecular se realizó para determinar la capacidad de los compuestos para unirse con la enzima, además de predecir en qué sitio de la enzima, los compuestos son afines. El método de acoplamiento molecular automatizado (“docking”) se llevó a cabo con la estructura tridimensional de acetilcolinesterasa humana descargada de Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), (PDB ID: 6O4W). El ligando co-cristalizado en la estructura (donepezilo) fue removido, y la estructura del receptor fue preparada empleando AutoDock Tools 1.5.6 (Sanner, 1999) removiendo moléculas de agua, adicionando hidrógenos y calculando las cargas Gasteiger. El algoritmo de docking empleado fue AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010), considerando una caja con centro en las coordenadas  $x = 87.9541$ ,  $y = 84.5448$ ,  $z = -3.23301$  de tamaño  $30 \times 30 \times 30$  Å. Para cada análisis se generaron 10 poses con una exhaustividad de 8. Para la validación del protocolo de docking se llevó a cabo el análisis sobre el donepezilo co-cristalizado previamente removido de la enzima, y analizando el RMSD obtenido entre la pose resultado y la posición original del ligando. La visualización de las poses resultado y su análisis para encontrar las interacciones ligando-receptor se llevó a cabo con UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). Para el compuesto analizado se generó su modelo molecular mediante UCSF Chimera usando su código SMILES, minimizando la estructura con las condiciones predefinidas por Chimera con parámetros con MMTK y Antechamber (J. Wang, Wang, Kollman, & Case, 2006). Los enlaces rotables y cargas atómicas fueron definidas con AutoDock Tools 1.5.6.

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS**

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en los experimentos, en donde se evaluó la capacidad inhibitoria de ocho compuestos derivados de oxazolonas y tres intermedios sintetizados previamente por el Centro de Graduados e Investigación sobre la enzima acetilcolinesterasa humana.

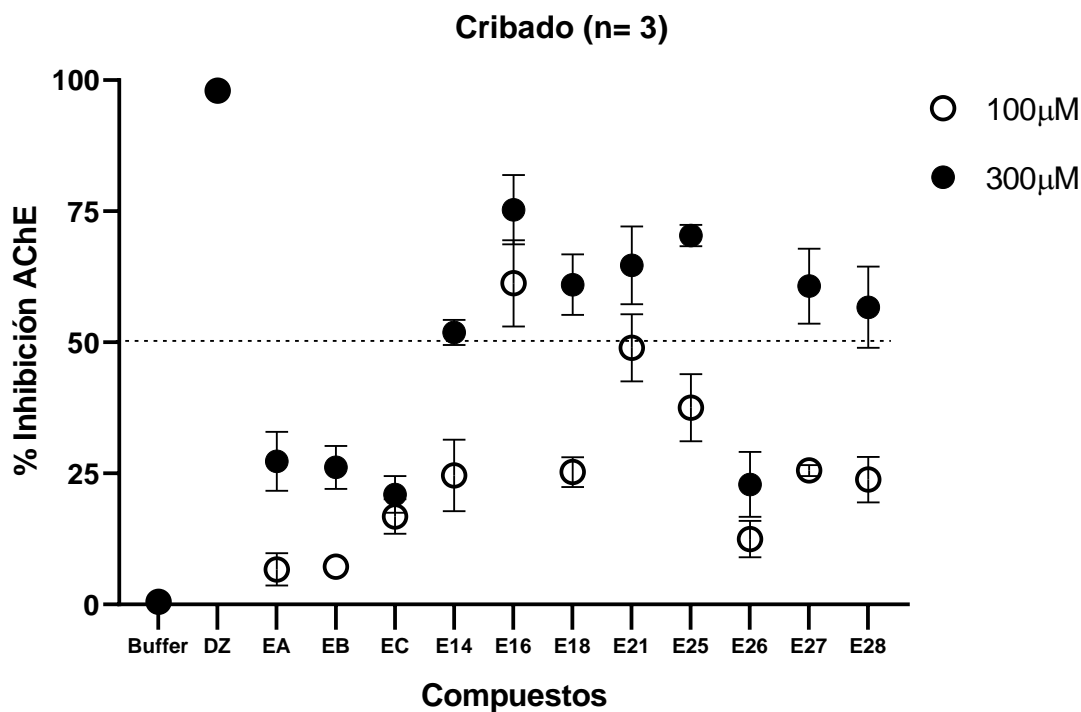
#### **4.1 Prueba de cribado para determinar la actividad inhibitoria de los compuestos sobre la enzima.**

La actividad inhibitoria sobre la enzima AChE humana inducida por los ocho compuestos derivados de oxazolonas y los tres intermediarios sintéticos evaluados en este estudio, se midió utilizando un ensayo espectrofotométrico basado en la reacción de Ellman a temperatura ambiente con todos los compuestos. Los ensayos se realizaron a una concentración de inhibición de 100  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$  sin incubar, encontrando que los ocho compuestos y los intermediarios que se ensayaron inhiben a la enzima en porcentajes diferentes según la prueba de cribado, los resultados se presentan a continuación en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Resultados de la actividad catalítica de los compuestos sobre la enzima AChE.

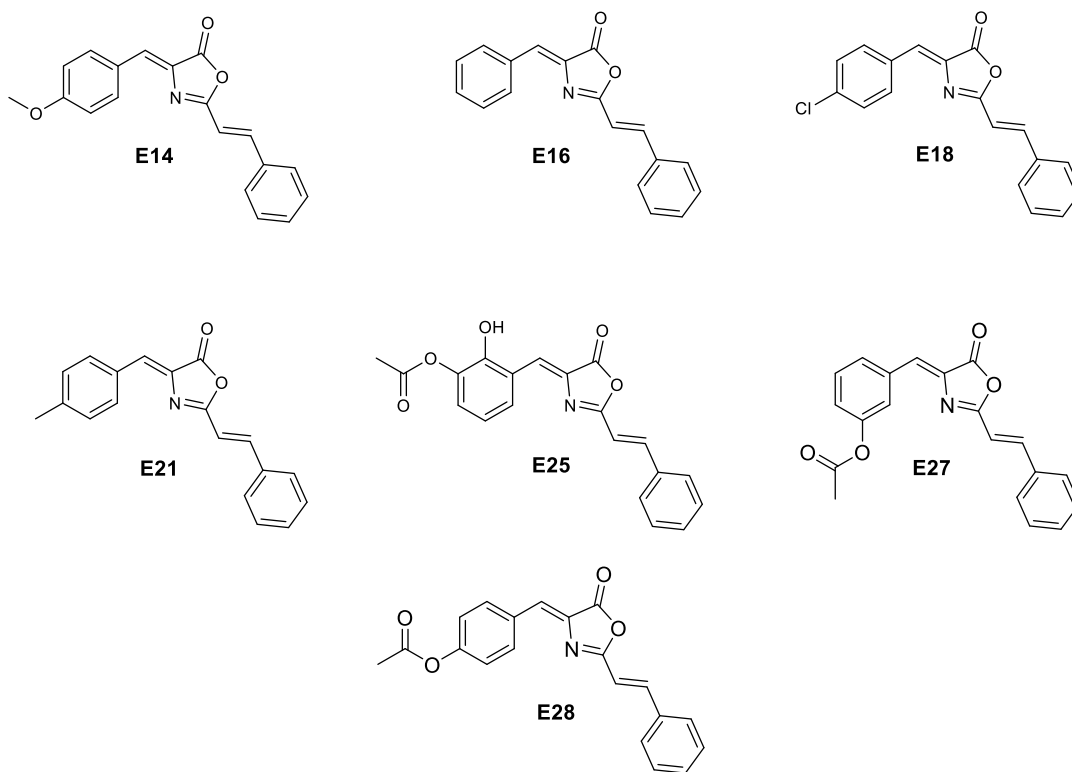
<b>Derivado de Oxazolona</b>	<b>Inhibición 100<math>\mu</math>M (%<b>, SD</b>)</b>	<b>Inhibición a 300<math>\mu</math>M (%<b>, SD</b>)</b>
EA	6.68 $\pm$ 1.09	27.28 $\pm$ 0.62
EB	7.19 $\pm$ 1.43	26.14 $\pm$ 4.08
EC	19.78 $\pm$ 3.3	20.98 $\pm$ 3.49
E14	24.60 $\pm$ 6.8	51.89 $\pm$ 2.37
E16	61.27 $\pm$ 15.2	75.28 $\pm$ 12.6
E18	25.26 $\pm$ 2.85	60.99 $\pm$ 5.77
E21	48.97 $\pm$ 6.40	64.67 $\pm$ 16.42
E25	37.53 $\pm$ 6.40	70.38 $\pm$ 2.04
E26	12.47 $\pm$ 3.49	22.90 $\pm$ 6.20
E27	25.55 $\pm$ 1.06	60.71 $\pm$ 12.14
E28	23.81 $\pm$ 4.33	56.69 $\pm$ 7.74

Con base en los resultados del porcentaje de actividad inhibitoria de los compuestos, sobre la enzima AChE humana presentados en la tabla 4.1, se demostró que los 4 compuestos que inhibieron a la enzima en mayor grado a una concentración de inhibición de 100  $\mu$ M fueron los compuestos E16, E21, E25 y E27. Por otra parte, al aumentar la concentración de inhibición a 300  $\mu$ M, también se incrementó el porcentaje de inhibición de todos los compuestos en este caso, el orden de las actividades de inhibición de los compuestos fue: E16>E25>E21>E18>E27>E28>E14>EA>EB>E26>EC. Los resultados se contrastaron con pruebas control, para este efecto se utilizó solución amortiguadora de fosfatos como control negativo y el donepezilo, un fármaco anticolinesterasa conocido, como control positivo. En la figura 4.1 se muestra la gráfica con el porcentaje de inhibición para cada compuesto a una concentración de inhibición de 100 y 300  $\mu$ M, a temperatura ambiente.



**Figura 4.1.** Porcentaje de inhibición enzimática a dos concentraciones de inhibición. Todos los resultados se muestran como medias y desviación estándar de n=3

Como se puede apreciar en la figura 4.1 los compuestos que presentaron un porcentaje de inhibición por arriba del 50% a 300 μM fueron las oxazolonas siguientes: E14 ( $51.89 \pm 2.37$ ), E16 ( $75.28 \pm 12.6$ ), E18 ( $60.99 \pm 5.77$ ), E21 ( $64.67 \pm 16.42$ ), E25 ( $70.38 \pm 2.04$ ), E27( $60.71 \pm 12.14$ ) y E28 ( $56.69 \pm 7.74$ ), siendo estos compuestos con los que se siguió trabajando para cumplir con en el resto de los objetivos específicos, y las estructuras químicas de estas oxazolonas se muestran en la Figura 4.2. Cabe mencionar que el compuesto E26 y los tres intermediarios sintéticos (EA, EB y EC) presentaron un porcentaje de inhibición inferior al 50%, por lo que se descartaron para realizar el resto de los experimentos.

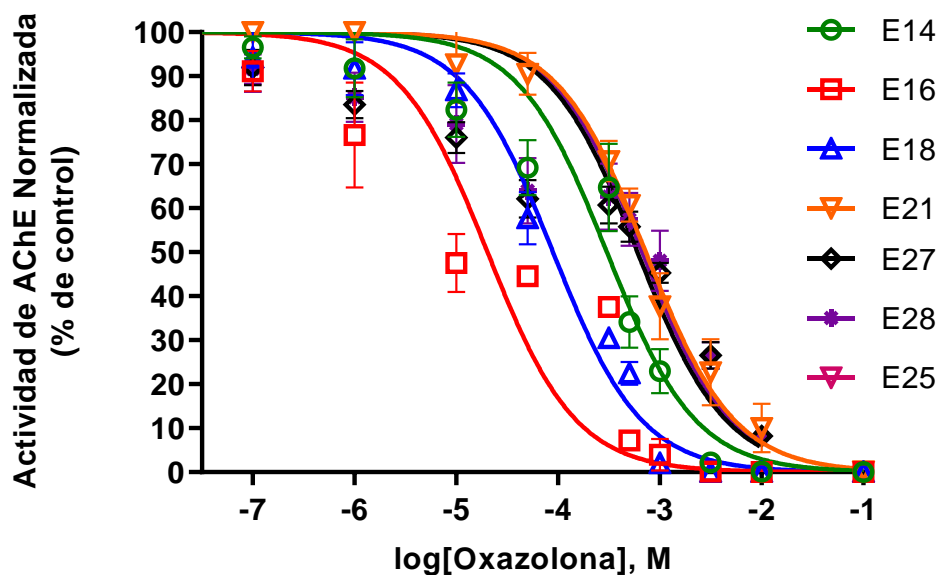


**Figura 4.2.** Estructuras químicas de los ocho compuestos que inhibieron a la enzima entre el 50% y el 75%.

#### 4.2 Determinación de la potencia de los compuestos con mayor porcentaje de actividad inhibitoria mediante la $CI_{50}$ con la enzima AChE

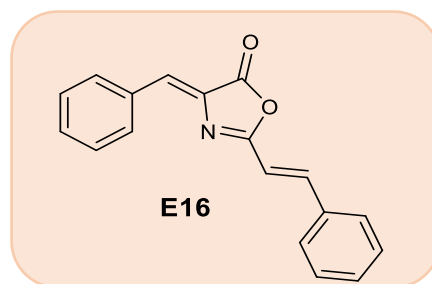
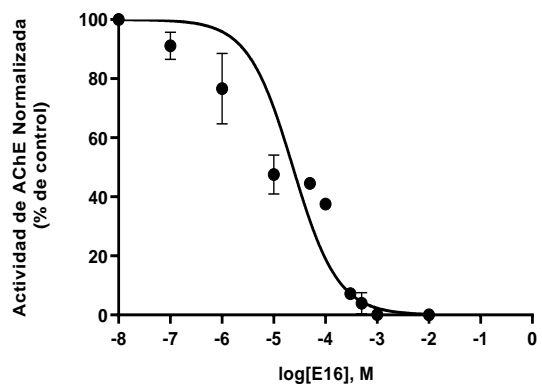
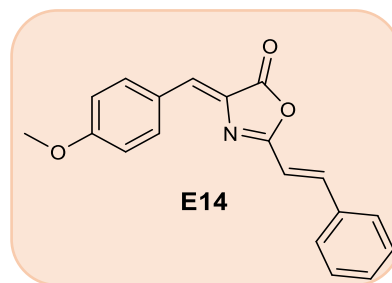
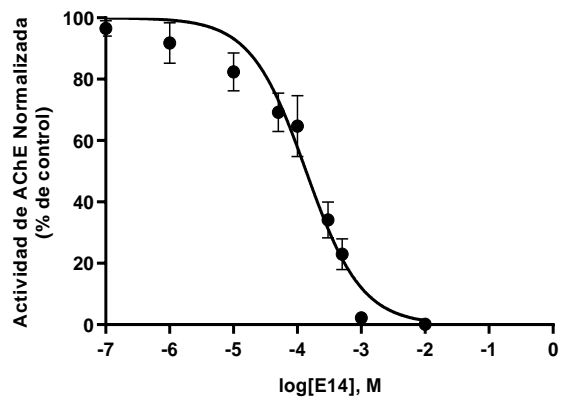
Se seleccionaron los siete compuestos que presentaron mayor porcentaje de inhibición según los resultados de la prueba de cribado, en este caso fueron los compuestos: E14, E16, E18, E21, E25, E27, y E28. La actividad inhibitoria de estos compuestos fue evaluada con ocho concentraciones diferentes de los compuestos y una concentración fija del sustrato, con lo cual se determinó su potencia inhibitoria expresada como la concentración del compuesto que se requiere para inhibir a la enzima en un 50% ( $CI_{50}$ ), con los resultados experimentales se graficó el porcentaje

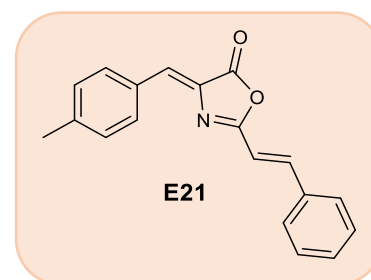
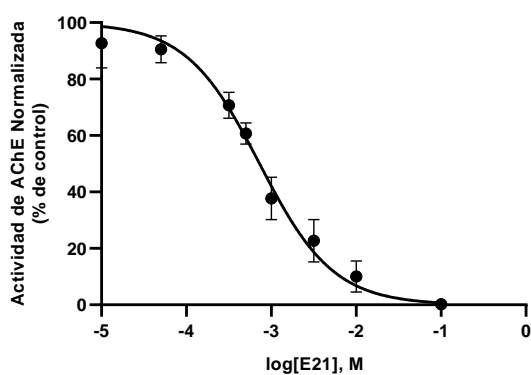
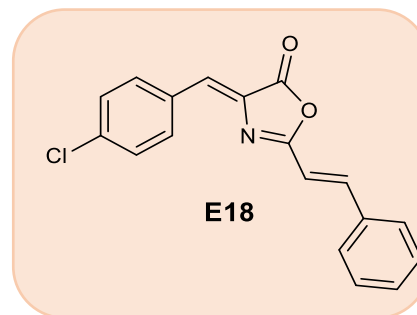
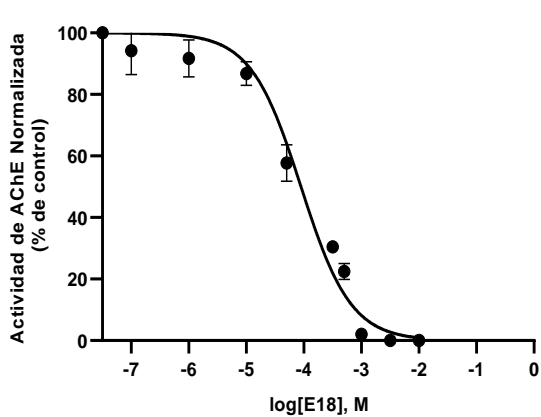
de actividad enzimática contra el logaritmo de la concentración de los compuestos, como se muestran en la Figura 4.3.



**Figura 4.3.** Curvas concentración-respuesta de las siete oxazolonas ensayadas. Todos los resultados están expresados como medias y desviación estándar de n=3.

La gráfica anterior corresponde al concentrado de las curvas concentración-respuesta, representada como logaritmo de la concentración de las oxazolonas utilizadas en este ensayo contra la actividad de la enzima con respecto al control. Donde se deduce que las curvas más cercanas al eje de las ordenadas corresponden a los compuestos con mayor potencia. De igual manera en la figura 4.4 se pueden apreciar las gráficas individuales de las oxazolonas E14, E16, E18, E21 y E25 junto con su estructura química. En este ensayo las gráficas de los compuestos E27 y E28 no fueron determinadas.





**Figura 4.4.** Gráficas curvas dosis-respuesta de cuatro compuestos.

Con base en los valores de la  $CI_{50}$  obtenidos en el ensayo para cada compuesto, se determinó que el compuesto que inhibe con mayor potencia a la enzima AChE es la oxazolona E16 ( $9.2 \pm 2.3 \mu\text{mol/L}$ ), seguida por la oxazolona E25 ( $37.10 \pm 1.61 \mu\text{mol/L}$ ) y en tercer lugar la oxazolona E18 ( $89.33 \pm 22.33 \mu\text{mol/L}$ ). Las 4 oxazolonas restantes tienen valores de  $CI_{50}$  entre 95 y  $246 \mu\text{mol/L}$ , como se puede apreciar en la tabla 4.2, en donde se recopilan los valores de la  $CI_{50}$  para cada

derivado de oxazolonas que demostró una inhibición mayor al 50% en a prueba de cribado.

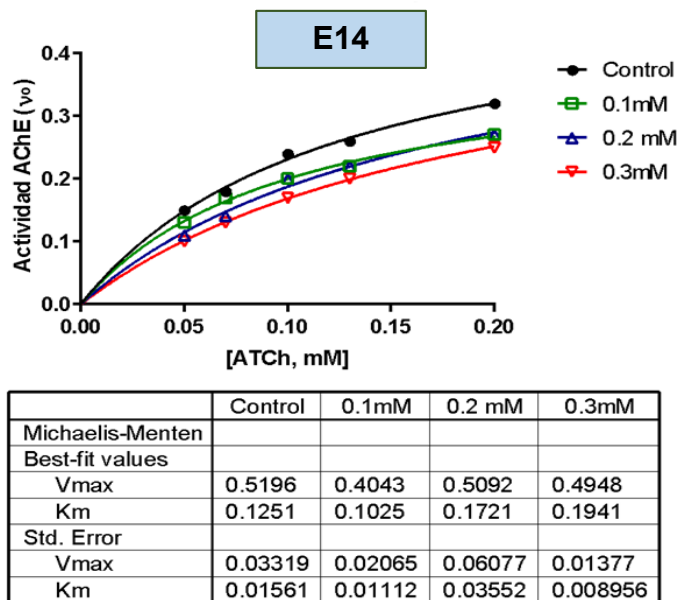
**Tabla 4.2.** Resultados de  $CI_{50}$  de los siete compuestos que presentaron mayor porcentaje de inhibición.

<b>Derivado de Oxazolona</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>
E14	$136.8 \pm 34.2$
E16	$9.2 \pm 2.3$
E18	$89.33 \pm 22.33$
E21	$95.48 \pm 1.47$
E25	$37.10 \pm 1.61$
E27	$203.9 \pm 39.7$
E28	$246.3 \pm 51.2$

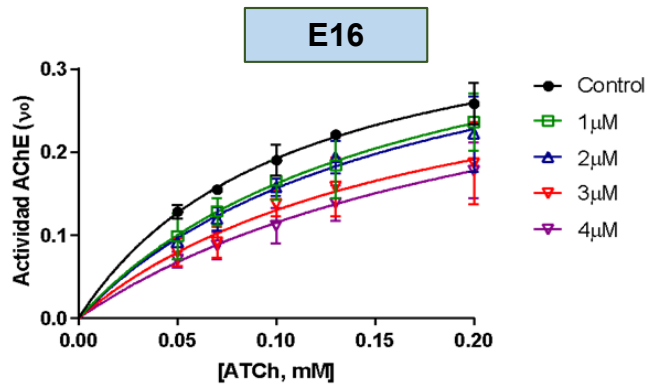
#### **4.3. Determinación de la constante de inhibición ( $K_i$ ) y el tipo de inhibición mediante la ecuación de Michaelis-Menten para analizar la afinidad de los compuestos sobre la enzima.**

Para conocer la afinidad de los compuestos para unirse a la enzima AChE humana, se determinó la constante de inhibición ( $K_i$ ) para cada compuesto. Para ello se utilizaron cinco concentraciones crecientes del sustrato y cuatro concentraciones diferentes de los compuestos derivados de oxazolonas, mediante análisis no lineal con el método de Michaelis-Menten. Tal método permitió determinar las constantes cinéticas necesarias para determinar el modo de inhibición de los compuestos estudiados. Con la metodología utilizada se estimó la velocidad máxima alcanzada en la reacción ( $V_{max}$ ) a partir de velocidades iniciales ( $V_0$ ) traducidas como actividad enzimática. Este parámetro se representa en los gráficos no lineales (Michaelis-Menten) como la asíntota horizontal e indica que toda la enzima está saturada por el sustrato (ES). También se determinó  $K_m$  o constante

de Michaelis, la cual se define como la concentración de sustrato a la cual se obtiene la mitad de la  $V_{max}$ , esta constante indica la afinidad de la enzima por el sustrato. De tal manera que valores pequeños de  $K_m$ , indican mayor afinidad de la enzima por el sustrato y valores de  $K_m$  grandes, indican poca afinidad de la enzima por el sustrato. En los gráficos no lineales, la  $K_m$  la encontramos en el eje horizontal o de las ordenadas. Cada modo de inhibición tiene un comportamiento propio con base en los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$ , lo cual se explica en la Figura 4.5, en donde se representan las gráficas de Michaleis-Menten para los ocho compuestos estudiados.

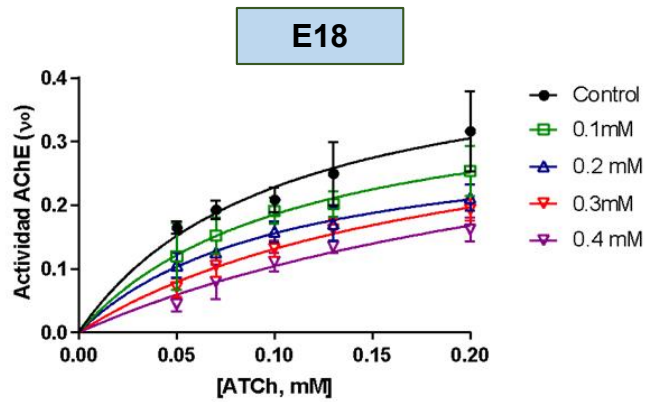


A)



	Control	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M	3 $\mu$ M	4 $\mu$ M
Michaelis-Menten					
Best-fit values					
Vmax	0.3987	0.4271	0.4188	0.3605	0.3890
Km	0.1073	0.1635	0.1677	0.1770	0.2378
Std. Error					
Vmax	0.03011	0.09359	0.08987	0.1091	0.1098
Km	0.01689	0.06312	0.06280	0.09176	0.1042

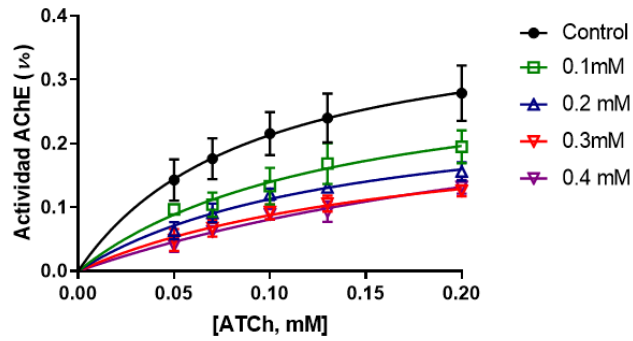
B)



	Control	0.1mM	0.2 mM	0.3mM	0.4 mM
Michaelis-Menten					
Best-fit values					
Vmax	0.4609	0.3914	0.3189	0.3906	0.4333
Km	0.1019	0.1110	0.1046	0.1974	0.3152
Std. Error					
Vmax	0.07955	0.07443	0.03874	0.06761	0.1506
Km	0.03748	0.04335	0.02677	0.05633	0.1568

C)

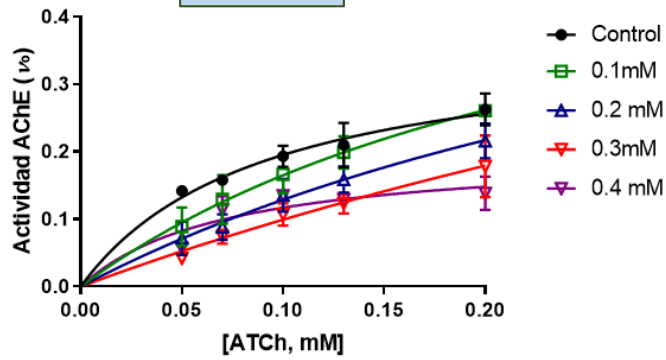
### E21



	Control	0.1mM	0.2 mM	0.3mM	0.4 mM
Michaelis-Menten					
Best-fit values					
Vmax	0.4080	0.3299	0.2712	0.2430	0.3554
Km	0.09133	0.1364	0.1402	0.1771	0.3388
Std. Error					
Vmax	0.06419	0.06616	0.03676	0.04755	0.09952
Km	0.03217	0.05161	0.03547	0.05934	0.1333

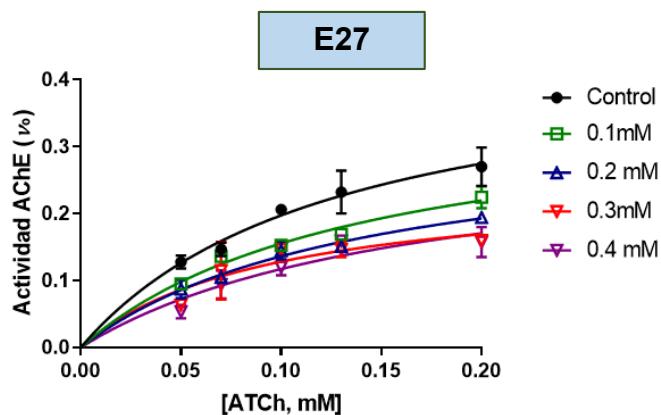
D)

### E25



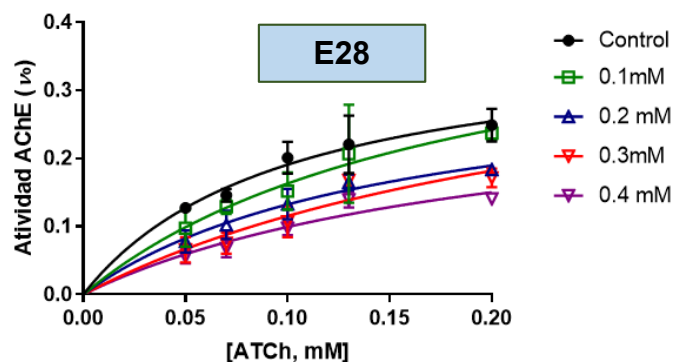
	Control	0.1mM	0.2 mM	0.3mM	0.4 mM
Michaelis-Menten					
Best-fit values					
Vmax	0.3720	0.6322	0.6940	0.9339	0.2012
Km	0.09070	0.2835	0.4397	0.8426	0.07224
Std. Error					
Vmax	0.03774	0.1705	0.2828	0.8644	0.03608
Km	0.02067	0.1127	0.2366	0.9167	0.03245

E)



F)

	Control	0.1mM	0.2 mM	0.3mM	0.4 mM
Michaelis-Menten					
Best-fit values					
Vmax	0.4520	0.3738	0.3293	0.2499	0.3128
Km	0.1290	0.1405	0.1416	0.09476	0.1668
Std. Error					
Vmax	0.05459	0.03436	0.02902	0.04962	0.07586
Km	0.03007	0.02409	0.02320	0.04143	0.07075

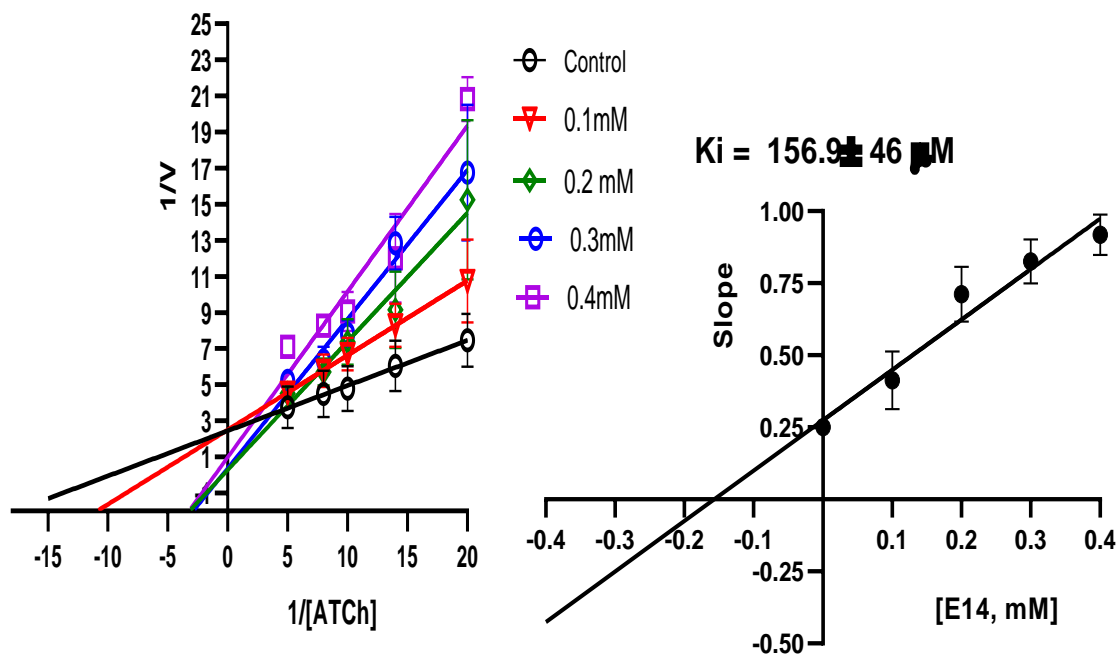


G)

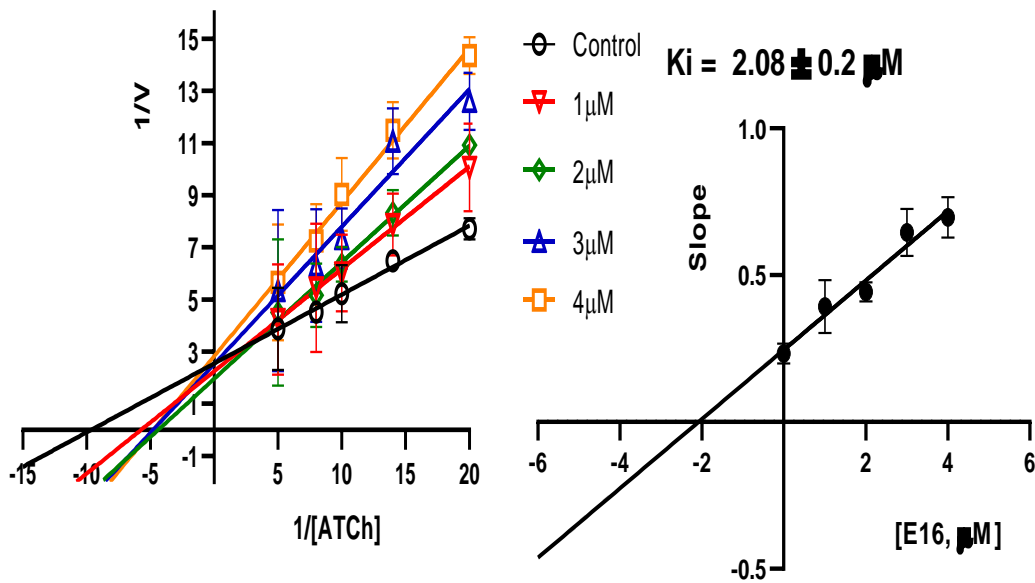
	Control	0.1mM	0.2 mM	0.3mM	0.4 mM
Michaelis-Menten					
Best-fit values					
Vmax	0.3816	0.4675	0.3329	0.4290	0.3081
Km	0.1002	0.1869	0.1518	0.2722	0.2106
Std. Error					
Vmax	0.05085	0.1426	0.05343	0.1505	0.07418
Km	0.02866	0.09579	0.04412	0.1424	0.08184

**Figura 4.5.** Gráficas de Michaelis- Menten para cada compuesto. En donde se graficó la actividad de la enzima contra 5 concentraciones diferentes del sustrato. Resultados contrastados con un control de enzima sin inhibir.

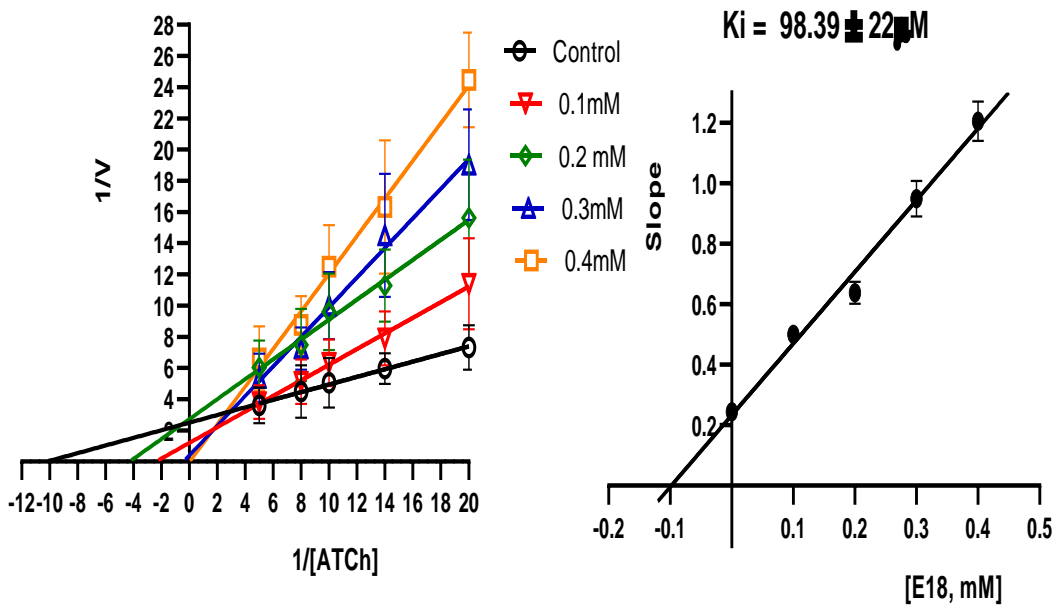
La determinación de los parámetros cinéticos se realizó con un método no lineal, el cual fue transformado a un método lineal para ser analizado fácilmente. En este caso se utilizó el método de los dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk, en donde se graficó  $1/V$  contra  $1/[S]$ , de esta manera se encontraron los valores exactos de los parámetros cinéticos;  $K_m$  en el intercepto de la línea en el eje de las ordenadas y  $V_{max}$  en el intercepto en el eje de las abscisas. Corroborando así los valores obtenidos con el método no lineal. Con las pendientes obtenidas de cada concentración ensayada en el gráfico de los dobles recíprocos, se obtuvo una gráfica secundaria en donde se graficaron las pendientes de cada concentración contra las diferentes concentraciones de los compuestos para obtener una pendiente en la cual el intercepto en el eje de las ordenadas corresponde a la constante de inhibición ( $K_i$ ) o constante de equilibrio de la disociación del complejo. El cual indica la afinidad del inhibidor por la enzima. Valores pequeños de  $K_i$  hablan de gran afinidad entre el inhibidor y la enzima, valores grandes de  $K_i$  indican poca afinidad entre el inhibidor y la enzima. En la Figura 4.6 se representan los gráficos de los dobles recíprocos y las gráficas secundarias para conocer la  $K_i$ , para cada compuesto.



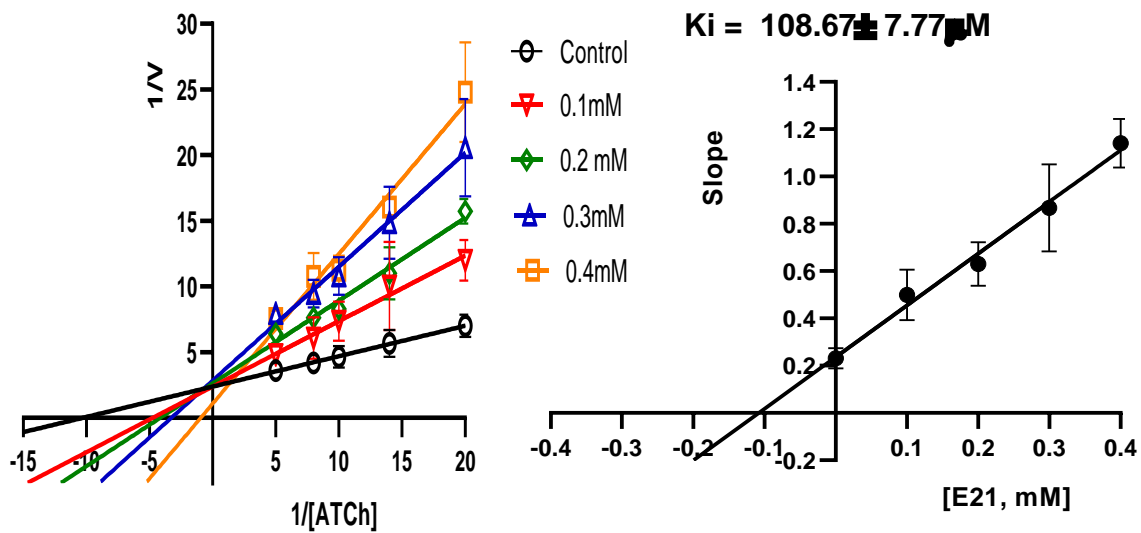
A)



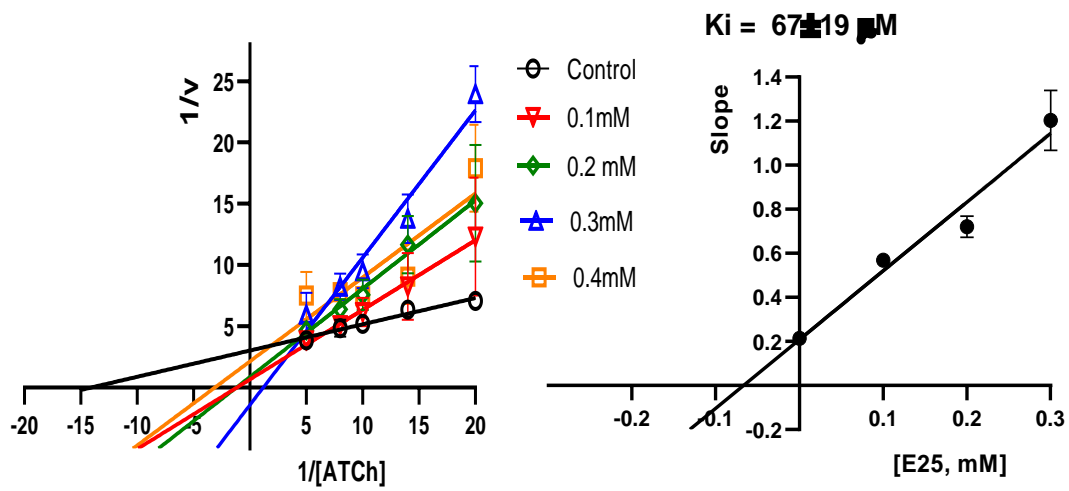
B)



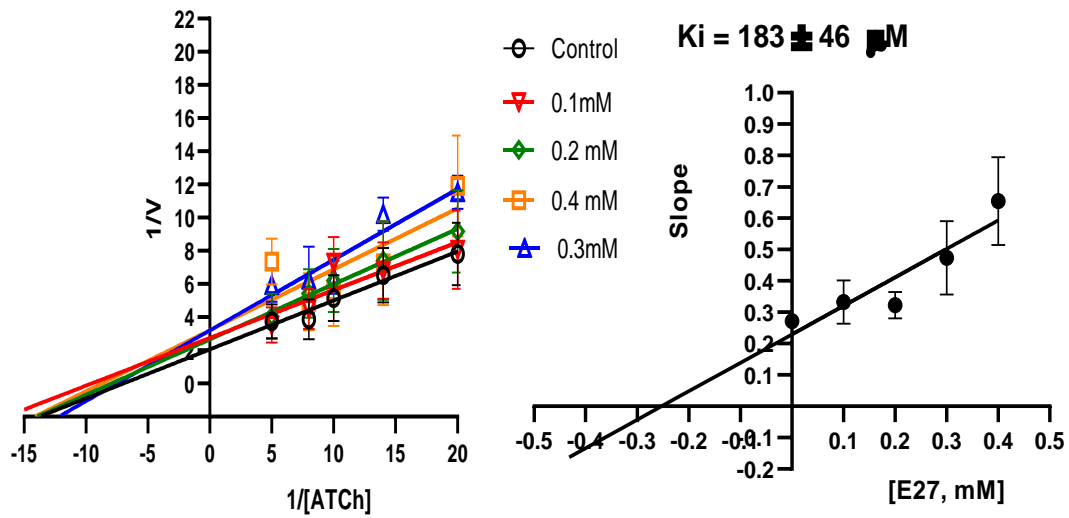
C)



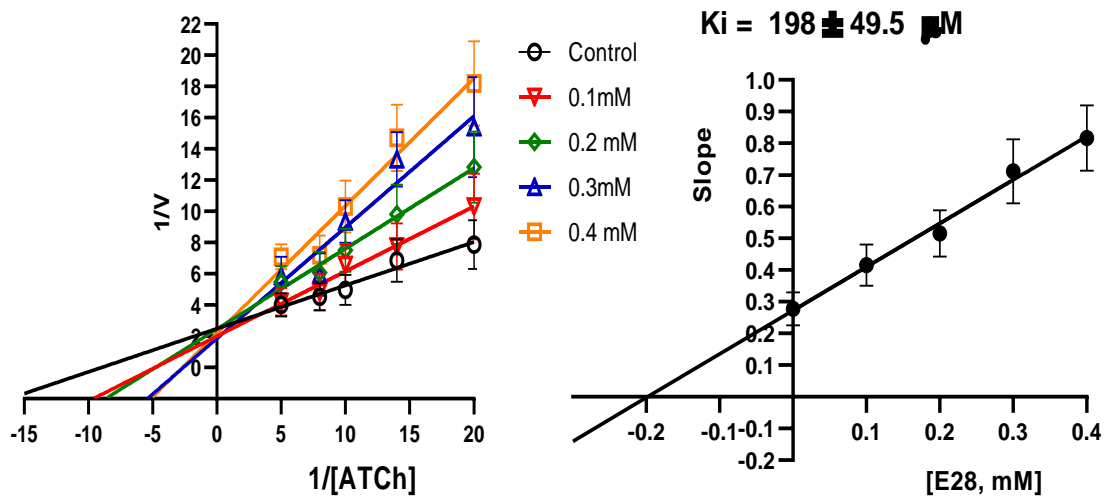
D)



E)



F)



G)

**Figura 4.6.** Gráficas de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos de los siete compuestos derivados de oxazolonas. En donde se grafica la velocidad inicial de la enzima frente a las concentraciones de sustrato en presencia y ausencia de inhibidor. Se presentan las gráficas de los dobles recíprocos para las diferentes oxazolonas frente a la enzima AChE humana junto a su gráfica secundaria con la cual se determinó el valor de la  $K_i$ . A) oxazolona E14 (inhibidor competitivo). B) oxazolona E16 (inhibidor competitivo). C) oxazolona E18 (inhibidor competitivo). D) oxazolona 21 (inhibidor competitivo). E) oxazolona 25 (inhibidor competitivo). F) oxazolona E27 inhibidor no competitivo). G) oxazolona E28 (inhibidor competitivo). Los resultados fueron contrastados con un control de enzima sin inhibir.

El análisis de las gráficas de Michaelis – Menten indica que, con respecto al control, 5 de los 7 compuestos ensayados se comportan como inhibidores competitivos, en los cuales sus valores de  $K_m$  aumentan conforme se incrementa la concentración del inhibidor, mientras la  $V_{max}$  no presenta cambios significativos. Por otra parte, los gráficos de Lineweaver-Burk muestran que cada pendiente obtenida para cada concentración de inhibidor se intercepta en el eje vertical, por lo que se corrobora, que los compuestos E14, E16, E18, E21 y E25 compiten con el sustrato por el sitio activo de la enzima. En contraste, basándonos en el análisis de los mismos gráficos, el compuesto E27 se comporta como un inhibidor no competitivo al no aumentar significativamente el valor de su  $K_m$ , mientras que los valores de

$V_{max}$  disminuyen. Por último, el comportamiento del gráfico del compuesto E28 no es concluyente para poder determinar el modo de inhibición, dado que, se observa que a las concentraciones de 0.2 y 0.3  $\mu\text{M}$  el compuesto se comporta como inhibidor no competitivo al disminuir la  $V_{max}$ , mientras el valor de  $K_m$  no cambia significativamente. Y presenta el mismo comportamiento para las concentraciones de 0.3 y 0.4  $\mu\text{M}$ . Como se puede apreciar en las gráficas, este compuesto se comporta como inhibidor no competitivo a las concentraciones antes mencionadas, pero si observamos en la gráfica, las líneas se interceptan en el mismo lugar en el eje vertical, por lo que podríamos decir que también se comporta como inhibidor competitivo. Por lo anterior fue necesario determinar el valor de  $\alpha$  para poder caracterizar al compuesto.

Con respecto a los valores de la constante de inhibición ( $K_i$ ) obtenidos de las gráficas secundarias de las pendientes determinadas en las gráficas de los dobles recíprocos contra la concentración del inhibidor, se estableció que el orden de afinidad de los compuestos por la enzima es el siguiente: E16>E25>E18>E21>E14>E27>E28. De los cuales, las oxaxolonas E16 (2.08  $\mu\text{M}$ ), E25 (67.0  $\mu\text{M}$ ) y E18 (98.39  $\mu\text{M}$ ) las que presentan una afinidad mayor para unirse a la enzima. El resto de los compuestos tienen una  $K_i$  entre 108 y 257  $\mu\text{M}$ , lo que refleja poca afinidad de unión. En la tabla 4.3 se recopilan los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  aparentes (valor que se mediría ni no se supiera que hay inhibidor presente) y el valor de alfa ( $\alpha$ ), que refleja el efecto que ejerce un inhibidor sobre la afinidad de la enzima por su sustrato y de igual manera refleja el efecto del sustrato sobre la afinidad de la enzima por el inhibidor y es útil para corroborar el modo de inhibición que presentan los compuestos. Se habla de inhibición competitiva cuando  $\alpha > 1$  y

refleja la unión del inhibidor a la enzima libre. Inhibición no competitiva cuando  $\alpha = 1$  e indica que el inhibidor tiene la misma afinidad por la enzima y el sustrato. Inhibición acompetitiva cuando  $\alpha$  es  $< 1$ , pero mayor que cero, indica que el inhibidor se une casi por completo al complejo enzima sustrato.

**Tabla 4.3.** Resultados de las  $K_i$ , el valor de  $\alpha$ ,  $V_{max}$  y  $K_m$ , para cada compuesto evaluado bajo un modelo mixto en el programa estadístico GraphPad Prism 8.0.

Derivado de oxazolona	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$\alpha$	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/L/min}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )
E14	$156.9 \pm 46$	4.16	$0.4390 \pm 0.087$	0.1185
E16	$2.08 \pm 0.36$	21.84	$0.4092 \pm 0.081$	0.1128
E18	$98.39 \pm 24$	$>1000$	$0.4785 \pm$	0.1303
E21	$108 \pm 7.77$	4.98	0.3977	0.08840
E25	$67 \pm 19$	18.27	0.4504	0.1295
E27	$183 \pm 46$	1	0.4437	0.1309
E28	$198 \pm 49.5$	0.006	0.3482	0.1825

Con base en los resultados de los valores de  $\alpha$ , se corroboró el modo de inhibición de los compuestos, cuya caracterización fue, como inhibidores competitivos a los compuestos: E14, E16, E18, E21 y E25. El compuesto E27 como inhibidor no competitivo y el compuesto E28 como inhibidor acompetitivo. De esta manera, determinar el valor de  $\alpha$  fue muy importante ya que nos permitió conocer el modo de inhibición de cada compuesto de forma correcta.

#### **4.4. Determinación de la capacidad de los compuestos para unirse con la enzima mediante un acoplamiento molecular de los compuestos sobre la estructura de la AChE-donepezilo.**

El estudio de acoplamiento molecular se llevó a cabo para conocer el lugar de la enzima en el que los compuestos son afines. En primer lugar, se realizó el análisis con cada compuesto derivado de oxazolonas frente a la estructura tridimensional de la enzima AChE humana completa, obteniendo las energías de unión en Kcal/mol, expresados como valores negativos para cada compuesto. Entendiendo que la energía de unión es una medida que indica afinidad entre el inhibidor y la enzima, y en donde los valores negativos reflejan una mayor estabilidad del complejo enzima- inhibidor. O bien, dicho de otra manera, la energía de unión es la diferencia entre la energía del complejo y la suma de las energías de cada molécula por separado, por lo que, entre más negativo sea el valor obtenido, la unión entre la enzima y el inhibidor será más favorable, ya que se requiere menor energía para que se dé dicha unión.

En segundo lugar, se realizó un análisis de acoplamiento con cada uno de los compuestos, pero ahora estudiando el sitio activo de la AChE, sabiendo que es en este sitio de la enzima, en donde los ligandos ejercen inhibición y en donde se determinaron de igual manera las energías de unión en Kcal/mol. El resultado que se obtuvo en ambos análisis, se presentan en la tabla 4.4 y en donde podemos apreciar que no se encuentran diferencias significativas entre los valores energéticos de afinidad determinados para cada compuesto con la enzima, en cada experimento, a excepción del compuesto E16, en el cual se puede apreciar una diferencia de - 0.8 Kcal/mol entre un experimento y otro. Los resultados fueron

validados mediante el análisis de acoplamiento sobre la estructura del donepezilo co-cristalizado obteniendo el valor de su RMSD (Root Mean Square Deviation o desviación de la media cuadrática), la cual nos permite establecer equivalencia o diferencia entre dos o más estructuras, dependiendo de la forma y conformación tridimensional. En donde valores grandes de RMSD indican que hay mayores diferencias entre las estructuras y contrariamente, valores pequeños cercanos a cero indican que las estructuras son muy parecidas.

**Tabla 4.4.** Energías de unión de los compuestos con la enzima.

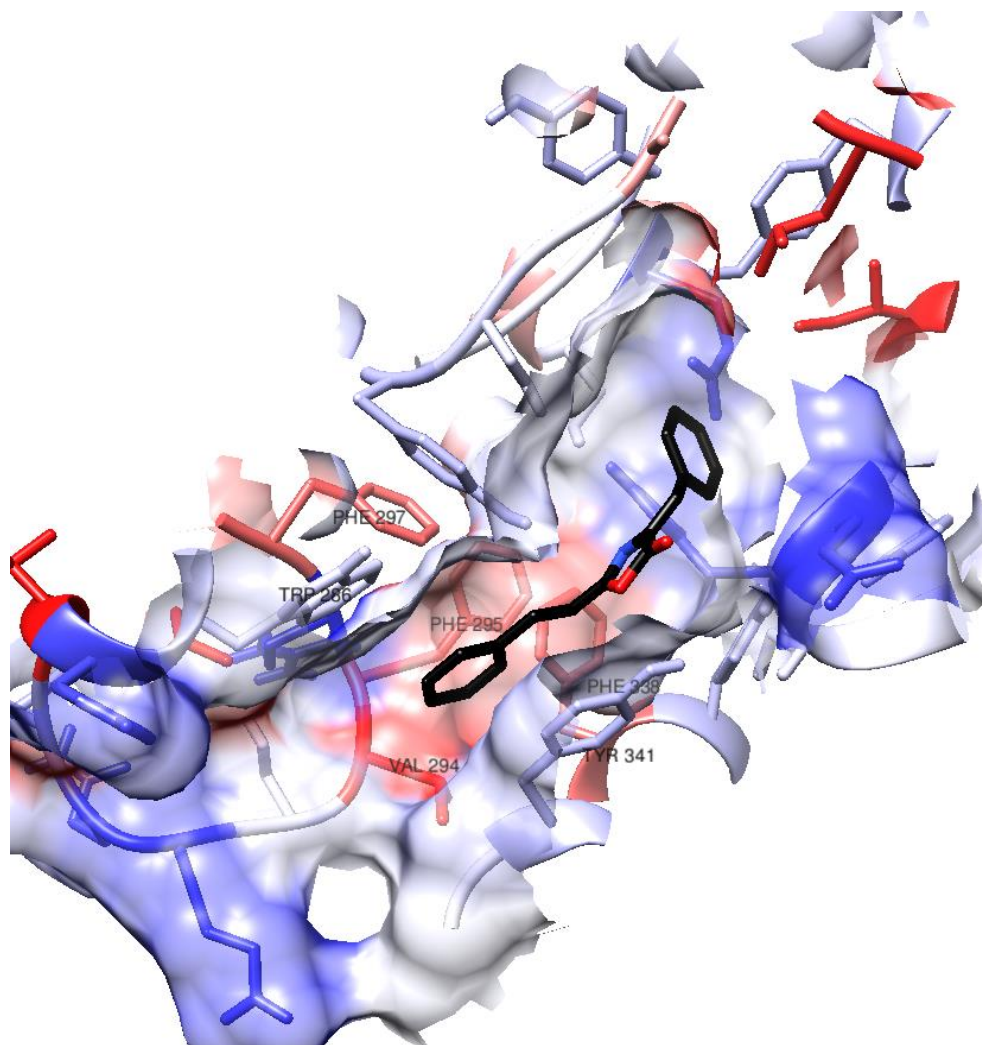
<b>Energía de unión (Kcal/mol)</b>		
<b>Compuesto</b>	<b>Enzima Completa</b>	<b>Sitio Activo</b>
E14	-11.3	-11.3
E16	-10.5	-11.3
E18	-11.4	-11.4
E21	-11.5	-11.5
E25	-10.3	-10.8
E27	-10.9	-11.0
E28	-10.8	-11.2
Donepezilo	-12.1	-12.3
RMSD Donepezilo	1.094	0.467

Como se puede apreciar en la tabla 4.4, las energías de unión obtenidas en el análisis de acoplamiento molecular para cada compuesto y en cada experimento (acoplamiento con la enzima completa y acoplamiento en el sitio activo) son muy similares, por lo que se deduce, que los compuestos analizados se unen de manera favorable con la enzima en el mismo sitio, en este caso, se unen al sitio activo de la enzima AChE humana.

Tomando como referencia un valor de energía de unión mayor -10 Kcal/mol como un valor aceptable para este estudio, son los compuestos E21 con -11.5

Kcal/mol, E18 con -11.4 Kcal/mol y E14 y E16 con -11.3 Kcal/mol, los que se unen mejor a la enzima. Se realizó un análisis de acoplamiento molecular control con donepezilo para validar los resultados, obteniendo una energía de unión de -12.1 y -12.3 Kcal/mol en cada experimento. Por otra parte, la validación del análisis de acoplamiento se llevó a cabo al determinar la RMSD del donepezilo co-cristalizado en cada experimento y en donde podemos apreciar que la diferencia entre el acoplamiento utilizando toda la enzima (1.094) y el acoplamiento en el sitio activo de la AChE (0.467) es mínima, indicando que el procedimiento realizado y los resultados son correctos.

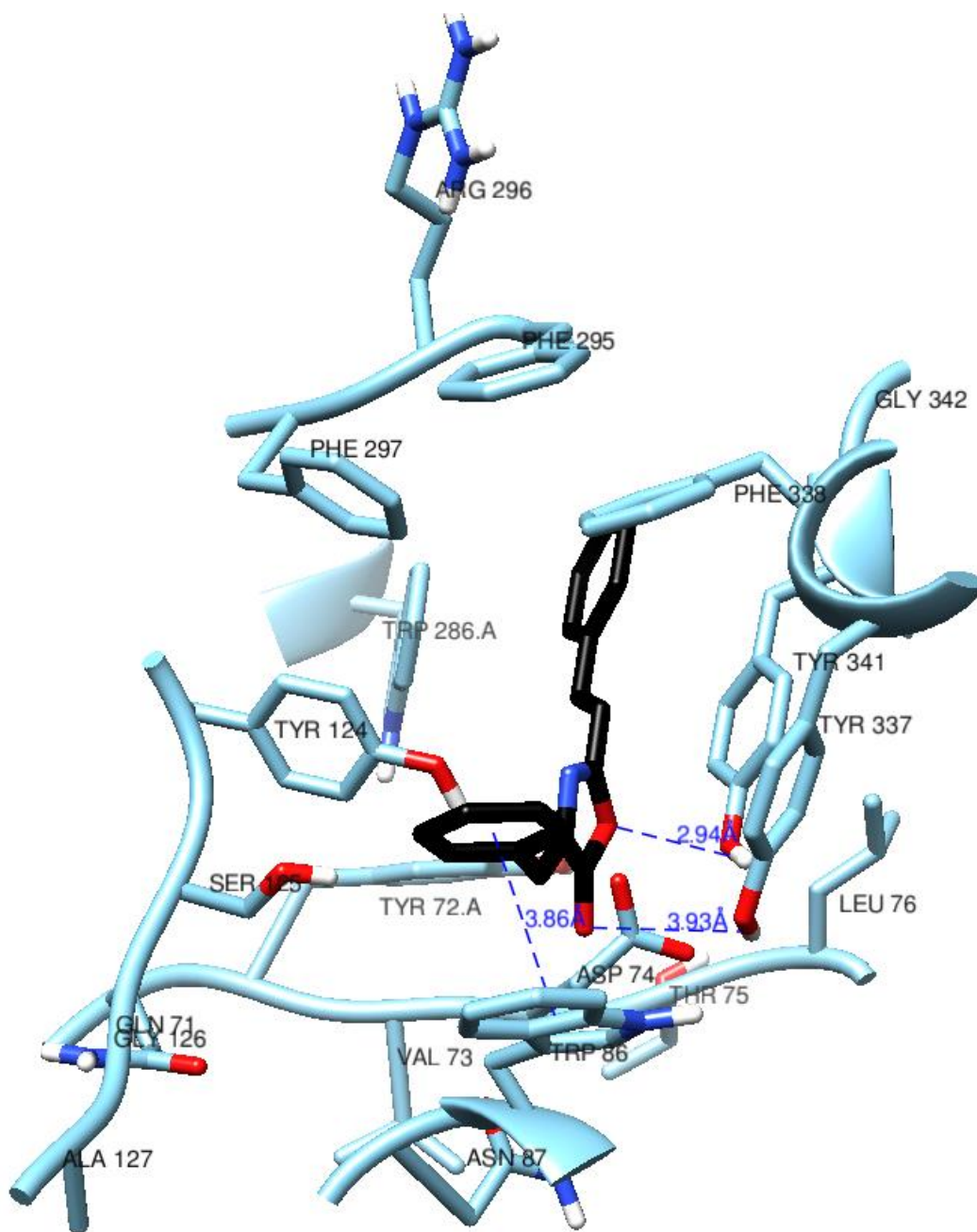
Con base en lo explicado y a los resultados *in vitro*, en donde la oxazolona E16 fue el compuesto que mostro tener mejores resultados, se procedió a buscar las interacciones existentes entre el compuesto E16 con los diferentes residuos de aminoácidos que revisten el sitio activo de la enzima. En la figura 4.7 se muestran algunos aminoácidos presentes en la cavidad aromática del sitio activo de la AChE interactuando con el compuesto E16.



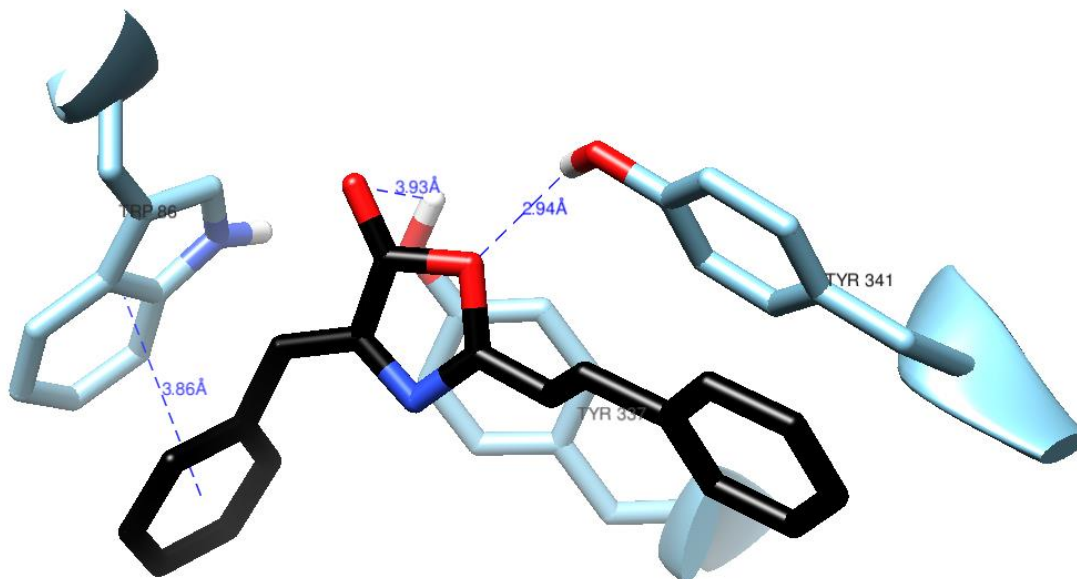
**Figura 4.7.** Superficie de la cavidad del sitio activo de la AChE. El color de los aminoácidos y su superficie va de acuerdo a su hidrofobicidad (azul = hidrofílico, blanco = neutro, rojo = hidrofóbico).

Como se puede apreciar la superficie del sitio activo de la enzima está representada por colores de acuerdo a su hidrofobicidad, en donde el área hidrofílica se observa de color azul, y área hidrofóbica de color rojo y la superficie neutra y de color blanco. Apreciando que el anillo aromático más distal de E16 se acomodó en una zona relativamente hidrofóbica, cerca de Tyr341, Phe295, Phe297, Phe338, Trp286, Val294. Con la conformación de la figura anterior se analizaron las

interacciones que presenta la oxazolona E16 con la enzima, como lo muestra la figura 4.8 y 4.9.



**Figura 4.8.** Interacciones que presenta el compuesto E16 con los diferentes aminoácidos que forman la superficie de la cavidad del sitio activo de la AChE.



**Figura 4.9.** Ángulos y distancias entre el compuesto E16 y los diferentes aminoácidos con los que presenta interacciones.

En la figura 4.8 observamos que hay una interacción importante al determinar un apilamiento  $\pi$ - $\pi$  entre uno de los anillos aromáticos de E16 y Trp86. Este residuo es importante en la interacción con varios ligandos, ya que por ejemplo es el encargado de interactuar con los grupos cuaternarios de acetilcolina y otros compuestos inhibidores. Por otra parte, Chimera no detecto enlaces de puente de hidrógeno en esta pose para E16, sin embargo, el carbonilo del compuesto se encuentra relativamente cerca del hidroxilo de Tyr337, si bien por el ángulo y quizá la distancia (3.93 Å) es que no se da formalmente esta interacción. El oxígeno de la lactona se encuentra a 2.94 Å del hidroxilo de Tyr341, la cual es una distancia adecuada para un enlace de puente de hidrógeno, de nuevo quizá por el ángulo es que el programa no lo detecta como interacción, como podemos ver en la figura 4.9.

## **CAPÍTULO V. DISCUSIÓN**

El estudio de la actividad inhibitoria de ocho novedosos compuestos derivados de oxazolonas y tres intermedios sintéticos sobre la actividad de la AChE humana mostro que la inhibición AChE producida por estos compuestos fue de tipo reversible y siete de ellos inhiben a la enzima en más del 50% a una concentración de inhibición de 300  $\mu\text{M}$ , en cuanto a la caracterización de los compuestos, cinco se caracterizaron como inhibidores competitivos, uno como inhibidor no competitivo y uno como inhibidor acompetitivo. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Cavas et al. (2017), en donde reportan que tres compuestos derivados de oxazolonas portadores de carbazol inhibieron a la AChE en condiciones *in vitro*, y en los cuales también obtuvieron resultados de inhibición predictivos al utilizar un modelo de red neuronal artificial. Con base en sus resultados recomiendan el uso potencial de los compuestos derivados de oxazolonas como inhibidores reversibles de la AChE para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA. Por otra parte, Zhang et al. (2014) sintetizaron y evaluaron un grupo de compuestos amino-2(5)-oxazolonas N sustituidas y determinaron que esta clase de compuestos producen un efecto insecticida al actuar como agonistas de los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChRs).

De los compuestos derivados de oxazolonas evaluados en este estudio destaca la oxazolona E16, como el compuesto que inhibe con mayor potencia a la enzima AChE, con base en el valor de su  $\text{CI}_{50}$ . También es el compuesto que mostro tener mayor afinidad para unirse a la enzima al obtener un valor de  $\text{K}_i$  menor. Por otra parte, el análisis de acoplamiento molecular, mostro que todos las oxazolonas

ensayadas se unen de manera favorable al sitio activo de la enzima, esto de acuerdo a las energías de afinidad obtenidas. En cuanto al análisis de acoplamiento molecular realizado a la oxazolona E16, mostro que este compuesto se acomoda en el sitio activo, en donde el anillo aromático más distal del compuesto se posiciona cerca de los aminoácidos que integran el PAS. Por otra parte Chimera encontró una interacción de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  entre uno de los anillos aromáticos de E16 y el Trp86 del subsitio aniónico de unión a colina. El Trp86 es un residuo de aminoácido muy importante en la interacción de varios ligando, por ejemplo es este residuo el encargado de interactuar con el grupo cuaternario de la ACh y de otros compuestos (Ferreira Neto et al., 2017; Kryger, Silman, & Sussman, 1999). Investigaciones recientes en las que se ha estudiado la estructura cristalográfica de la enzima AChE humana, coinciden que el sitio activo de la enzima está revestido por residuos de aminoácidos aromáticos que forman los dos sitios de unión a ligandos. El PAS, es un sitio alostérico de la enzima (Johnson & Moore, 2006), y se sitúa a la entrada del desfiladero, se cree que guía a los esteres de colina hacia el sitio catalítico (Radić, Reiner, & Taylor, 1991), y está conformado por los residuos de aminoácidos Tyr72, Tyr124, Tyr341, Trp286 y Asp74. El CAS, situado al fondo del desfiladero y está formado por la triada catalítica (también conocida como subsitio esterásico) involucrada en la hidrolisis de ACh, formada por los residuos de aminoácidos de Ser203, His447 y Glu334. El subsitio aniónico en el cual el grupo cuaternario de la colina interacciona y consiste en Trp86. El área adyacente a la triada catalítica se encuentra el agujero oxianión o bolsillo de unión oxianiónico, formado por residuos de Gly121, Gly122 y Ala204 que interactúan con el oxígeno del carbonilo de la ACh y estabiliza los estados de transición de acilación de desacilación. El bolsillo de

unión a acilo (Phe295, Phe297 y Trp236) estabiliza al grupo acetil de la ACh (Bennion et al., 2015; Saini & Saxena, 2018). Otro mecanismo de la enzima que se ha estudiado y se reporta en diferentes bibliografías es sobre la alta velocidad de hidrolisis que posee la enzima. Donde investigaciones que involucran estudios computacionales y cristalografía de rayos X proponen la existencia de tres regiones de la enzima implicadas en la eliminación de los productos de hidrolisis de la ACh, conocidos como “puerta trasera” que incluye al Trp86, Gly448 y Tyr449, “puerta lateral” formada por Asp74, Asn87, Leu76 y Met85 y la “puerta de bucle de acilo” formado por Trp236, Arg247 y Phe297 (Colletier et al., 2007; Sanson et al., 2011; Xu, Cheng, Sussman, Silman, & Jiang, 2017). Los resultados del acoplamiento molecular del compuesto E16 que se obtuvieron en este estudio, indican que la interacción del anillo aromático del compuesto con el Trp86 de la AChE, podría estar modulando la actividad de la “puerta trasera” de la enzima y con ello inducir la inhibición de su función catalítica. Nuestros resultados proporcionan una nueva propuesta para el diseño racional de inhibidores de la AChE que funcionen como fármacos para el tratamiento de la EA o como insecticidas.

## **CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos durante la evaluación de los ocho compuestos derivados de oxazolonas y de los tres intermediarios sintéticos que se utilizaron en este estudio se concluye, que siete de los ocho compuestos ensayados demostraron inhibir a la AChE por arriba del 50% a una concentración de 300  $\mu$ M e inhiben a la enzima de forma reversible. De los siete compuestos que inhibieron a la enzima en más del 50%, cinco se caracterizaron como inhibidores competitivos, uno como inhibidor no competitivo y uno como inhibidor acompetitivo. De todas las oxazolonas ensayadas sobresale la oxazolona E16, como el compuesto que inhibe con mayor potencia a la enzima AChE con base al valor de su  $CI_{50}$ . También es el compuesto con el que se obtuvo un valor de  $K_i$  menor, indicando tener más afinidad para unirse a la enzima.

El análisis de acoplamiento molecular mostro que todos los compuestos se unen al sitio activo de la enzima de manera favorable, según los resultados obtenidos de las energías de afinidad. El compuesto E16 se acomoda en el sitio activo, en donde el anillo aromático más distal se posiciona cerca de los aminoácidos que integran el sitio periférico aniónico (PAS). Por otra parte, se encontró una interacción  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo aromático de E16 y Trp86 del subsitio aniónico. El programa utilizado no detecto otro tipo de interacciones.

## REFERENCIAS

1. Aaglawe, M. J., Dhule, S. S., Banhekar, S. ., Wakte, P. S., & Shinde, D. B. (2003). Synthesis and Antibacterial Activity of Some Oxazolone Derivatives. *Journal of the Korean Chemical Society*, 47(2), 133–136. <https://doi.org/10.5012/jkcs.2003.47.2.133>
2. Abdel-aty, A. S. (2009). Pesticidal Effects of Some Imidazolidine and Oxazolone Derivatives. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(1), 105–113.
3. Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic, Londres, Inglaterra., 576.
4. Andr, F., & Castillo, C. (2014). Estudio de la Inhibición de la Acetilcolinesterasa y la Relación Estructura - Actividad de Terpenoides Aislados de Organismos Marinos del Caribe Colombiano.
5. Aparna, Y., & Sharada, L. N. (2018). *Antimicrobial & Antifungal Activity Of Substituted 4-Arylidene 2- ( Hydroxy Phenyl ) Oxazol-5 ( 4h ) -Ones*. 346–352.
6. Argade, N. D., Kalrale, B. K., & Gill, C. H. (2008). Microwave Assisted Improved Method for the Synthesis of Pyrazole Containing 2,4,-Disubstituted Oxazole-5-one and their Antimicrobial Activity. *E-Journal of Chemistry*, 5, 265131. <https://doi.org/10.1155/2008/265131>
7. Ashmawy, N. H., Almehizia, A. A., Youssef, T. A., Amr, A. E. G. E., Al-Omar, M. A., & Kamel, A. H. (2019). Novel Carbon/PEDOT/PSS-based Screen-Printed Biosensors for Ncetylcholine neurotransmitter and Acetylcholinesterase Detection in Human Serum. *Molecules*, 24(8), 1–15.

<https://doi.org/10.3390/molecules24081539>

8. Bala, S., Saini, M., Kamboj, S., & Saini, V. (2012). Synthesis of 2- [ 4- ( substituted benzylidene ) -5-Oxo- Derivatives as Novel Potential Antimicrobial Agents. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 11(2), 45–52.
9. Bautista, F. M., Campelo, J. M., García, A., Luna, D., Marinas, J. M., & Romero, A. A. (2002). Study on Dry-media Microwave Azalactone Synthesis on Different Supported KF Catalysts: Influence of Textural and Acid–base Properties of Supports. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (2), 227–234. <https://doi.org/10.1039/B109413K>
10. Bennion, B. J., Essiz, S. G., Lau, E. Y., Fattbert, J. L., Emigh, A., & Lightstone, F. C. (2015). A wrench in the Works of Human Acetylcholinesterase: Soman Induced Conformational Changes Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *PloS ONE*, 10(4), e0121092.
11. Bernardino, H. H. U., Torres, A. H., Sanchez, C. G., & Reyes, V. L. (2019). Uso de Plaguicidas en el Cultivo de Maíz en Zonas Rurales del Estado de Oaxaca, Mexico. *Rev. Salud Ambient*, 19(1), 23–31.
12. Brunton, L. L. (2018). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Goodman and Gilman*. (13th ed.). México: McGraw Hill.
13. Cavalcante, S. F. d. A., Simas, A. B. C., Barcellos, M. C., de Oliveira, V. G. M., Sousa, R. B., Cabral, P. A. d. M., ... França, T. C. C. (2020). Acetylcholinesterase: The “Hub” for Neurodegenerative Diseases and Chemical Weapons Convention. *Biomolecules*, 10(3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/biom10030414>
14. Cavas, L., Topcam, G., Gundogdu-Hizliates, C., & Ergun, Y. (2017). Neural

- Network Modeling of AChE Inhibition by New Carbazole-Bearing Oxazolones. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 11(1), 95–107. <https://doi.org/10.1007/s12539-017-0245-4>
15. Cavelier, F., & Verducci, J. (1995). New Synthesis of the Cyclic Tetrapeptide Tentoxin Employing an Azlactone as Key Intermediate. *Tetrahedron Letters*, 36(25), 4425–4428. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)00762-2](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)00762-2)
16. Chen, J., Cheuk, I. W. Y., Shin, V. Y., & Kwong, A. (2019). Acetylcholine Receptors: Key Players in Cancer Development. *Surgical Oncology*, 31(September), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2019.09.003>
17. Colletier, J. P., Royant, A., Specht, A., Sanson, B., Nachon, F., Masson, P., Weik, M. (2007). Use of a 'Caged' Analogue to Study the Traffic of Choline within Acetylcholinesterase by Kinetic Crystallography. *Acta Crystallographica*, D63, 1115–1128.
18. Conway, P. A., Devine, K., & Paradisi, F. (2009). A Simple and Efficient Method for the Synthesis of Erlenmeyer azlactones. *Tetrahedron*, 65(15), 2935–2938. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.02.011>
19. Cornish-Bowden, A. (2015). One Hundred Years of Michaelis–Menten Kinetics. *Perspectives in Science*, 4, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.12.002>
20. Corradi, J., & Bouzat, C. (2016). Understanding the Bases of Function and Modulation of  $\alpha 7$  Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Molecular Pharmacology*, 90(3), 288–299. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104240>

21. Cota, R. B. R. (2018). *Mejoras cognitivas en un Modelo Animal con 4-((Z)-benzilideno)-2-((E)-stiril)oxazol-5(4H)-ona como un fármaco Anticolinesterasa*. Universidad Autonoma de Baja California.
22. Desai, N. C., Bhavsar, A. M., & Baldaniya, B. B. (2009). Synthesis and Antimicrobial Activity of 5-imidazolinone Derivatives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(1), 90–94. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.51953>
23. Egleton, R. D., Brown, K. C., & Dasgupta, P. (2008). Nicotinic Acetylcholine Receptors in Cancer: Multiple Roles in Proliferation and Inhibition of Apoptosis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(3), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.12.006>
24. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
25. Estrada, Andres, Berrouet, M., & Giraldo, J. A. (2016). Toxicidad por neonicotinoides :Revisión de Tema y Reporte de Dos Casos. *Medicina U.P.B.*, 35(1), 41–46. <https://doi.org/10.18566/medupb.v35n1.a06>
26. Fareed, G., Afza, N., Versiani, M. A., Fareed, N., Mughal, U. R., Kalhor, M. A., Lateef, M. (2013). Synthesis, Spectroscopic Sharacterization and Pharmacological Evaluation of Oxazolone Derivatives. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(8), 1127–1134. <https://doi.org/10.2298/JSC120917126F>
27. Feduchi, C. E., Romero, M. C., Yáñez, C. E., Blasco, C. I., & García-Hoz, J.

- C. (2015). *Bioquímica Conceptos Esenciales* (2 ed.). Panamericana.
28. Fekonja, O., Zorec-Karlovsek, M., El Kharbili, M., Fournier, D., & Stojan, J. (2007). Inhibition and Protection of Cholinesterases by Methanol and Ethanol. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22(4), 407–415. <https://doi.org/10.1080/14756360601143857>
29. Felten, D. L., & Shetty, A. N. (2010). *Atlas de Neurociencias* (segunda ed). Detroit MI: Elsevier Masson SAS.
30. Ferreira Neto, D. C., de Souza Ferreira, M., da Conceição Petronilho, E., Alencar Lima, J., Oliveira Francisco de Azeredo, S., de Oliveira Carneiro Brum, J., Figueroa Villar, J. D. (2017). A New Guanylhydrazone Derivative as a Potential Acetylcholinesterase Inhibitor for Alzheimer's disease: Synthesis, Molecular Docking, Biological Evaluation and Kinetic Studies by Nuclear Magnetic Resonance. *RSC Advances*, 7(54), 33944–33952. <https://doi.org/10.1039/C7RA04180B>
31. Ferrer, A. (2003). Intoxicación por Plaguicidas. *Anales Sis San Navarra*, 26(1), 155–171.
32. Fishel, F. M. (2018). Pesticidas y Colinesterasa 1. *IFAS. Universidad de Florida*, 1242–1245.
33. Flores, S. M., & Segura, T. J. (2005). Estructura y Función de los Receptores Acetilcolina de Tipo Muscarínico y Nicotínico. 6(4), 315–326.
34. Fozooni, S., Tikdari, M., & Hamidian, H. (2008). *A synthesis of Some New 4-arylidene-5 ( 4 H ) -oxazolone azo dyes and an evaluation of their solvatochromic behaviour*. 2008(xiv), 115–123.
35. Fuentes, P. G., & Slachevsky, A. C. (2005). Enfermedad de Alzheimer :

- Actualización en terapia farmacológica. *Revista Médica de Chile*, 133, 224–230.
36. Gökşen, U. S., Gökhan, K. N., Göktaş, O., Köysal, Y., Kiliç, E., Işık, S., ... Ozalp. (2007). 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(17), 5738–5751. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.06.006>
37. Gotti, C., Zoli, M., & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(9), 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.07.004>
38. Grob, D., & Harvey, A. M. (1953). The effects and treatment of nerve gas poisoning. *The American Journal of Medicine*, 14(1), 52–63. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0002-9343\(53\)90358-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0002-9343(53)90358-1)
39. Herrera Lorenzo, O., Infante Ferrer, J., & Casares Albornas, F. (2009). Miastenia Gravis: diagnóstico y tratamiento . *Revista Archivo Médico de Camagüey* , Vol. 13, p. 0. scielocu .
40. Holmstedt, B. (1959). Pharmacology of Organophosphorus Cholinesterase Inhibitors. *Pharmacological Reviews*, 11(3), 567 LP – 688. Retrieved from <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/11/3/567.abstract>
41. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (2021). Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Retrieved from <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>

42. Ismail, M. I. (1991). Physical characteristics and polarographic reduction mechanism of some oxazolones. *Canadian Journal of Chemistry*, 69(12), 1886–1892. <https://doi.org/10.1139/v91-273>
43. Jat, L., Mishra, R., & Pathak, D. (2012). Synthesis and anticancer activity of 4-benzylidene-2-phenyloxazol-5(4H)-one derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 378–380.
44. Johnson, G., & Moore, S. W. (2006). The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Current Pharmaceutical Design*, 12(2), 217–225.
45. Kashyap, J., Chetry, A. B., & Das, P. J. (1998). Synthesis of 4-Arylidene-2-Phenyloxazol-5-Ones Using 1:1 Mixture of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> -H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. *Synthetic Communications*, 28(22), 4187–4191. <https://doi.org/10.1080/00397919809458699>
46. Khan, K. M., Mughal, U. R., Khan, M. T. H., Zia-Ullah, Perveen, S., & Iqbal Choudhary, M. (2006). Oxazolones: New tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure–activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(17), 6027–6033. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.05.014>
47. Khodaei, M. M. ., Khosropour, A. R., & Jomor, S. J. . (2003). Efficient and chemoselective conversion of aryl aldehydes to their azalactones catalysed by Bi (III) salts under solvent free conditions. *Chem. Res. Synop*, 10, 638–641.
48. Kryger, G., Silman, I., & Sussman, J. L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Ariceptp): Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 7(3), 297–307.

[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80040-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80040-9)

49. Kushwaha, M., Verma, S., & Chatterjee, S. (2016). Profenofos, an Acetylcholinesterase-Inhibiting Organophosphorus Pesticide: A Short Review of Its Usage, Toxicity, and Biodegradation. *Journal of Environmental Quality*, 45(January), 1478–1489. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.03.0100>
50. Lamb, B. Y. J., & Robson, W. (1931). The Erlenmeyer Synthesis of amino-Acids. *The Biochemical Journal*, 25(4), 1231–1236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/bj0251231>
51. Le Mauff, A., Chouikh, H., Cartereau, A., Charvet, C. L., Neveu, C., Rispe, C., ... Thany, S. H. (2020). Nicotinic acetylcholine receptors in the synganglion of the tick *Ixodes ricinus*: Functional characterization using membrane microtransplantation. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 144–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.10.005>
52. López-Durán, R. M., Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., Pérez-Aguilar, B., Salinas-Arreortua, N., Serrano, H., ... Gómez-Olivares, J. L. (2018). La estructura y función de las colinesterasas: Blanco de los plaguicidas. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 34, 69–80. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.ESP02.06>
53. López, L. Ó. (2015). Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Archivos de Medicina Interna*, Vol. 37, pp. 61–67. scielouy.
54. M.A. Pasha, M. A., Jayashankara, V. P., Venugopala, K. N., & Rao, G. K. (2007). Zinc oxide (ZnO): An Efficient Catalyst for the Synthesis of 4-

- arylmethylidene-2-phenyl 5(4H)-oxazolones Having Antimicrobial Activity. *Pharmacology and Toxicology*, 2(3), 264–270. <https://doi.org/10.3923/jpt.2007.264.270>
55. Madje, B. R., Ubale, M. B., Bharad, J. V., & Shingare, M. S. (2010). Alum an Efficient Catalyst for Erlenmeyer Synthesis. *South African Journal of Chemistry*, 63, 158–161.
56. Maraković, N., Knežević, A., Vinković, V., Kovarik, Z., & Šinko, G. (2016). Design and synthesis of N-substituted-2-hydroxyiminoacetamides and interactions with cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*, 259, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.035>
57. Mariappan, G., Saha, B. P., Datta, S., Kumar, D., & Haldar, P. K. (2011). Design , synthesis and antidiabetic evaluation of oxazolone derivatives. *Journal Chem. Sci.*, 123(3), 335–341.
58. Marrero, S., Gonzalez, S., Guevara, H., & Eblen, A. (2017). Evaluación de la exposición a organofosforados y carbamatos en trabajadores de una comunidad agraria . *Comunidad y Salud. (Online)*, 17(1), 30–41.
59. Mckee, T., & Mckee, J. R. (2009). *Bioquímica, las bases moleculares de la vida*. (4 ed.). McGraw Hill.
60. Mesaik, M. A., Rahat, S., Khan, K. M., Zia-Ullah, Choudhary, M. I., Murad, S., ... Ahmad, A. (2004). Synthesis and immunomodulatory properties of selected oxazolone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(9), 2049–2057. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.02.034>
61. Miller, C. N., & Kamens, H. M. (2020). The role of nicotinic acetylcholine receptors in alcohol-related behaviors. *Brain Research Bulletin*, 163, 135–

142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.07.017>
62. Moghanian, H., Shabani, M., & Jafari, H. (2012). Microwave-assisted efficient synthesis of azlactone derivatives using TsCl/DMF under solvent-free conditions. *Comptes Rendus Chimie*, 15(4), 346–349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crci.2011.11.011>
63. Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., & Weil, P. A. (2013). *Harper, Bioquímica Ilustrada*. (29 ed.). McGraw Hill.
64. Naganagowda, G., & Petsom, A. (2017). *RETRACTION: Synthesis and Antimicrobial Activity of Oxazolone , Imidazolone and Triazine Derivatives Containing Benzothiophene Synthesis and Antimicrobial Activity of Oxazolone , Imidazolone and Triazine Derivatives Containing Benzothiophene*. (October 2011). <https://doi.org/10.5012/jkcs.2011.55.5.794>
65. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2015). *Lehninger. Principios de Bioquímica* (6th ed.). España: Editorial Omega.
66. Noviello, C. M., Gharpure, A., Mukhtasimova, N., Cabuco, R., Baxter, L., Borek, D., ... Hibbs, R. E. (2021). Structure and gating mechanism of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Cell*, 184(8), 2021-2034.e13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.049>
67. OMS. (2018). Residuos de Plaguicidas en los Alimentos. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>
68. Perron-Sierra, F. M., Pierré, A., Burbridge, M., & Guilbaud, N. (2002). Novel bicyclic oxazolone derivatives as anti-Angiogenic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12(11), 1463–1466.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00197-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00197-X)

69. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D. M., & Meng, E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, *25*, 1605–1612.
70. Pinto, I. L., West, A., Debouck, C. M., DiLella, A. G., Gorniak, J. G., O'Donnell, K. C., ... Jarvest, R. L. (1996). Novel, selective mechanism-based inhibitors of the herpes proteases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *6*(20), 2467–2472. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-894X\(96\)00456-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-894X(96)00456-8)
71. Pohanka, M. (2012). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(2), 2219–2238. <https://doi.org/10.3390/ijms13022219>
72. Pohanka, M., Hrabínová, M., Kuca, K., & Simonato, J. (2011). *Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method*. 2631–2640. <https://doi.org/10.3390/ijms12042631>
73. Pouramiri, B., Moghimi, S., Mahdavi, M., Nadri, H., Moradi, A., Tavakolinejad-Kermani, E., ... Foroumadi, A. (2017). Synthesis and anticholinesterase activity of new substituted benzo[d]oxazole-based derivatives. *Chemical Biology and Drug Design*, *89*(5), 783–789. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12902>
74. Print, I., Online, I., Dobhal, Y., Rawat, R., Parcha, V., Sharma, R., & Chaudhary, R. (2014). *World Journal of Pharmaceutical Sciences Design , synthesis and evaluation of phenyl oxazolone derivatives as cardioprotective drugs*.

75. Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87(5), 955–979. <https://doi.org/10.1021/cr00081a005>
76. Quintero Lizaola, R., Ferrera-Cerrato, R., Etchevers Barra, J. D., Eugenia García Calderón, N., Rodríguez Kabana, R., Alcántar González, G., & Aguilar Santelises, A. (2003). Enzymes Participating in the Vermicomposting Process. *Redalyc*, 21, 73–80. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/573/57321109.pdf>
77. Radić, Z., Reiner, E., & Taylor, P. (1991). Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Molecular Pharmacology*, 39(1), 98–104.
78. Rao, P. S. ., & Venkataraman, R. V. (1994). Anhydrous zinc chloride catalysed synthesis of 2-phenyl-4-arylidene-5 (4H)-oxazolones. *Indian J. Chem*, 33B, 985–985.
79. Rodriguez, A. M., Zunino, M. P., & Dambolena, J. S. (2018). Optimización de ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa en *Sitophilus zeamais* (Mots.). *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Física y Naturales.*, 5(1).
80. Rodríguez, Y., Iiyina, A., Silva, B. Y., Vargas, S. A. I., Martínez, H. J. L., & Segura, C. E. P. (2017). Uso de plantas mexicanas con efecto inhibitorio sobre la enzima Acetilcolinesterasa como un posible tratamiento para la enfermedad de Alzheimer. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(4), 7–16.
81. Rosenberry, T. L., Id, X. B., Macdonald, I. R., Wandhammer, M., Trovasletleroy, M., Darvesh, S., & Nachon, F. (2017). *Human Butyrylcholinesterase*

- and Acetylcholinesterase* : 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules22122098>
82. Sadeq, H. S. A., Chandrappa, G. T., & Mohamed, A. P. (2013). Sonochemical Hot-spot Assisted One-pot Synthesis of 4-arylmethylidene - 2-phenyl-4H-oxazol-5-ones Using Nano-MgO as an Efficient Catalyst. *Letters in Organic Chemistry*, 10(4), 283–290.
83. Saini, R., & Saxena, A. K. (2018). The Structural Hybrids of Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease: A Review. *Alzheimer's & Neurodegenerative Diseases*, 4(1), 1–25. <https://doi.org/10.24966/and-9608/100015>
84. Sanabria, castro A., Alvarado, E. I., & Monge, B. C. (2017). *Revisión Neurotransmisión Colinérgica Central: Aspectos Resumen Introducción*. 18(2), 76–87.
85. Sanner, M. F. (1999). Python: A programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17, 57–61.
86. Sanson, B., Colletier, J. P., Xu, Y., Lang, P. T., Jiang, H., Silman, I., ... Weik, M. (2011). Backdoor opening mechanism in acetylcholinesterase based on X-ray crystallography and molecular dynamics simulations. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 20(7), 1114–1118.
87. Schaaf, A. A. (2013). *Uso de pesticidas y toxicidad : relevamiento en la zona agrícola de San Vicente , Santa Fe , Argentina \* Pesticides use and toxicity : survey in the agricultural zone of San Vicente , Santa Fe , Argentina Resumen Introducción*. 4, 323–331.
88. Scheffel, C., Thiermann, H., & Worek, F. (2015). Effect of reversible ligands

- on oxime-induced reactivation of sarin- and cyclosarin-inhibited human acetylcholinesterase. *Toxicology Letters*, 232(3), 557–565.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.12.009>
89. Serrano-Medina, A., Ugalde-Lizárraga, A., Bojorquez-Cuevas, M. S., Garnica-Ruiz, J., González-Corral, M. A., García-Ledezma, A., ... Cornejo-Bravo, J. M. (2019). Neuropsychiatric disorders in farmers associated with organophosphorus pesticide exposure in a rural village of Northwest México. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(5).  
<https://doi.org/10.3390/ijerph16050689>
90. Sharada, L. N., Aparna, Y., Saba, M., Sunitha, S. N. T., & Viveka, L. (2014). A Review on Reactions and Applications of Oxazolones. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5(6), 2250–3153. Retrieved from [www.ijsrp.org](http://www.ijsrp.org)
91. Siddaiah, V., Basha, G. M., Sudhakar, D., Srinuvasarao, R., & Kumar, Y. S. (2013). Practical Synthesis of 4-Benzylidene-2-phenyl-5(4H)-oxazolones. *Synthetic Communications*, 43(16), 2191–2197.  
<https://doi.org/10.1080/00397911.2012.696301>
92. Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 294–302.  
<https://doi.org/10.1038/35067589>
93. Stryer, L., Berg, M. J., & Tymoczko, J. L. (2015). *Bioquímica con aplicaciones clínicas vol. I*.
94. Taile, V., Hatzade, K., Gaidhane, P., & Ingle, V. (2009). Synthesis and Biological Activity of 4-(4-Hydroxybenzylidene)-2-(substituted styryl) oxazol-

- 5-ones and Their o-glucosides. *Turkish Journal of Chemistry*, 33, 295–305.  
<https://doi.org/10.3906/kim-0712-12>
95. Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., & Changeux, J.-P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(9), 733–750.  
<https://doi.org/10.1038/nrd2927>
96. Tandon, M., Coffen, D. L., Gallant, P., Keith, D., & Ashwell, M. A. (2004). Potent and selective inhibitors of bacterial methionyl tRNA synthetase derived from an oxazolone-dipeptide scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(8), 1909–1911. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.01.094>
97. Taylor, P., Radic, Z., Hosea, N. A., Camp, S., Marchot, P., & Berman, H. A. (1995). Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicology Letters*, 82–83, 453–458.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03575-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03575-3)
98. Tikdari, A. M., Fozooni, S., & Hamidian, H. (2008). *Dodecatungstophosphoric Acid (H3PW12O40), Samarium and Ruthenium (III) Chloride Catalyzed Synthesis of Unsaturated 2-Phenyl-5(4H)-oxazolone Derivatives under Solvent-free Conditions.* 3246–3252.  
<https://doi.org/10.3390/molecules13123246>
99. Towns, A. D. (1999). Developments in azo disperse dyes derived from heterocyclic diazo components. *Dyes and Pigments*, 42(1), 3–28.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0143-7208\(99\)00005-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0143-7208(99)00005-4)
100. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and

- multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
101. Voet, D., Voet, J., & Pratt, C. (2016). *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular* (4th ed.). México: Medica Panamericana.
102. Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 25(2), 247–260.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2005.12.005>
103. Wang, Z., Cai, P., Liu, Q., Xu, D., Yang, X., Wu, J., ... Wang, X. (2016). European Journal of Medicinal Chemistry Rational modification of donepezil as multifunctional acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer ' s disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 123, 282–297. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.052>
104. Witvrouw, M., Pannecouque, C., De Clercq, E., Fernández-Alvarez, E., & Marco, J. L. (1999). Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type (HIV-1) Replication by some Diversely Functionalized Spirocyclopropyl Derivatives. *Archiv Der Pharmazie*, 332(5), 163–166.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4184\(19995\)332:5<163::AID-ARDP163>3.0.CO;2-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4184(19995)332:5<163::AID-ARDP163>3.0.CO;2-2)
105. Xu, Y., Cheng, S., Sussman, J. L., Silman, I., & Jiang, H. (2017). Computational Studies on Acetylcholinesterases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(8), 1324.
106. Xue, X., Liu, F., & Ou-Yang, Z. (2006). Single molecule Michaelis-Menten equation beyond quasistatic disorder. *Physical Review E*, 74(3), 30902.

<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.74.030902>

107. Zhang, W., Barry, J. D., Cordova, D., Mccann, S. F., Benner, E. A., & Hughes, K. A. (2014). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Discovery , synthesis , and evaluation of N -substituted amino-2 ( 5 H ) -oxazolones as novel insecticides activating nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(9), 2188–2192.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.037>