



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

**MOLÉCULAS MULTIDIANA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD  
DE ALZHEIMER**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO  
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTOR: NICOLÁS ESTEBAN MARCHANT QUEZADA  
PROFESORA GUÍA: DRA. LIC. BIOL. MARGARITA GUTIÉRREZ CABRERA**

**TALCA - CHILE  
2022**

## CONSTANCIA

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



Talca, 2023



### ***Dedicatoria***

*A mi familia que siempre me apoyó, guio y cuidó en cada decisión que tomé, en especial a mis padres, Mónica y Jorge, por siempre acompañarme en cada camino que seguí; además de siempre estar conmigo en estos años de estudios, en los buenos y malos momentos.*

### ***Agradecimientos***

*Agradezco a mis docentes de la Escuela de Tecnología Médica, en especial a la Dra. Lic.*

*Biol. Margarita Gutiérrez, profesora guía de esta memoria, quién me enseñó y apoyó durante el desarrollo de esta.*

*Agradezco a mi familia, por todos los esfuerzos de estos años, el amor y la paciencia que siempre me han tenido y me ha inspirado a seguir adelante; y a mis amigos, con quienes compartí muchas experiencias a lo largo de estos años, y resultaron fundamentales para llegar hasta acá.*

*Esta memoria ha sido financiada por el proyecto Fondecyt regular 1200531.*

## TABLA DE CONTENIDOS

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>OBJETIVOS</b> .....	12
<b>1. Objetivo general</b> .....	12
<b>2. Objetivos específicos</b> .....	12
<b>METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN</b>	13
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	14
<b>1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER</b> .....	14
<b>1.1. Definición</b> .....	14
<b>1.2. Etiología</b> .....	16
<b>1.3. Hipótesis respecto a la EA</b> .....	18
<b>2. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA ENFERMEDAD</b> .....	22
<b>3. MOLÉCULAS MULTIDIANA</b> .....	26
<b>3.1. Definición</b> .....	26
<b>3.2. Historia</b> .....	26
<b>3.3. Diseño y síntesis</b> .....	27
<b>4. TERAPIAS MULTIDIANA PARA TRATAMIENTO DE LA EA</b> .....	29
<b>4.1. Híbridos de adamantanos</b> .....	30
<b>4.1.1. Híbridos de tacrina-adamantanos</b> .....	30
<b>4.1.2. Híbridos de galantamina-memantina</b> .....	37
<b>4.1.3. Híbridos de aminoadamantano-carbazol / tetrahydrocarbazol</b> .....	39
<b>4.2. Moléculas multidiana para tratamiento de la EA de estudios recientes</b> .....	44
<b>4.2.1. Inhibidor de Acetilcolinesterasa (AChE) y Transportador de Serotonina (SERT)</b> .....	44
<b>4.2.2. Inhibidor de Acetilcolinesterasa (AChE) y Monoamino oxidasas (MAO)</b> .....	46

<b>4.3. Moléculas multidiarias para el tratamiento de la EA de origen natural</b>	50
<b>CONCLUSIONES</b>	57
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	59

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Principales causas de demencia en adultos mayores (>65 años). .....	14
Tabla 1. Síntomas comunes de la enfermedad de Alzheimer según etapa .....	16
Figura 2. Etiología de la enfermedad de Alzheimer .....	17
Figura 3. Varias hipótesis de la Enfermedad de Alzheimer probadas en ensayos clínicos hasta 2019 .....	18
Figura 4. Síntesis y transporte de acetilcolina entre los terminales nerviosos presináptico y postsináptico .....	19
Figura 5. Escisión secuencial de la proteína precursora de amiloide .....	20
Figura 6. Estructuras químicas de fármacos desarrollados para el tratamiento de la EA.....	23
Tabla 2. Comparación de fármacos aprobados para el tratamiento de la EA.....	25
Figura 7. Tipos de moléculas multidiana generados mediante diseño racional .....	28
Figura 8. Estructuras de Tacrina (1), Amantadina (2), 7-MEOTA (3) y 6-Cl-THA (4) .....	31
Figura 9. Estructura química híbrido 7-MEOTA-adamantilamina .....	32
Tabla 3. Actividades biológicas de los híbridos 1 y 2 de 7-MEOTA-amantadina.....	32
Figura 10. Diseño de 6-Cl-THA-memantina (3) y actividades biológicas.....	34
Figura 11. Diseño y síntesis de híbridos 6-clorotacrina-benzohomoadamantano 4 – 6.....	35
Tabla 4. Actividades biológicas híbridos 6-clorotacrina-benzohomoadamantano 4 - 6 .....	36
Figura 12. Estructura del híbrido de galantamina/memantina (7, 8) .....	38
Tabla 5. Actividades biológicas de los híbridos de galantamina-memantina (7, 8).....	39
Figura 13. Diseño de fármacos y actividades biológicas de híbridos de carbazol/tetrahydrocarbazol-aminoadamantano.....	40
Tabla 6. Actividades biológicas de híbridos de carbazol/tetrahydrocarbazol-aminoadamantano (9-11).....	41
Tabla 7. Comparación de actividad entre híbridos de adamantano .....	42

Figura 14. Diseño y optimización del Inhibidor dual de AChE y SERT (34).....	45
Tabla 8. Inhibición de las enzimas MAO-B y AChE por los compuestos 1 y 2 (valores $K_i$ y $IC_{50}$ , ambos expresados como $\mu M$ ).....	47
Figura 15. Estructura química de compuestos 1 y 2.....	48
Figura 16. Inhibición de la MAO B humana por inhibidor de cromonas, de tipo competitivo. ....	49
Tabla 9. Valores $IC_{50}$ de los 13 compuestos estudiados.....	53
Figura 17. Estructuras químicas de los compuestos con actividades inhibitorias significativas (S-5, S-8. S-12 y S-13).....	54
Tabla 10. Hallazgos sobre productos naturales provenientes de algas y plantas. ....	55

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, siendo una de las causas más comunes de demencia en adultos mayores. Esta enfermedad presenta síntomas que se van intensificando a medida que progresa, comenzando con olvido y pérdida del sentido temporal, síntomas poco claros y distinguibles; mientras que para la etapa tardía se desarrolla una imposibilidad para comunicarse y realizar actividades de manera independiente, causando una dependencia total del paciente.

El origen de esta enfermedad no es claro y sus causas aún no se conocen, aunque se ha asociado a múltiples factores que pueden aumentar la probabilidad de padecer esta enfermedad, como factores genéticos y/o ambientales. Sin embargo, se han creado hipótesis para intentar explicar su origen, como la hipótesis colinérgica, asociando la disfunción neuronal con el déficit de neurotransmisores, o la hipótesis beta amiloide, que asocia la enfermedad con la acumulación de desechos tóxicos en el espacio sináptico, como son las placas A $\beta$ , por lo que ciertos tratamientos se han enfocado en las hipótesis propuestas, intentando conseguir una mejoría del paciente.

Para tratar la enfermedad, han salido al mercado diferentes fármacos, los que pueden causar una leve mejoría sintomática del paciente, pero no la detención de la progresión de la enfermedad. Actualmente, el fármaco que presenta un mayor efecto es la memantina, que puede utilizarse entre la etapa intermedia y tardía de la enfermedad, no obstante, este compuesto pierde su efecto en pacientes luego de algunos meses. Por esto, se ha comenzado a investigar otro tipo de compuestos que pueda tratar la enfermedad, actuando sobre diferentes dianas objetivo en el paciente, las moléculas multidiana. Este tipo de compuesto podría resultar ser la clave para el tratamiento de enfermedades multicausales, por lo que se investiga sus efectos en las dianas objetivo más representativas de la enfermedad de Alzheimer.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer, hipótesis, compuesto, multidiana, híbrido.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA por sus siglas) es una enfermedad neurodegenerativa considerada una de las causas más comunes de la demencia en adultos mayores, lo que conlleva un deterioro progresivo del pensamiento, comportamiento y habilidades de la persona, afectando en gran medida su vida independiente. Por lo general el diagnóstico se realiza de manera tardía, pues los signos tempranos son poco claros, como, por ejemplo, el olvido de eventos recientes o conversaciones; mientras que cuando avanza la enfermedad los signos se van haciendo más claros y graves, siendo el más característico el deterioro de la memoria, que va acompañado de una dificultad para recordar o realizar tareas cotidianas.

La enfermedad fue estudiada a inicios del siglo XX por el doctor Alois Alzheimer, en un paciente de sexo femenino de 51 años de edad, quien murió 4 años después del diagnóstico realizado. Durante el siglo XX la enfermedad se diagnosticaba a pacientes menores de 65 años, mientras que para los mayores de esta edad se les consideraba demencia senil, lo que cambió cuando doctores y científicos notaron que las manifestaciones clínicas y patológicas de la enfermedad eran en gran parte similares con la demencia, y comenzaron a diagnosticar a pacientes mayores de 65 años con enfermedad de Alzheimer.

En el mundo, casi 50 millones de personas sufren de la enfermedad, cifra que va en aumento año a año, y se estima que para el 2030 la cifra llegue a los 75 millones, mientras que para el 2050, se cree que podría superar los 130 millones. De estos cálculos surge la importancia de encontrar un tratamiento que permita disminuir la prevalencia de la enfermedad, ya que, no existe uno efectivo para disminuir los efectos de esta.

Actualmente los tratamientos son paliativos, específicamente fármacos capaces de mejorar de manera temporal los síntomas de la enfermedad, ayudando a retardar la progresión de la enfermedad, pero sin detener su avance ni conseguir mejoras considerables en los

pacientes, por lo que con el continuo progreso de la enfermedad, el paciente presentará complicaciones mayores, como la pérdida de la función cerebral, presentando un grave deterioro motriz y problemas asociados a este, como caídas, infecciones, fracturas, entre otros, los que pueden llegar a causar la muerte del paciente.

En diversas investigaciones se ha planteado el uso de moléculas multidiana como tratamiento para el Alzheimer. Las moléculas multidiana son moléculas capaces de interactuar con dos o más dianas u objetivos diferentes de forma simultánea, es decir, moléculas que pueden tener una actividad múltiple. Estos fármacos han sido denominados ligandos multidiana o MTDL por sus siglas en inglés (Multi-Target-Directed Ligands), y han resultado ser foco de gran interés por las posibilidades que presenta para realizar nuevos tratamientos más eficaces y seguros para distintas enfermedades, como en el caso de la EA.

Para realizar estas moléculas se debe seguir un largo y complejo proceso, donde se debe elegir las dianas terapéuticas más apropiadas y seleccionar una molécula base. En el caso del Alzheimer existe un blanco terapéutico que se considera clave para el desarrollo de fármacos, se trata de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), la cual es una enzima de tipo hidrolasa perteneciente a la familia de las enzimas carboxilesterasas, cuya función es hidrolizar la acetilcolina en la hendidura sináptica, terminando con la neurotransmisión colinérgica, además, se encuentra relacionada con la proteína beta amiloide ( $A\beta$ ), que es un producto natural del metabolismo de la proteína precursora del amiloide (PPA), causando un cambio conformacional en la  $A\beta$  que conduce a la agregación de esta y la formación de fibrillas. En estudios recientes se ha encontrado directa relación entre la EA y una elevada concentración de  $A\beta$ . La búsqueda de nuevos tratamientos capaces de controlar de manera efectiva la enfermedad es un desafío mundial que involucra el desarrollo de fármacos capaces de inhibir las colinesterasas de tal forma que se incremente el tiempo en el cual el neurotransmisor acetilcolina permanece en la hendidura sináptica, así como se pueda lograr una disminución en la generación y concentración de péptidos  $A\beta$ .

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

Revisar distintas fuentes de información y revisiones bibliográficas con la finalidad de conocer los mecanismos patológicos de la enfermedad de Alzheimer, y posibles tratamientos para la enfermedad, considerando moléculas multidiarias, su síntesis, mecanismo de acción, y el posible impacto que estas tendrían.

### **2. Objetivos específicos**

1. Describir las hipótesis y mecanismos de la enfermedad de Alzheimer, así como sus posibles causas.
2. Analizar los posibles tratamientos para la enfermedad de Alzheimer.
3. Comprender el concepto de molécula multidiaria y su importancia como posible tratamiento para enfermedades.

## **METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN**

Se realizó una búsqueda de información en sitios web y/o bases de datos científicos, como: PubMed, Web of Science, Scopus, Elsevier, Google Scholar, entre otras. De esta manera se puede asegurar la calidad de la información obtenida y su relación directa con el tema a desarrollar, descartando información de fuentes poco confiables y certeras.

Para realizar la búsqueda de información en estos sitios, se utilizó palabras clave, que permiten filtrar resultados según interés, como en este caso: Alzheimer, Alzheimer disease, Alzheimer treatments, Multitarget, Multitarget molecules, Memantine, Tacrine, etc. Así, se buscó información relacionada al tema en específico, y se descartó de la selección documentos que no cumplieran con los temas establecidos.

Con objetivo de filtrar los resultados se separó según calidad de contenido, utilizando artículos y publicaciones que permitiesen el desarrollo de los objetivos establecidos para la investigación, y, además, se filtró por año de publicación, centrando la búsqueda en publicaciones a partir del año 2010, ya que, el tema a desarrollar es relativamente nuevo en estudios, por lo que publicaciones anteriores fueron descartadas.

La información se recopiló y ordenó en el archivo presente siguiendo la línea de estudio del proyecto de memoria, por lo que se organizó según importancia, siguiendo un orden de general a específico, aumentando la complejidad a medida que se desarrolla el tema; por lo tanto, se comenzó con información general sobre la enfermedad de Alzheimer, para luego desarrollar en específico las terapias posibles para tratar esta enfermedad, poniendo el foco del estudio en estas últimas.

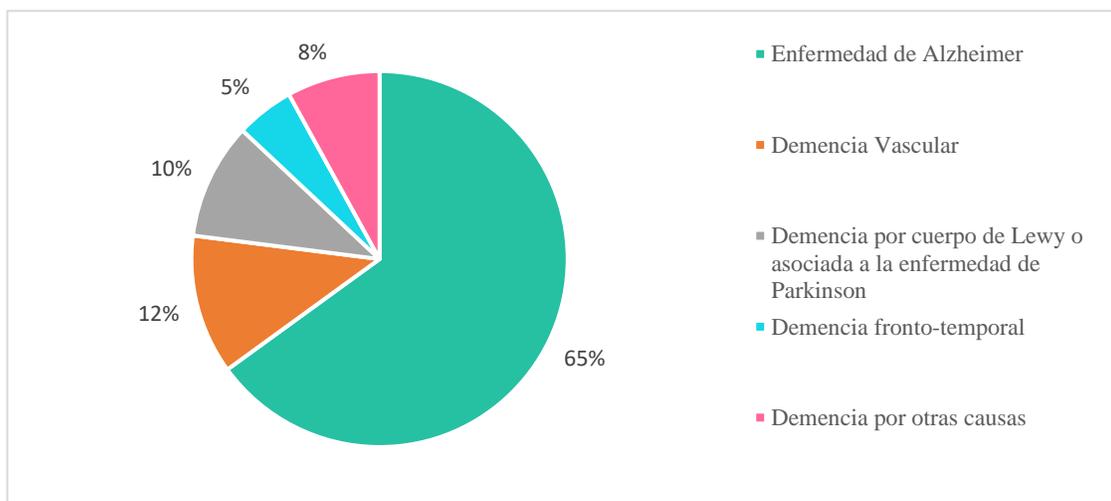
## MARCO TEÓRICO

### 1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

#### 1.1. Definición

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central, siendo la causa más común de demencia, lo que implica que el paciente presenta un deterioro progresivo de su capacidad cognitiva, desorientación, pérdida de memoria, y problemas para comunicarse; esto acompañado de un cambio conductual, ya que, presentan un comportamiento anormal y tendencia a la agresividad (1).

Actualmente la demencia es una de las principales causas de discapacidad y dependencia en adultos mayores, y la EA es la causa de demencia más común en el mundo, causando más del 60% de casos en adultos mayores de 65 años (Figura 1).



**Figura 1. Principales causas de demencia en adultos mayores (>65 años).**

Como se muestra en la figura 1, se realiza comparación en relación con la frecuencia que presenta cada causa de demencia, siendo la EA la principal causa de demencia con un 65%, seguido por la demencia vascular con un 12%, demencia por cuerpo de Lewy o asociada a la enfermedad de Parkinson con un 10%, demencia asociada a otras causas con un 8%, y la demencia fronto-temporal con un 5% (2).

La EA se puede dividir en etapas según su gravedad, teniendo tres etapas, la temprana, intermedia y tardía, y sus síntomas comunes se resumen en la tabla 1.

- ◆ Etapa temprana: es la primera etapa de la enfermedad, donde se pueden presentar síntomas poco distinguibles, como el olvido y la pérdida del sentido temporal y espacial. Por lo general esta etapa pasa desapercibida por el paciente y por su círculo más cercano.
- ◆ Etapa intermedia: en esta etapa los síntomas se vuelven más claros, los pacientes comienzan a olvidar acontecimientos recientes, nombres de objetos cotidianos y de personas, la pérdida espacial se intensifica y causa que la persona se desoriente en su propio hogar. Durante esta etapa, el paciente puede presentar cambios de conducta, teniendo conductas agresivas.
- ◆ Etapa tardía: es la última etapa de la enfermedad, los pacientes se vuelven totalmente dependientes, ya que, no pueden realizar actividades por su cuenta. Entre otros síntomas se encuentra una imposibilidad para comunicarse, y más adelante, para moverse.

**Tabla 1. Síntomas comunes de la enfermedad de Alzheimer según etapa.**

<b>Etapa</b>	<b>Síntomas comunes</b>
<b>Temprana</b>	Olvido Pérdida de sentido temporal y espacial
<b>Intermedia</b>	Olvido de acontecimientos recientes Olvido de nombre de objetos cotidianos Cambios de conducta
<b>Tardía</b>	Pérdida de memoria Dificultad para comunicarse Dificultad para realizar cualquier actividad cotidiana Dependencia casi total de otra persona
<b>Enfermedad de Alzheimer (Transversales a las etapas)</b>	Angustia Ansiedad Depresión

Fuente: Alzheimer Disease International 2020 (2).

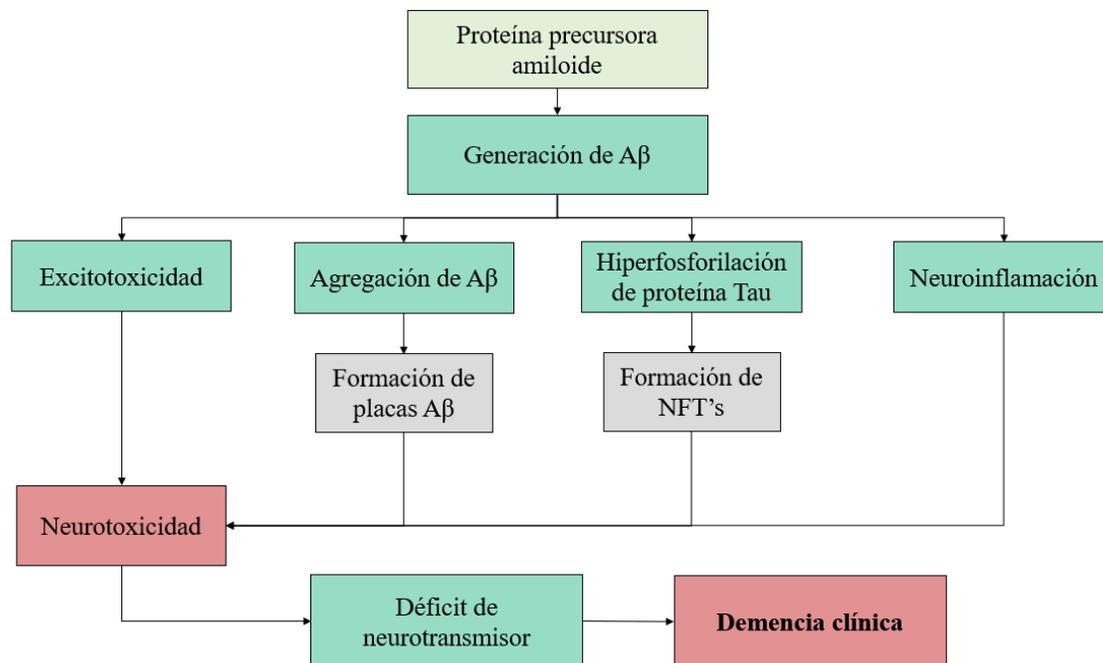
## **1.2. Etiología**

A pesar de ser una enfermedad conocida hace tiempo, su origen se desconoce, por lo que solo se le puede asociar a factores de riesgo, que aumenten la probabilidad de que una persona presente la enfermedad. Entre los factores de riesgo se encuentran lesiones moleculares, como la acumulación de placas A $\beta$  y ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilados (NTFs), estrés oxidativo, y niveles bajos de acetilcolina (3). Además, se puede asociar a factores genéticos y otros ambientales, como la carga genética que codifica

para la enfermedad, donde se han encontrado varios genes involucrados; la edad, ya que, el riesgo de presentar la enfermedad a la edad de 65 años es de un 10%, y ese riesgo se duplica cada 5 años; nivel educativo y escolarización es otro factor de riesgo, pues la ejercitación cognitiva y el aprendizaje producen la estimulación de la comunicación neuronal, y un bajo nivel aumenta el riesgo de presentar la enfermedad (4).

Por esto se considera que la EA es una enfermedad multifactorial, donde la suma de factores ambientales, fisiológicos y genéticos conducen a la aparición de la enfermedad.

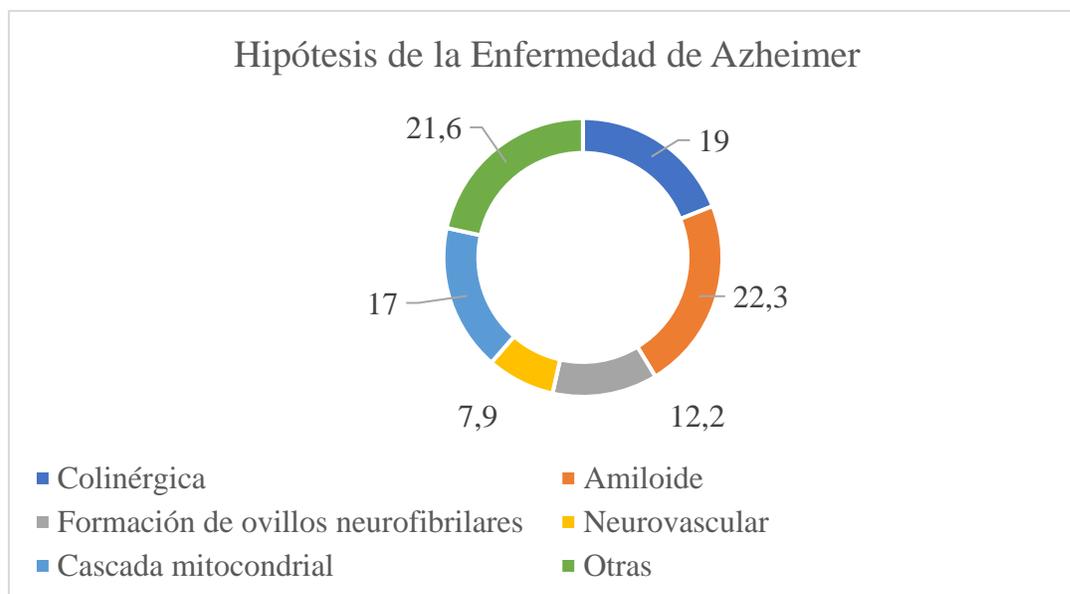
Como se muestra en la figura 2, existen diversos factores involucrados en el desarrollo y prevalencia de la EA. La proteína precursora amiloide (PPA) cuando se sobre estimula genera la producción de beta-amiloide ( $A\beta$ ), que puede seguir cuatro vías, donde cada una de ellas desencadena en un proceso de neurotoxicidad, y una posterior demencia clínica.



**Figura 2. Etiología de la enfermedad de Alzheimer.** Donde:  $A\beta$ : beta-amiloide, NFT: ovillos neurofibrilares. Tomado y adaptado de Briggs, R. et al., 2016 (5).

### 1.3. Hipótesis respecto a la EA

Para comprender el origen de esta enfermedad han surgido diversas hipótesis que intentan dar respuesta a esta pregunta de dicho origen (Figura 3), siendo una de las más importantes la hipótesis colinérgica.



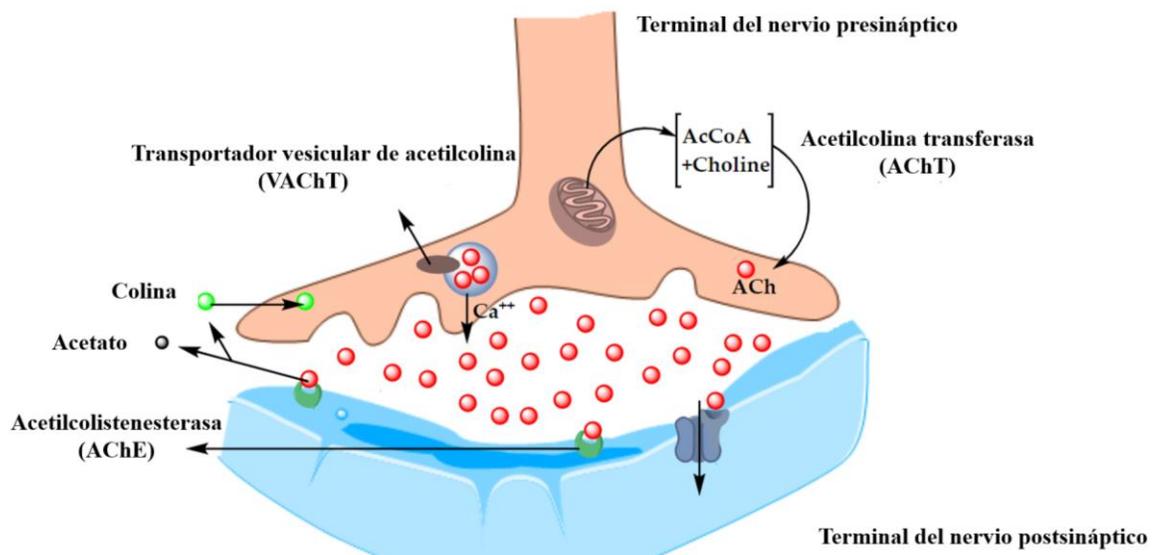
**Figura 3. Varias hipótesis de la Enfermedad de Alzheimer probadas en ensayos clínicos hasta 2019.** Tomado y adaptado de: Liu P-P., 2019 (6).

La hipótesis colinérgica surgió alrededor de la década del 70, donde se descubrió que la degeneración de las neuronas colinérgicas tiene lugar en la EA y causa alteraciones en la función cognitiva y pérdida de memoria (1).

Como origen de esta enfermedad, se ha planteado la pérdida de neuronas funcionales, esto causado por la disfunción neuronal que desencadena apoptosis neuronal y los síntomas mencionados anteriormente, como la pérdida de la memoria. La pérdida neuronal se ve aumentada o intensificada por la acumulación de desechos tóxicos, como las placas  $A\beta$  en el espacio extracelular, y la aparición de ovillos neurofibrilares en el espacio intracelular (5).

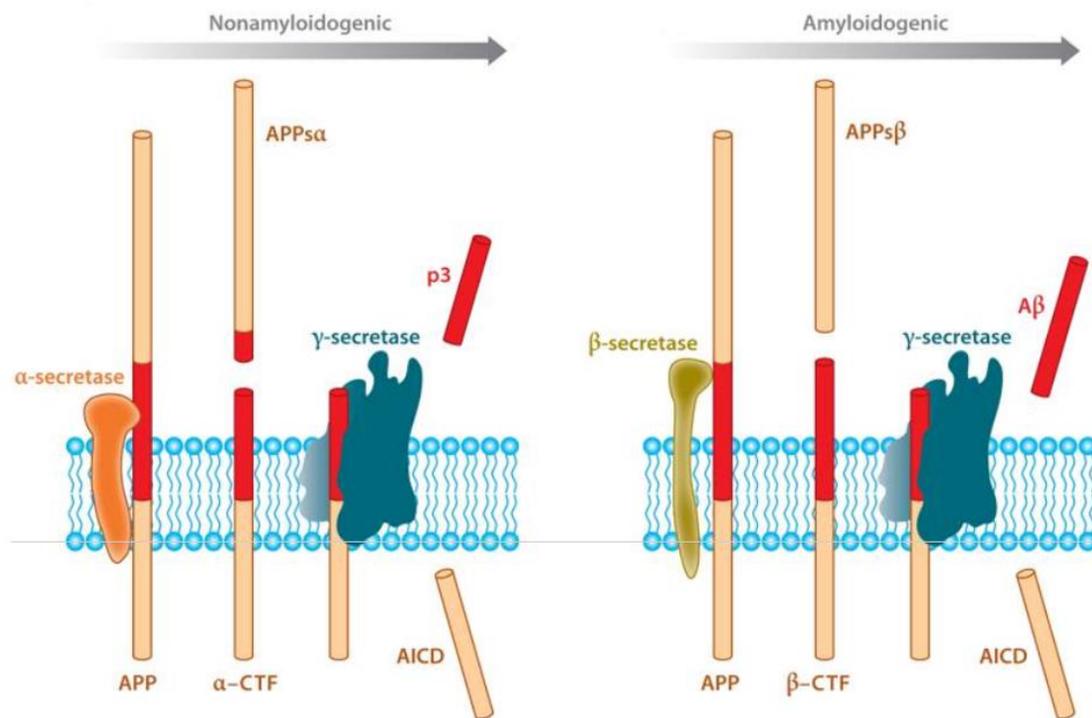
La hipótesis colinérgica plantea que el déficit del neurotransmisor acetilcolina es uno de los factores que alteran la sinapsis neuronal, y con ello se afectan actividades comunes de la persona, como el habla y la capacidad de pensamiento. La producción de acetilcolina (ACh) se desarrolla en el citoplasma de las neuronas colinérgicas a partir de Acetil Coenzima A (Acetil Coa) y colina, mediante la actividad de la enzima Acetilcolina transferasa (AChT) (Figura 4) (1).

Debido a la sobreexpresión de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), se produce una degradación del neurotransmisor ACh, lo que disminuye la expresión de este en el espacio sináptico, y con ello, se ve afectada la sinapsis, y en especial, procesos tales como la memoria, aprendizaje y funciones sensoriales.



**Figura 4. Síntesis y transporte de acetilcolina entre los terminales nerviosos presináptico y postsináptico.** Tomado y adaptado de Breijyeh Z. y Karaman R., (2020) (1).

La hipótesis Beta-amiloide considera como origen de la enfermedad la formación de placas  $A\beta$ , que se genera por la escisión de la proteína precursora de amiloide (PPA) a través de la vía amiloidogénica no canónica, que produce péptidos  $A\beta$  a través del procesamiento secuencial por  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa, proceso que da origen a diferentes péptidos  $A\beta$ , el  $A\beta_{1-40}$  y el  $A\beta_{1-42}$ , siendo este último el que se produce en menor cantidad, y el que tiene la propiedad de formar fibrillas de mayor tamaño, que se transformarán en placas amiloides, y se acumularán en el espacio extracelular (3). En la EA, la catálisis o rompimiento de la PPA se ve alterada, debido a un aumento de las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, por lo que se produce una mayor cantidad de  $A\beta_{1-42}$ , produciendo un aumento en la acumulación de placas  $A\beta$  (Figura 5) (5).



**Figura 5. Escisión secuencial de la proteína precursora de amiloide (APP).** Esta se produce por dos vías, no amiloidogénica y la amiloidogénica. Extraído de: O'Brien RJ, Wong PC., 2011 (7).

Otra hipótesis que habla sobre el origen de la EA es la de hiperfosforilación de la proteína tau ( $\tau$ ). La proteína tau es una proteína encontrada en el citoesqueleto de las neuronas, y se encuentra asociada con los microtúbulos, presentando una función de conexión y comunicación en estas células, por lo que, en condiciones normales, esta proteína es funcional para estas; sin embargo, en la EA se encuentra hiperfosforilada, afectando su funcionamiento normal, conduciendo a fallos en las células ya que la función de los microtúbulos se ve gravemente afectada.

Como la proteína no es funcional, se acumula en el espacio citosólico, causando una polimerización tau-tau que da origen a una proteína tau insoluble y a filamentos rectos de la proteína, originando depósitos intracelulares conocidos como enredos neurofibrilares o NFT (8).

A pesar de tratarse de hipótesis distintas, todas se encuentran relacionadas entre sí, pues todas son capaces de alterar la sinapsis neuronal, y desarrollar con eso síntomas clásicos de la demencia. Además, como la EA es una enfermedad multicausal, la aparición de estructuras como las placas beta-amiloide u ovillos neurofibrilares, aumentan la expresión de síntomas en el paciente, y sumado al déficit de acetilcolina, pueden agravar más la situación de este.

## 2. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA ENFERMEDAD

Considerando que no existe un tratamiento efectivo que detenga la progresión de la EA, los tratamientos actuales son de carácter paliativo, donde se trata de disminuir los efectos adversos de la enfermedad.

Debido a que una de las principales alteraciones de esta enfermedad es la neurotransmisión colinérgica, las terapias actuales se enfocan a aumentar la concentración de acetilcolina, inhibiendo su degradación.

Actualmente en el mercado existen distintas opciones, que se recomiendan según etapa o gravedad de la enfermedad (9). Los fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos en los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) para el tratamiento de la EA se muestran en la figura 6.

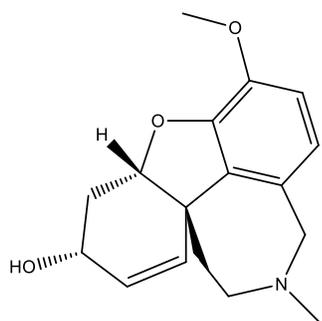
La tacrina (3) fue el primer fármaco aprobado para esta enfermedad, pero actualmente no se utiliza para fines terapéuticos debido a su alta hepatotoxicidad.

Los fármacos actualmente aprobados son:

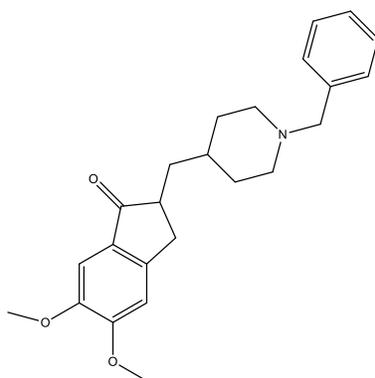
- ❖ Donepezilo: inhibidor de la acetilcolinesterasa y permite una leve mejoría de los síntomas, mejorando la cognición de los pacientes y disminuyendo los cambios conductuales de la etapa temprana de la enfermedad (2).
- ❖ Rivastigmina: inhibidor de acetil y butirilcolinesterasa, que reduce la velocidad de degradación de la acetilcolina liberada por las neuronas funcionales, y causa una leve mejoría en el déficit cognitivo (5).

- ❖ Galantamina (1), es un inhibidor de tipo competitivo de la acetilcolinesterasa, por lo que inhibe en parte la degradación de la acetilcolina y logra una leve mejoría en la actividad colinérgica.

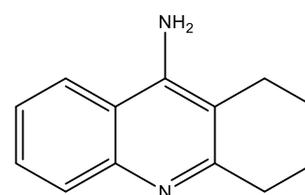
Todos estos fármacos son utilizados en pacientes en etapa leve, ya que, el efecto que tienen sobre estos es muy bajo, y no es suficiente para suplir las faltas o fallas en pacientes con un grado de Alzheimer mayor, esto debido a que su acción se basa en inhibir la enzima acetilcolinesterasa, aumentando la concentración de la acetilcolina en la hendidura sináptica y produciendo una mejoría en los síntomas, pero de manera leve (10).



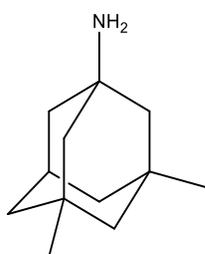
GALANTAMINA



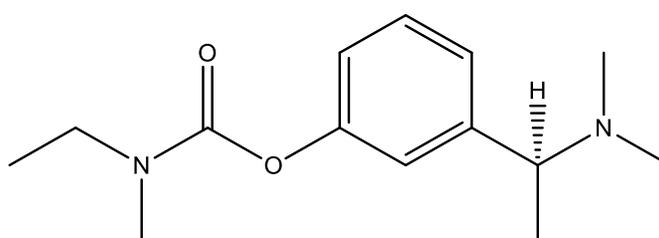
DONEPEZILO



TACRINA



MEMANTINA



RIVASTIGMINA

**Figura 6. Estructuras químicas de fármacos desarrollados para el tratamiento de la EA.**

El fármaco más conocido y utilizado es la memantina (4), ya que, se utiliza en pacientes en etapa intermedia a tardía. Su mecanismo de acción se basa en que esta molécula es un antagonista del receptor *N*-metil-D-Aspartato o NMDA, por lo que es capaz de bloquear su acción y disminuir los efectos tóxicos asociados al exceso de glutamato, la excitotoxicidad mediada por glutamato. Este último efecto nombrado es de gran importancia en la EA, pues la excitotoxicidad conlleva daño y eliminación neuronal, y al producir su bloqueo, se puede inducir mejoras en el proceso de neurotransmisión y cognición (11).

Como terapia sugerida en algunos pacientes, se utiliza la combinación de memantina con donepezilo, ya que, presenta una acción sinérgica y en pacientes demuestra un grado de mejoría mayor que con el uso de una terapia aislada (12).

En la actualidad solo se encuentran disponibles las cuatro terapias mencionadas, que logran una leve mejoría en los pacientes, sin lograr detener el curso ni la progresión de la enfermedad. Al considerar el mecanismo de acción de estos fármacos, se concluye que tres (Donepezilo, Galantamina y Rivastigmina) presentan un mecanismo similar, la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, enzima que degrada la acetilcolina (ACh), lo que permite que, en la hendidura sináptica, la ACh perdure por más tiempo, permitiendo que la actividad sináptica mejore. Sin embargo, solo producen este efecto en pacientes en etapa temprana de la enfermedad, y no sirve para pacientes de etapa severa, por lo que su utilidad es bastante reducida (13).

La cuarta terapia, basada en la utilización de memantina, presenta un efecto en pacientes que se encuentran en etapa intermedia a tardía, reduciendo en parte los síntomas de la enfermedad, sin embargo, su uso no permite una desaceleración de esta, ni una mejoría notable, por lo que las terapias basadas en una molécula no han sido eficientes en el tratamiento de la enfermedad (12).

Adicional a estos tratamientos mencionados, los pacientes con EA presentan síntomas relacionados a la depresión, ansiedad y psicosis, razón por la cual se les debe dar medicamentos para tratar estos síntomas. Generalmente, se les da fármacos antidepresivos, que inhiban la recaptación de serotonina; fármacos neuroprotectores, ansiolíticos y antipsicóticos (14).

Considerando que la EA es una enfermedad multifactorial, según lo expuesto previamente, hoy en día, la búsqueda de terapias para tratar esta enfermedad se basa en encontrar una molécula multidiana que permita modular dos o más dianas para un tratamiento más efectivo de la enfermedad.

Como se observa en la tabla 2, los fármacos actualmente aprobados centran su actividad en las colinesterasa, tanto acetil como butiril, y solamente el fármaco utilizado en la etapa tardía, la memantina, tiene como diana los receptores NMDA.

**Tabla 2. Comparación de fármacos aprobados para el tratamiento de la EA.**

<b>Fármaco</b>	<b>Diana</b>	<b>Etapa</b>
<b>Donepezilo</b>	AChE	Temprana / Intermedia
<b>Galantamina</b>	AChE	Temprana / Intermedia
<b>Rivastigmina</b>	AChE y BChE	Temprana / Intermedia
<b>Memantina</b>	NMDAR	Tardía

Fuente: Elaboración propia en base a datos tomados de Breijyeh Z et al., 2020 (1).

### **3. MOLÉCULAS MULTIDIANA**

#### **3.1. Definición**

Se define a las moléculas multidiana como una molécula que es capaz de interactuar con dos o más dianas terapéuticas al mismo tiempo. La obtención de estas moléculas se contraponen al paradigma que ha regido hasta hoy en la industria farmacéutica “un fármaco, una diana”, donde un fármaco se relaciona con una y solo una diana terapéutica, lo que ha demostrado ser ineficiente en el tratamiento de ciertas enfermedades multicausales, como es el caso de la EA (15).

#### **3.2. Historia**

El surgimiento de enfermedades multicausales, de carácter crónico han demostrado la ineffectividad de los tratamientos convencionales, razón por la cual se han desarrollado múltiples estudios de moléculas capaces de modular una enfermedad, teniendo como diana múltiples objetivos, ya que, hasta ahora sólo han existido fármacos enfocados en un objetivo, o en caso de pacientes con enfermedades multicausales, se les ha administrado terapias combinadas, donde se le entrega dos medicamentos con dianas distintas, que permite una terapia más completa; sin embargo, este tipo de terapias ha presentado limitaciones en cuanto a su administración, principalmente por los efectos adversos de la combinación farmacológica, como los niveles de toxicidad (14).

Durante la última década, se ha desarrollado una serie de investigaciones en busca de fármacos que puedan modular enfermedades multicausales, intentando encontrar una molécula que permita modular enfermedades de este tipo, sin presentar reacciones adversas como las que se han mencionado con anterioridad (16).

### 3.3. Diseño y síntesis

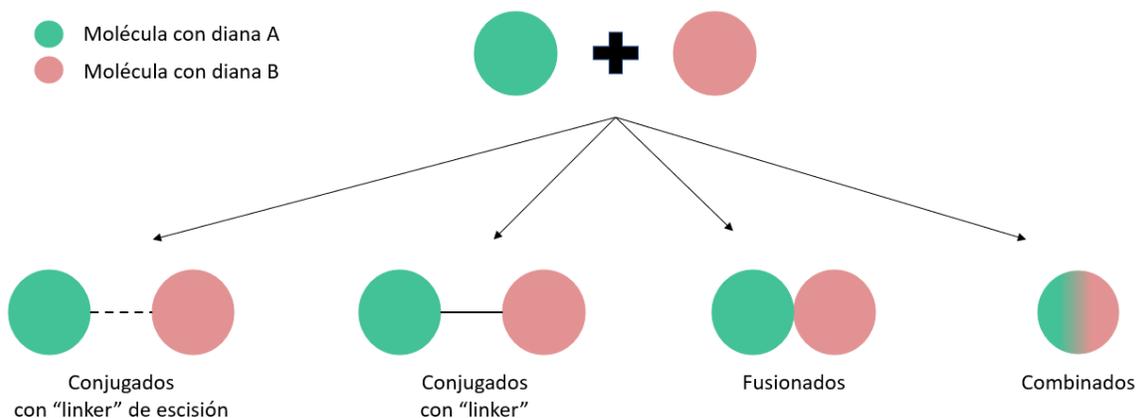
Para diseñar estas moléculas, se han desarrollado varias formas de síntesis, donde la que se utilice dependerá del compuesto base utilizado y su finalidad. El método más utilizado es el de diseño racional.

El método de diseño racional se basa en dos moléculas con dianas terapéuticas distintas, donde se busca unir las para que sean capaces de interactuar con ambas dianas al mismo tiempo, para lo que resulta de vital importancia el conocimiento previo de las dianas a utilizar y el compuesto o fármaco a utilizar. Las moléculas multidiana pueden recibir tres nombres, dependiendo del grado de unión que presenten las estructuras, pueden ser conjugadas, fusionadas o combinadas, que se pueden observar ejemplificados en la figura 7 (17).

Las moléculas conjugadas son las más utilizadas, y su creación se basa en que ambas estructuras con dianas distintas no son integradas, sino que más bien son unidas mediante una estructura conectora o “linker”. Esta estructura conectora por lo general se diseña para que resulte metabólicamente estable, permitiendo que la estructura de cada molécula pueda interactuar con las dianas conocidas. Existen casos donde el “linker” es diseñado para que sea metabolizado y libere ambas moléculas, permitiendo así que cada una actúe sobre su diana de manera independiente, y es conocido como “linker” de escisión (18).

Las moléculas fusionadas, a diferencia de las conjugadas, no presentan ningún “linker”, sino que las estructuras de las moléculas a unir, se encuentran juntas, pero sin ningún tipo de solapamiento entre ellas.

El otro tipo de moléculas son las combinadas, son moléculas diseñadas a partir de una estructura en común que presenten las dos originales, creando un híbrido que pueda actuar sobre las dos dianas seleccionadas (17).



**Figura 7. Tipos de moléculas multidiana generados mediante diseño racional.** Tomado y adaptado de Hamulakova S, 2021 (17).

#### **4. TERAPIAS MULTIDIANA PARA TRATAMIENTO DE LA EA**

En estudios recientes se ha demostrado el gran potencial que presentan estas moléculas con múltiples dianas u objetivos, como actividades inhibitoras de lipoxigenasa (LOX), acetilcolinesterasa (AChE) y peroxidación lipídica (19).

La memantina ha sido el tratamiento indicado hasta el día de hoy para disminuir la expresión de síntomas en pacientes con EA, ya que en diversos estudios se ha comprobado que a concentraciones terapéuticas, la memantina bloquea eficazmente las corrientes excesivas mediadas por NMDAR extrasinápticas, mientras que conserva relativamente la actividad sináptica normal (20).

Como opción para tratamiento de la EA se han desarrollado varios ligandos dirigidos contra múltiples dianas o MTDL (por sus siglas en inglés), uniendo memantina a los farmacóforos, inhibiendo la colinesterasa (ChE) con el objetivo de abordar de forma sinérgica y más eficaz la cascada patológica de la EA (21). Se ha descubierto que los antioxidantes previenen y ofrecen beneficios terapéuticos sobre el estrés oxidativo generado por la inflamación, que está estrechamente relacionado con las lesiones de la EA.

En la actualidad, la participación de los radicales libres en la patología cerebral de la EA incluye la presencia de niveles elevados de oxidación de proteínas, productos de peroxidación de lípidos y daño mitocondrial oxidativo. Las hidroxicalconas han exhibido un perfil antioxidante muy fuerte que se ha relacionado directamente con la presencia de  $\alpha$ ,  $\beta$ -doble enlace y el resto hidroxilo. Por lo tanto, pueden considerarse como plantillas estructurales prometedoras para diseñar agentes terapéuticos potenciales contra la patología de la EA relacionada con ROS (22).

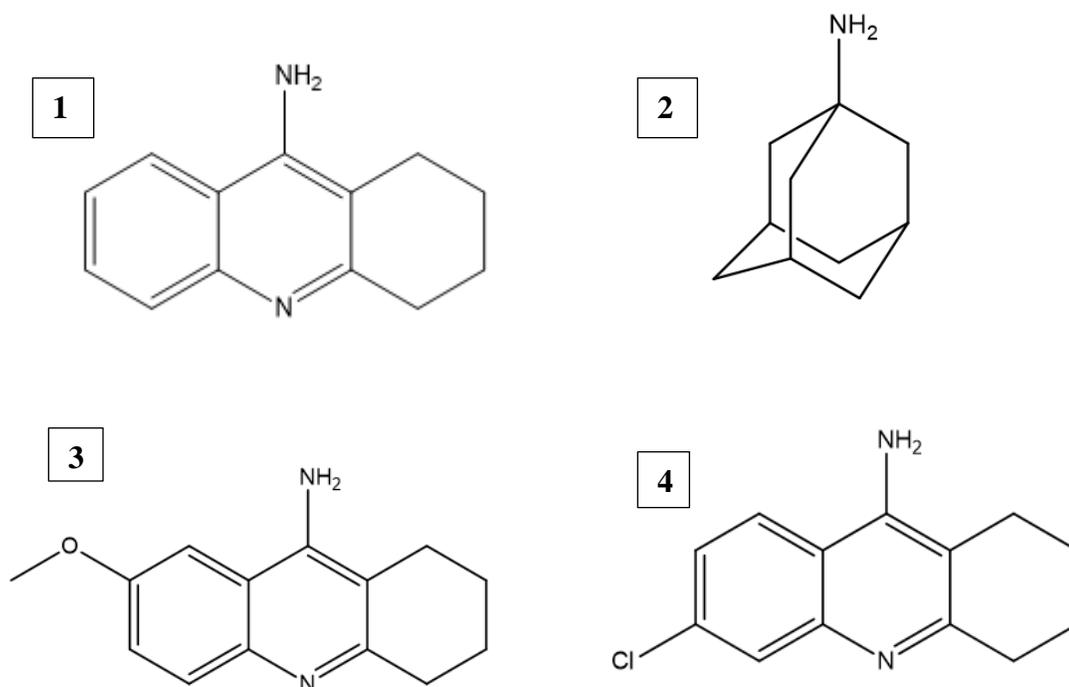
Con el fin de desarrollar fármacos que puedan interactuar con múltiples dianas, se ha desarrollado compuestos formados por derivados de memantina y otros inhibidores de AChE, entre los cuales se encuentran las terapias: híbridos de tacrina-adamantanos, híbridos de galantamina-memantina, e híbridos de carbazol/tetrahydrocarbazol-aminoadamantano (Figura 8) (22).

#### **4.1. Híbridos de adamantanos**

El adamantano se utiliza como columna vertebral estructural de numerosos compuestos y su descubrimiento lanzó un nuevo campo de la química que estudia los enfoques de la síntesis, así como las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los compuestos poliédricos orgánicos con aplicación práctica en la industria farmacéutica. De este compuesto han surgido diferentes derivados que presentan efectos positivos ante la EA, como la amantadina (2) y la memantina (23).

##### **4.1.1. Híbridos de tacrina-adamantanos**

La tacrina (THA, Figura 8 - 1) es un inhibidor de AChE de carácter reversible y no competitivo, y fue el primer fármaco aprobado para el tratamiento de la EA, sin embargo, fue retirado al poco tiempo debido a la hepatotoxicidad que causaba en los pacientes (24). De este fármaco se han derivado dos compuestos, 7-metoxitacrina (7-MEOTA, 3) y 6-clorotacrina (6-Cl-THA, 4), que poseen características anti-colinesterasa (anti-ChE) con menores efectos secundarios que la tacrina, por lo que se ha propuesto su uso como terapia en la EA, combinando con el adamantano.



**Figura 8. Estructuras de Tacrina (1), Amantadina (2), 7-MEOTA (3) y 6-Cl-THA (4).**

Mediante uniones de tipo metilen-tiourea o metilen-urea, se sintetizaron híbridos de 7-MEOTA y adamantina, como 7-MEOTA-adamantilamina, híbrido que presentó actividades de tipos micro y submicromolares sobre AChE y BChE humanas, así como sobre el receptor NMDA y la agregación de  $\text{A}\beta_{1-40}$  (Figura 9) (25). Todos los compuestos diseñados fueron sintetizados, purificados y caracterizados estructuralmente para ser evaluados *in vitro* como potenciales agentes inhibidores de las enzimas acetil y butirilcolinesterasa (Tabla 3). Los compuestos se prepararon en base a la estrategia de ligando dirigido a múltiples objetivos con diferentes longitudes de enlazador ( $n = 2-8$ ) que se unen al antagonista de NMDA adamantina y el inhibidor de hAChE 7-metoxitacrina (7-MEOTA). Con base en estudios *in silico*, estos inhibidores demostraron un carácter de sitio de unión dual capaz de interactuar simultáneamente con el sitio aniónico periférico (PAS) de hAChE y el sitio activo catalítico (CAS). Claramente, estos derivados estructurales exhibieron muy buena actividad inhibitoria hacia hBChE, resultando en inhibidores más selectivos de esta enzima.

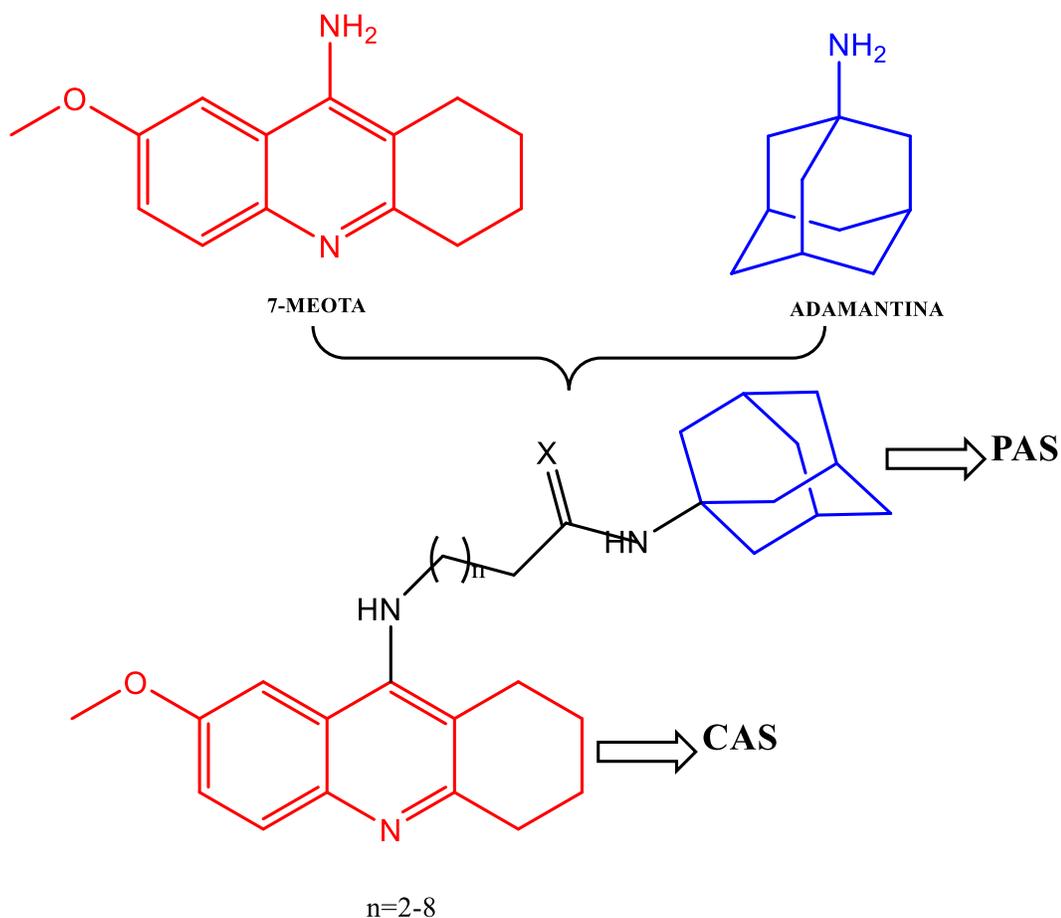


Figura 9. Estructura química híbrido 7-MEOTA-adamantilamina.

Tabla 3. Actividades biológicas de los híbridos 1 y 2 de 7-MEOTA-amantadina.

Compuesto	n	X	AChE IC <sub>50</sub> (μM)	BChE IC <sub>50</sub> (μM)	Aβ IC <sub>50</sub> (μM)	NMDAR IC <sub>50</sub> (μM)
1	5	S	0,47	0,11	66,5	1,80
2	8	O	2,03	18,82	0,038	nd

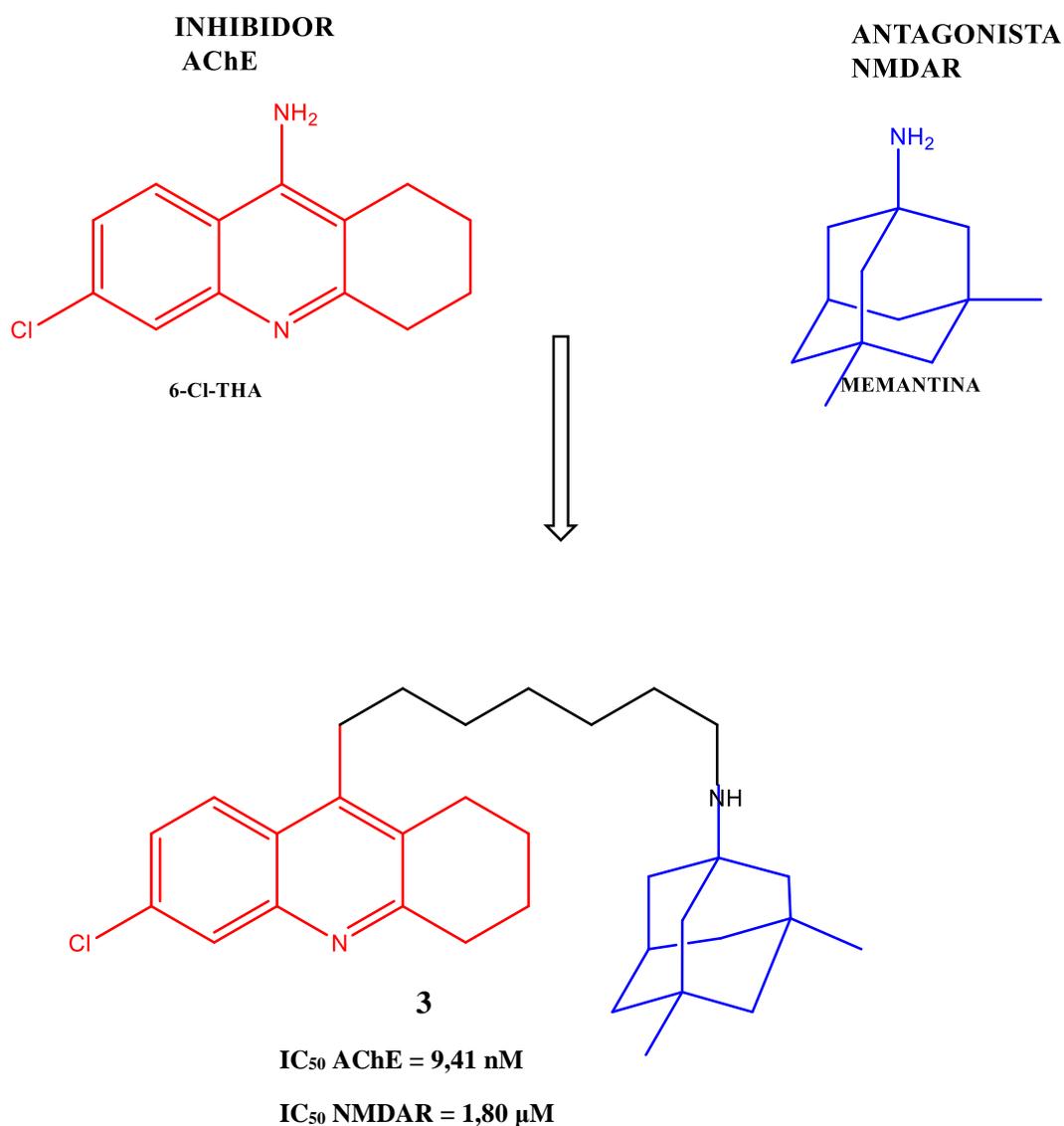
Fuente: Tomado y adaptado de Marotta et al., 2020 (22).

Continuando con los estudios de los híbridos, se evaluaron los compuestos de partida, así como los intermediarios sintéticos, analizándose un total de 17 compuestos, siete de los cuales poseían la unión de ambos núcleos, con diferente longitudes en la cadena de unión, siendo los compuestos más activos aquellos que ya incorporaron ambos núcleos y que la cadena de unión presentó una longitud de 5 carbonos, los cuales mostraron valores de  $IC_{50}$  más bajos para ambas enzimas que la referencia 7-MEOTA (10,50  $\mu$ M para AChE humana y 21  $\mu$ M para BChE humana), lo que sugiere que esto es la distancia óptima para la interacción de destino. Los estudios complementados con análisis computacional lo que corrobora la unión de estos compuestos al sitio activo de la enzima, mostrando energías de unión favorables para tal efecto.

El derivado con unión de tipo metilen-urea presentó una actividad débil a moderada sobre la enzima BACE-1, enzima que actúa en la producción de beta amiloide, por lo que conlleva una inhibición de la agregación de  $A\beta_{1-40}$ . Mientras que el derivado con unión de tipo metilen-tiourea presentó una inhibición del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), actuando de manera similar a la memantina, con un valor  $IC_{50}$  similar al de la memantina (1,80  $\mu$ M frente a 1  $\mu$ M) y la misma eficacia que el bloqueador de canales abiertos, pero con una cinética más lenta, lo que puede sugerir por qué se une preferentemente al receptor eNMDA, asociado con la excitotoxicidad mediada por glutamato, representando efectos favorables en esta patología (26).

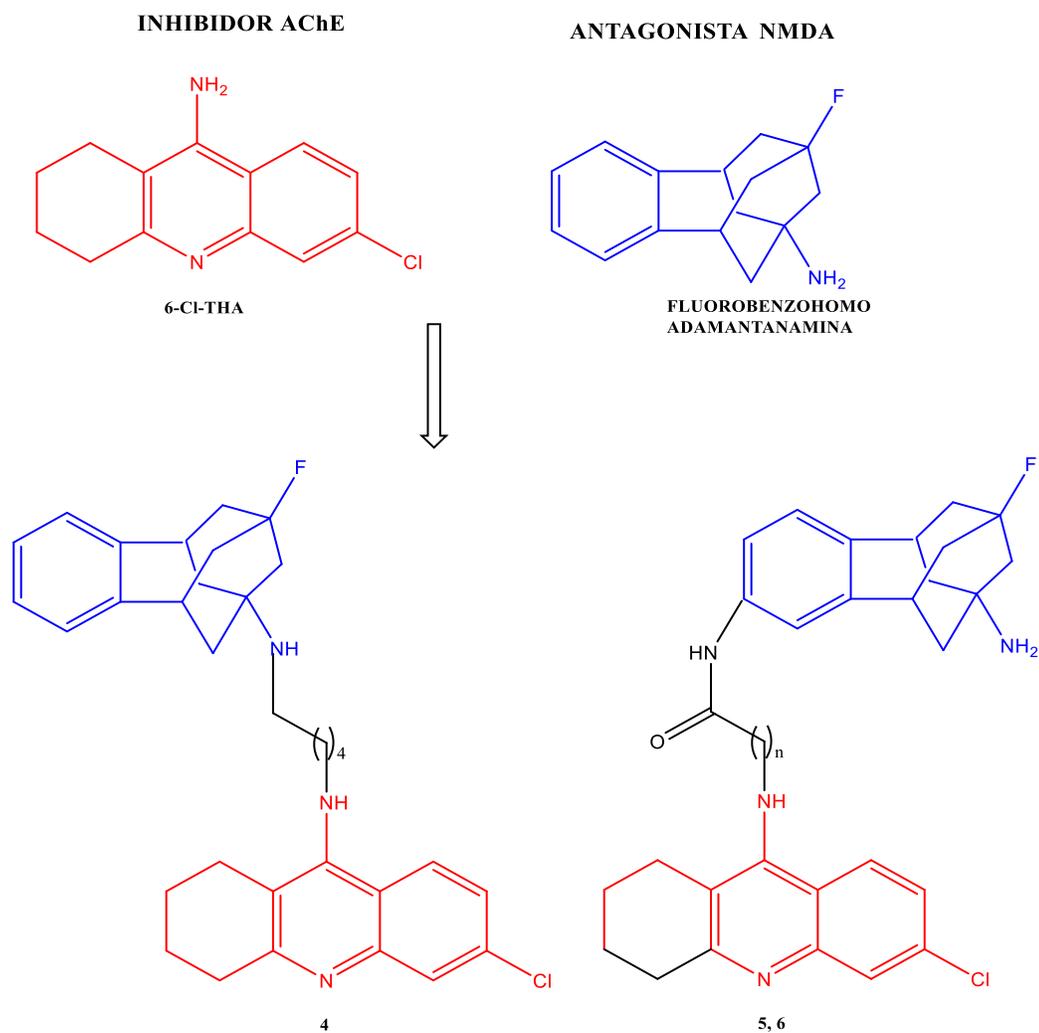
Estos híbridos de tacrina y adamantanos actúan como inhibidores competitivos de AChE y BChE humanas (26), presentando efectos beneficiosos, pues estas enzimas aumentan en la enfermedad de EA, y gracias a la administración de estos híbridos podría reducir la actividad de estas enzimas, que conllevaría un aumento de los niveles del neurotransmisor, y una disminución de los productos de desechos tóxicos que se acumulan en el espacio sináptico en esta enfermedad.

Utilizando este concepto de híbrido, se desarrolló una nueva molécula, denominada 6-clorotacrina-memantina. Este híbrido actúa como un bloqueador de canales abiertos, presentando acción sobre AChE y el receptor NMDA, teniendo una acción superior que el compuesto original de tacrina (6-Cl-THA) para inhibir AChE ( $IC_{50} = 9,41 \text{ nM}$  frente a  $20 \text{ nM}$ ), pero un efecto menos potente que la memantina para inhibir el receptor NMDA ( $IC_{50} = 1,80 \text{ }\mu\text{M}$  frente a  $0,79 \text{ }\mu\text{M}$ ). Se demostró, también, que el compuesto es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, pero resulta tener una citotoxicidad más elevada que el compuesto original (6-Cl-THA) ( $IC_{50} = 5,93 \text{ }\mu\text{M}$  frente a  $70,7 \text{ }\mu\text{M}$ ) (Figura 10) (27).



**Figura 10. Diseño de 6-Cl-THA-memantina (3) y actividades biológicas.**

Debido a los efectos prometedores obtenidos en los estudios relacionados a el compuesto 6-clorotacrina-memantina, Pérez-Areales et al. realizaron estudios posteriores, donde se combinó la estructura de 6-Cl-THA, uniendo a través de diferentes longitudes de enlazador, y en diferentes posiciones, a modo de analizar el potencial de los nuevos híbridos (28). De esta manera se crearon nuevos híbridos, compuestos de clorotacrina-benzohomoadamantano, con el fin de analizar el efecto mostrado sobre los blancos terapéuticos de interés analizados (Figura 11).



**Figura 11. Diseño y síntesis de híbridos 6-clorotacrina-benzohomoadamantano 4 – 6.**

Estos compuestos presentaron mejores resultados al inhibir la AChE humana que el compuesto original 6-Cl-THA ( $IC_{50} = 0,3-2,5$  nM frente a 14,5 nM), siendo el compuesto **5** el que presentó un efecto más potente. Sin embargo, ninguno de los híbridos logró superar a 6-Cl-THA en la inhibición de BChE humana (Tabla 4) (28).

**Tabla 4. Actividades biológicas híbridos 6-clorotacrina-benzohomoadamantano 4 - 6.**

Compuesto	n	AChE $IC_{50}$ (nM)	BChE $IC_{50}$ ( $\mu$ M)	NMDAR $IC_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>4</b>	-	1,4	0,2	0,9
<b>5</b>	3	0,3	0,5	1,2
<b>6</b>	4	2,5	0,02	3,4

Fuente: Tomado y adaptado de Marotta et al., 2020 (22).

Los compuestos **4** y **5** fueron los que presentaron mejores resultados contra los receptores NMDA, que, a diferencia de la memantina, toleran la monometilación del grupo amino cabeza de puente en el andamiaje policíclico y ambos compuestos son 2 veces más potentes que la benzohomoadamantanamina ( $IC_{50} = 0,9$  y  $1,2$   $\mu$ M frente a  $1,9$   $\mu$ M) (22).

Aunque la 6-clorotacrina mostró un efecto beneficioso *in vivo* sin signos de toxicidad, son esenciales más pruebas en el campo de la bioquímica y la farmacología para revelar el mecanismo de acción exacto, la evaluación de la seguridad y el destino metabólico del compuesto después de la administración repetida (29).

#### 4.1.2. Híbridos de galantamina-memantina

Galantamina es un fármaco aprobado para el tratamiento de la EA, en etapa temprana a intermedia, actúa como un inhibidor de AChE, inhibiendo la degradación de la ACh, y presenta acción sobre determinados receptores nicotínicos, lo que conduce a un aumento de la neurotransmisión colinérgica en el SNC.

Para estudiar las posibilidades que presentaba este compuesto se desarrollaron estudios que unían galantamina y memantina mediante un átomo de nitrógenos, donde se demostró que los compuestos presentaban acción antagónica al receptor NMDA y la inhibición de AChE en potencias altas y equilibradas (30).

En estudios relacionados al híbrido de galantamina-memantina, se demostró una acción sinérgica, donde el efecto inhibitor de receptores NMDA y la inhibición de AChE se vieron potenciadas (30).

Es importante tener en cuenta que para la inhibición de AChE, es fundamental identificar la longitud adecuada del conector entre las dos moléculas, lo que permite la interacción tanto con el CAS como con el PAS de AChE. De hecho, el conector 4-metileno (**7**) impidió que interactuara adecuadamente con el PAS, reduciendo así su afinidad en comparación con los derivados con cadenas de alquilo más largas (**8**). Al mismo tiempo, para el antagonismo de NMDAR, se permiten sustituyentes de alquilo en el nitrógeno de memantina (ver Figura 12).

El híbrido de galantamina/memantina (Fig. 12), demostró potenciar los efectos de cada fármaco, presentando inhibición sobre AChE, al igual que la galantamina, inhibición de los NMDAR, como la memantina; favoreciendo el efecto neuro protector a concentraciones subnanomoleculares ( $IC_{50} = 0,28 \text{ nM}$ ), su actividad biológica se describe en la tabla 5 (30).

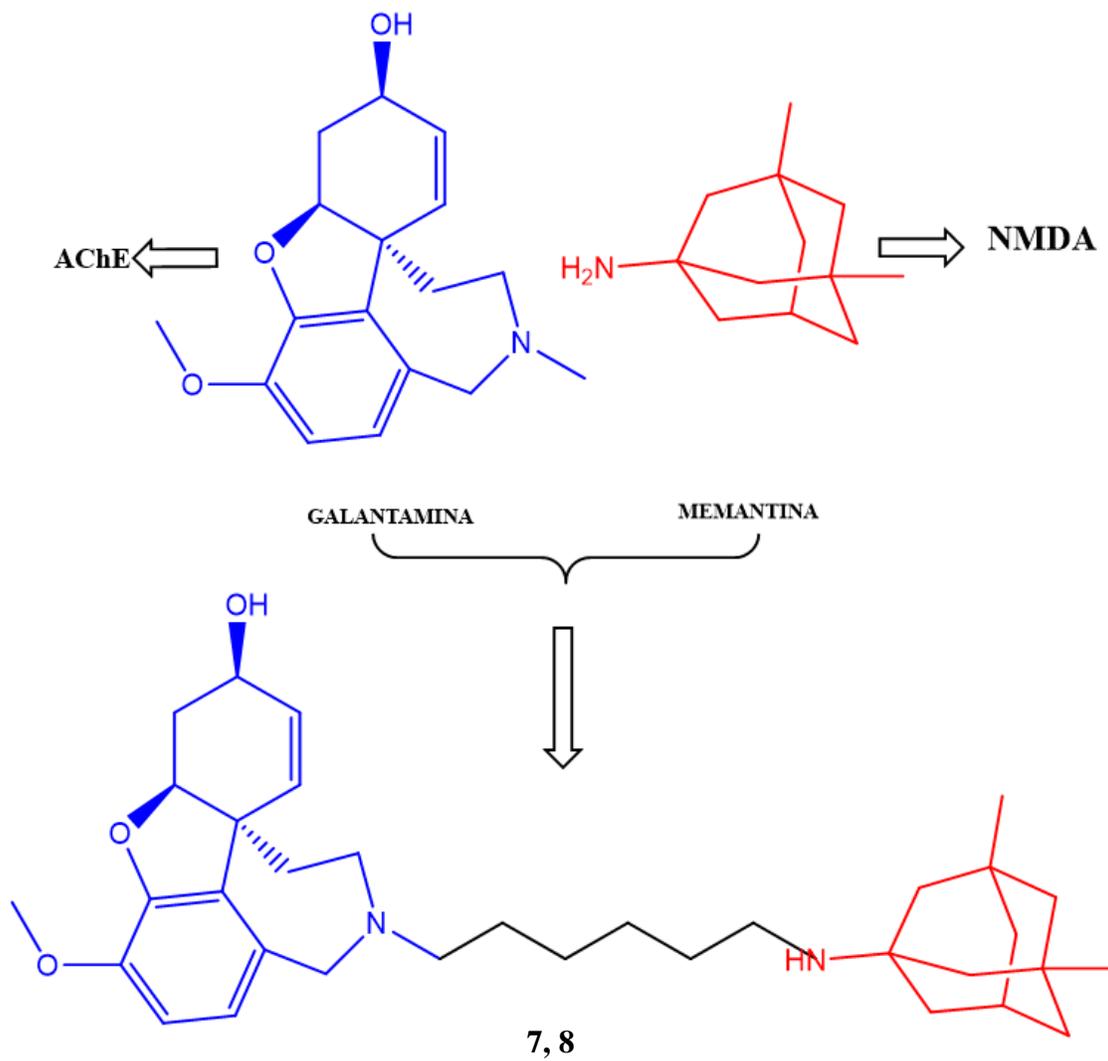


Figura 12. Estructura del híbrido de galantamina/memantina (7, 8) (30).

**Tabla 5. Actividades biológicas de los híbridos de galantamina-memantina (7, 8)**

<b>Compuesto</b>	<b>n</b>	<b>AChE IC<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>NMDAR Ki (μM)</b>
<b>7</b>	2	695,9	2,32
<b>8</b>	3	1,16	4,6

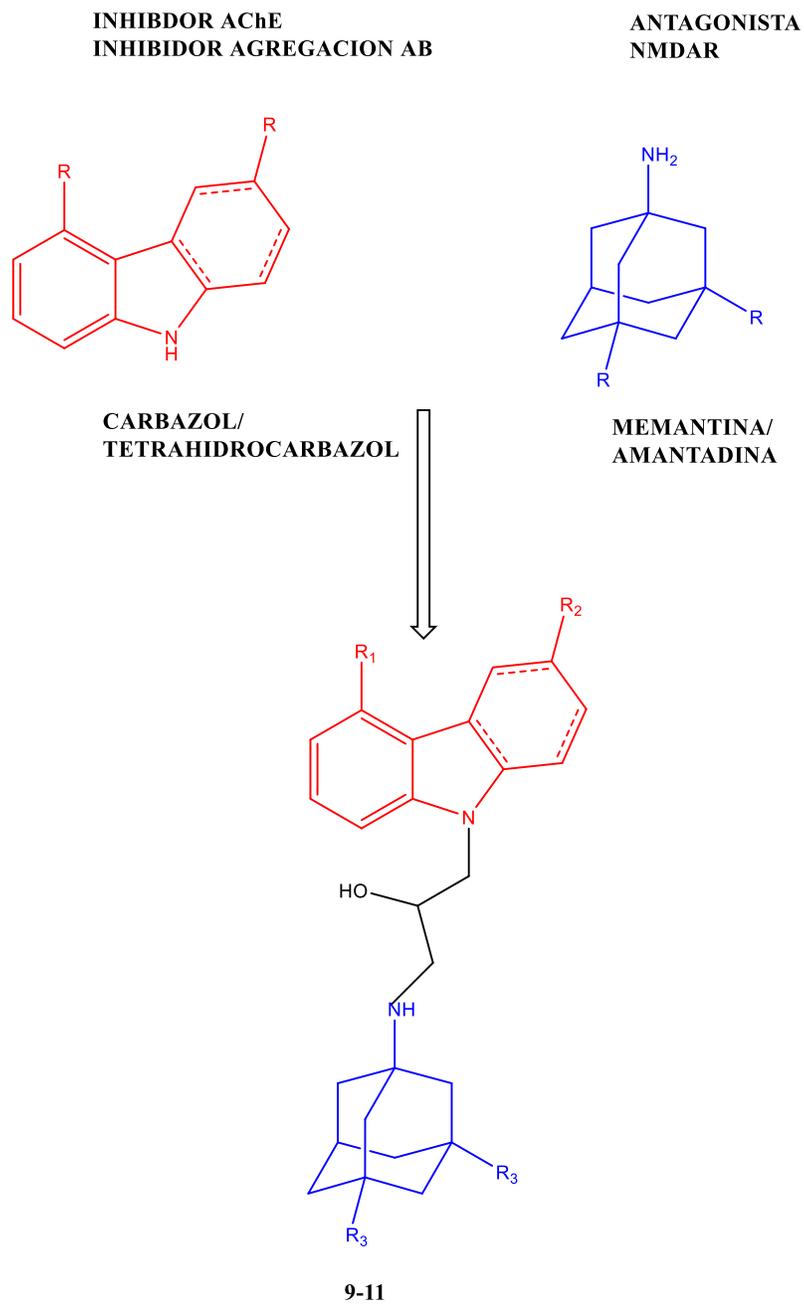
n: Distancia enlazador.

Fuente: Tomado y adaptado de Marotta et al., 2020 (22).

#### **4.1.3. Híbridos de aminoadamantano-carbazol / tetrahydrocarbazol**

Dentro del grupo de los carbazoles existe un compuesto denominado N-alquilcarbazoles, que posee características potencialmente modificadoras en la EA, ya que, son capaces de favorecer la formación de A $\beta$  soluble mediante diferentes mecanismos. Además, se ha demostrado que posee un efecto neuro protector y una inhibición en la actividad de AChE y BChE, causando una disminución de los compuestos formados por estas enzimas (31).

Bachurin et al. sintetizaron y probaron híbridos de aminoadamantanos con carbazol y tetrahydrocarbazol (Figura 13), presentando efectos como inhibidores de AChE y BChE humanas, antagonistas de receptores NMDA y como estimuladores del ensamblaje de microtúbulos (Tabla 6), esto principalmente por la hipótesis de que en la EA, la alteración estructural de los microtúbulos y la supresión de polimerización de la tubulina son signos de la neurodegeneración, lo que conduce a fallas en el transporte axonal, por lo que desde ese punto de vista, es importante desarrollar compuestos que sean capaces e estabilizar los microtúbulos y mejorar el ensamblaje de la tubulina (32) (33).



**Figura 13. Diseño de fármacos y actividades biológicas de híbridos de carbazol/tetrahydrocarbazol-aminoadamantano.**

**Tabla 6. Actividades biológicas de híbridos de carbazol/tetrahydrocarbazol-aminoadamantano (9-11).**

Compuesto	Núcleo	R1	R2	R3	BChE	NMDAR
					IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>9</b>	Carbazol	-	-	-	15,9	8,2
<b>10</b>	Tetrahydrocarbazol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	9,17	8,1
<b>11</b>	Tetrahydrocarbazol	F	H	CH <sub>3</sub>	5,43	10,4

Fuente: Tomado y adaptado de Marotta et al., 2020 (22).

Como resultados se obtuvo que tres híbridos (**9**, **10** y **11**), los cuales actúan como inhibidores débiles de AChE humana, pero presentan un efecto más selectivo y potente sobre BChE, teniendo una actividad de inhibición mayor que la del carbazol de referencia (IC<sub>50</sub> = 5–20 μM vs. >20 μM). El compuesto **11**, con un núcleo de tetrahydrocarbazol fluorado, es el que presenta la mayor actividad de inhibición sobre BChE (24).

En los compuestos desarrollados, los sustituyentes tienen un papel importante en el efecto que cada uno produce sobre una diana determinada. En el caso del **9** que tiene un núcleo de carbazol y no presenta sustituyentes, es el compuesto más activo en el sitio alostérico, mientras que los compuestos con base de tetrahydrocarbazol, en especial el **10**, presenta una afinidad mayor por el sitio alostérico de la subunidad NR2B, teniendo un perfil multimodal más equilibrado, con un valor de IC<sub>50</sub> menor que la memantina y la amantadina.

Como se aprecia en la tabla 7, los híbridos presentaron acción sobre distintas dianas y además lograron presentar un efecto neuroprotector, importante para el tratamiento de la EA.

**Tabla 7. Comparación de actividad entre híbridos de adamantano.**

<b>Compuesto</b>	<b>Actividad sobre AChE</b>	<b>Actividad sobre BChE</b>	<b>Efecto neuroprotector</b>	<b>Efecto mayor al compuesto original</b>
<b>Híbridos de tacrina-adamantanos</b>	✓	✓	✓	✓
<b>Híbridos de galantamina-memantina</b>	✓	×	✓	✓
<b>Híbridos de aminoadamantano-carbazol / tetrahydrocarbazol</b>	✓	✓	✓	✓

Fuente: Elaboración propia en base a datos tomados de Marotta et al., 2020 (22).

Estas moléculas en general han presentado buenos avances para el tratamiento de la EA, ya que, han permitido una mejor inhibición a nivel de AChE y BChE, disminuyendo los compuestos tóxicos generados por estas, lo que podría inducir una mejoría sintomática en los pacientes con EA.

Además, se ha demostrado un efecto neuro protector en los compuestos mencionados anteriormente, ya que, en varios de ellos se ha encontrado un efecto sinérgico con la memantina, fármaco utilizado en etapas intermedias a tardías.

En general, los híbridos derivados de la memantina han formado una base sólida para el desarrollo de moléculas multidiana para el tratamiento de la EA, pues han demostrado mejoras significativas en comparación con los fármacos utilizados hasta el día de hoy. Sin embargo, los estudios realizados no permiten la comercialización de estas aún, pues en algunos casos, sus niveles de toxicidad también aumentan, causando hepatotoxicidad en el organismo, que, al sumar a la condición del paciente con EA, puede empeorar su situación.

## **4.2. Moléculas multidiana para tratamiento de la EA de estudios recientes**

### **4.2.1. Inhibidor de Acetilcolinesterasa (AChE) y Transportador de Serotonina (SERT)**

En la actualidad, los tratamientos enfocados en la EA son capaces de actuar sobre dianas como las colinesterasas y los receptores NMDA, tratando, así, los efectos directos de la enfermedad, como la pérdida de memoria. Sin embargo, la EA conlleva otros síntomas, como la depresión, por lo que, es necesario administrar una terapia adicional a la clásica para el Alzheimer para tratar los síntomas asociados.

Considerando la importancia de los síntomas que se asocian con el avance de la enfermedad, ha surgido la necesidad de desarrollar fármacos capaces de actuar sobre las dianas clásicas de la EA, pero que además sean capaces de modular los efectos asociados, como la depresión y el déficit de serotonina.

En estudios recientes se han desarrollado moléculas que sean capaces de inhibir la AChE, y que a su vez puedan cubrir la depresión. Por lo que se diseñó un inhibidor dual, utilizando como molécula base la rivastigmina, inhibidor de AChE; y este se unió con un fragmento de fluoxetina (Figura 14) (34).

El estudio fracasó en muchas ocasiones debido a que la estructura del compuesto formado no era estable, sin embargo, el problema fue solucionado mediante la optimización del compuesto formado, creando un doble enlace en un anillo insaturado (34).

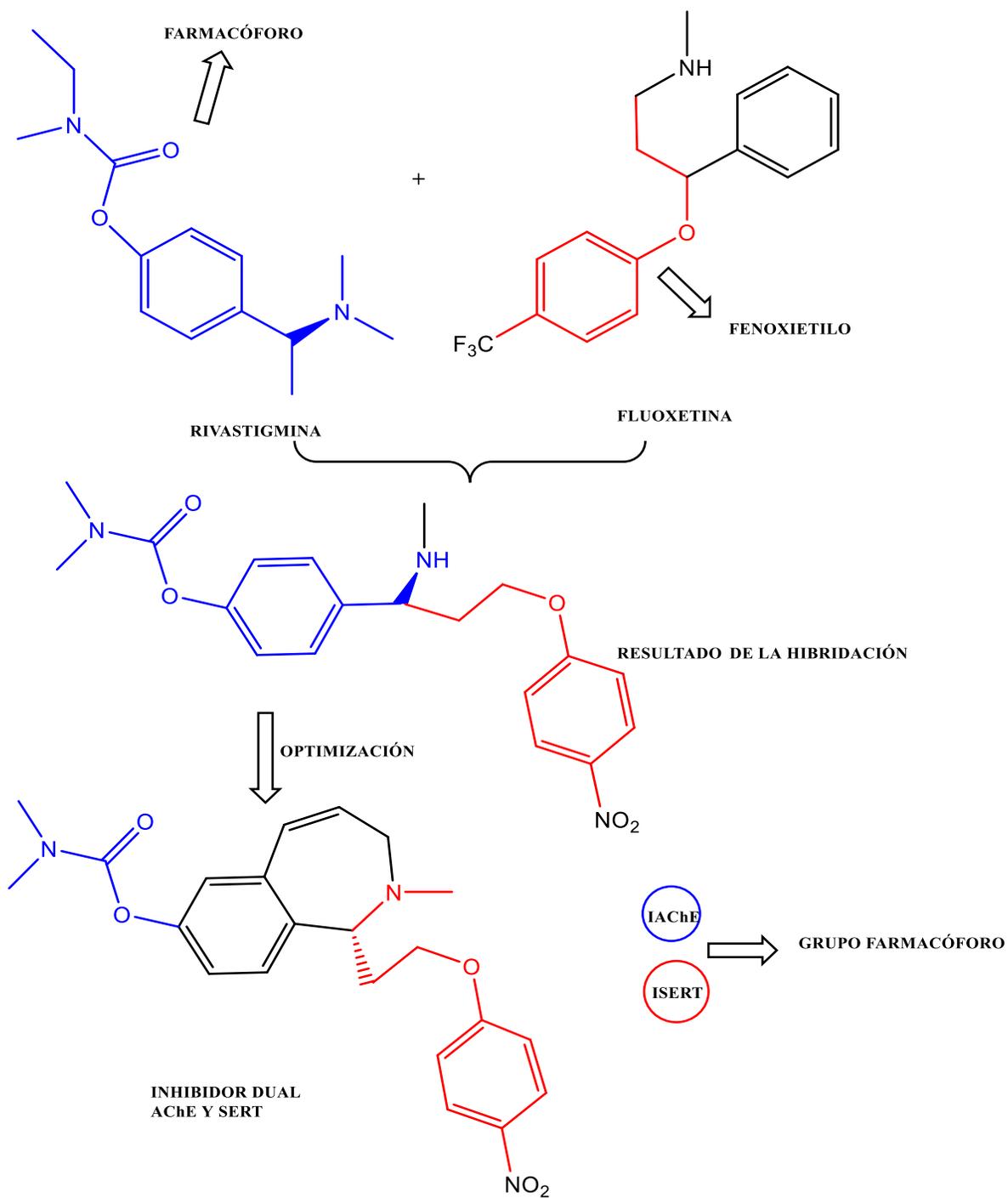


Figura 14. Diseño y optimización del Inhibidor dual de AChE y SERT (34).

En este caso se puede pensar que los inhibidores de SERT (fluoxetina) podrían combinarse con el tratamiento anticolinérgico en los pacientes con EA para controlar los síntomas depresivos. Sin embargo, la coadministración de inhibidores de AChE y de SERT no se recomienda por la dificultad que supone gestionar las diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas de ambos, además de que ello puede dar lugar a interacciones fármaco-fármaco perjudiciales para el paciente (34).

#### **4.2.2. Inhibidor de Acetilcolinesterasa (AChE) y Monoamino oxidasas (MAO)**

Los ligandos dirigidos a múltiples objetivos (MTDL) resultan una forma prometedora de tratamiento para abordar las patologías multicausales, como la EA. En estudios recientes Ekström F. et al. han estudiado la capacidad sinérgica de la monoamino oxidasa B (MAO-B) y la acetilcolinesterasa (AChE) proporciona un efecto potenciado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (35).

Las monoamino oxidasas A y B (MAO A y B) son enzimas que rompen el enlace C  $\alpha$ -N de arilalquilaminas, tras una reacción de desaminación oxidativa dependiente de FAD. Estas monoamino oxidasas son objetivos variados para la depresión y la Enfermedad de Parkinson (EP), y recientemente surgió interés pues pueden presentar efectos en otros trastornos relacionados con la edad, como la EA (36).

Se identificó previamente, tanto **1** como **2** (mezcla racémica o muestras enantiopuras), como aciertos de doble objetivo. En cuanto a la cumarina **1**, un enfoque de diseño inspiró la introducción del resto colgante *N*-metilbencilamina en el marco de 7-benciloxicumarina (conocido como bateador MAOB) con el objetivo de mejorar la inhibición de la AChE (37). El compuesto **2** se descubrió al hibridar el núcleo de cumarina con el N basado en donepezilo-

molde de bencilpiperidina. Para todos los inhibidores, mediante el uso de fuentes comerciales de enzimas MAO y AChE, los valores IC<sub>50</sub> estuvieron en el rango micromolar o submicromolar (Tabla 8). Se investigó con más detalle el mecanismo de inhibición y el modo de unión de 1 y 2 en relación con sus dianas enzimáticas duales utilizando formas recombinantes purificadas de MAO-B humana y AChE de ratón. Este último comparte un 88% de identidad de secuencia con la enzima humana (38).

**Tabla 8. Inhibición de las enzimas MAO-B y AChE por los compuestos 1 y 2 (valores K<sub>i</sub> y IC<sub>50</sub>, ambos expresados como μM).**

	MAO-B		AChE	
	Humano		Humano	Ratón
	K <sub>i</sub> <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>b, c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>e</sup>
<b>1</b>	4,5 ± 0,2 <sup>f</sup>	0,010 ± 0,002	0,12 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,40 ± 0,03
(+) <b>-2</b>	0,093 ± 0,015	0,023 ± 0,003	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1
(-) <b>-2</b>	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,08	1,3 ± 0,2	0,70 ± 0,05
(±) <b>-2</b>	0,13 ± 0,02	0,030 ± 0,005	1,4 ± 0,3	nd

<sup>a</sup> Experimentos espectrofotométricos mediante ensayo acoplado a HRP aplicado sobre enzima recombinante purificada.

<sup>b</sup> Método de fluorescencia (quinuramina) aplicado a enzimas recombinantes de fuentes comerciales.

<sup>c</sup> Los valores de IC<sub>50</sub> ya se han informado en la literatura.

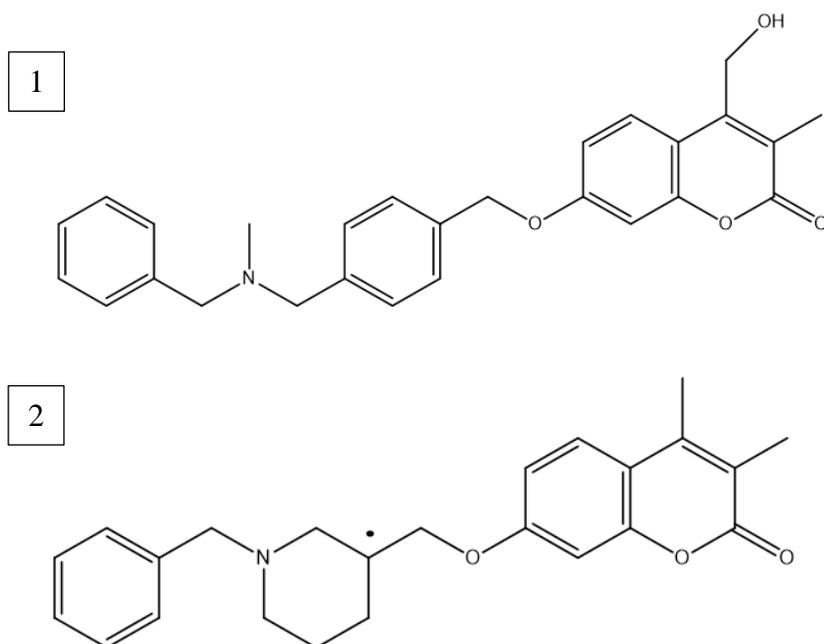
<sup>d</sup> Método espectrofotométrico de Ellman aplicado a enzimas recombinantes de fuentes comerciales.

<sup>e</sup> Método espectrofotométrico de Ellman aplicado sobre enzima recombinante purificada.

<sup>f</sup> K<sub>i</sub> de unión fuerte determinado por la ecuación de Morrison.

Fuente: Tomado y adaptado de Ekström et al., 2022 (35).

La MAO-B humana recombinante se expresó en *Pichia pastoris* y se purificó como muestras solubilizadas con detergente. Se realizaron mediciones cinéticas en estado estacionario para determinar el  $K_i$  valores de estos compuestos usando el ensayo acoplado de peroxidasa de rábano picante espectrofotométrico de curso de tiempo y bencilamina como sustrato. Los valores de velocidad inicial medidos a diferentes concentraciones de sustrato e inhibidor se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten mediante el programa GraphPad Prism 5. Para 1, ( $\pm$ ) -2, (-) -2 y (+) -2 el mejor ajuste (es decir, se obtuvo un valor de R2 próximo a 1,0) con un modelo de inhibición competitiva. Los valores de  $K_i$  de ( $\pm$ ) -2, (-) -2 y (+) -2 estaban todos en el rango submicromolar con (+) -2, dando el valor más bajo (0,093  $\mu\text{M}$ ), que está de acuerdo con los valores  $\text{IC}_{50}$  previamente determinados (Tabla 8).

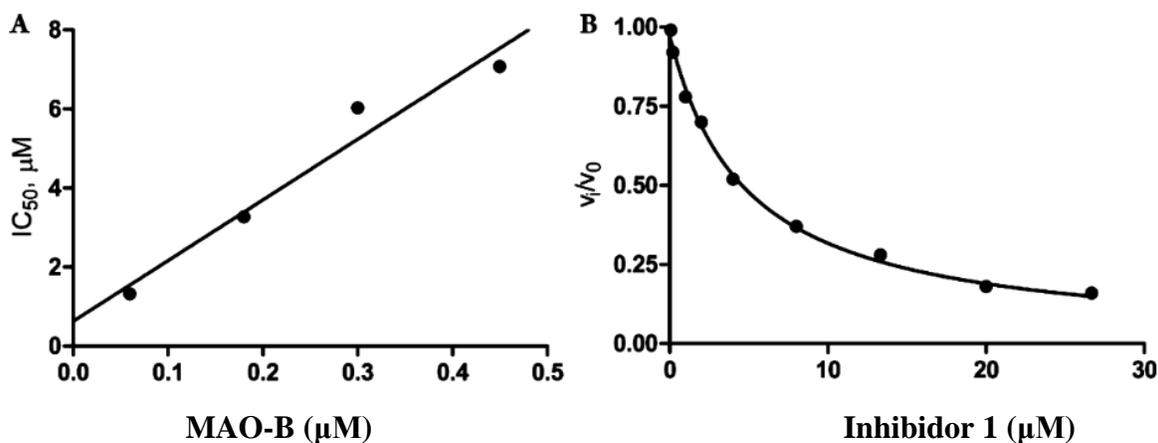


**Figura 15. Estructura química de compuestos 1 y 2.**

Donde 7-[(4-{[bencil(metil)amino]metil}bencil)oxi]-4-(hidroximetil)- 2H -cromen-2-ona (1, como clorhidrato) y 7- [(1 -bencilpiperidin-3-il) metoxi]-3,4-dimetil- 2H -cromen-2-ona (2) en su mezcla racémica (clorhidrato) o como formas enantiopuras (bases libres).

En el caso del inhibidor 1, se observó que cada medición de ensayo (absorbancia en función del tiempo) presentaba un perfil que mostraba una ventana corta de linealidad y alcanzaba una meseta en pocos minutos, lo que era poco común para MAO-B y no se detectó para compuestos 2 (racemato y enantiómeros). Para investigar si este efecto pudiese estar relacionado con un modo de inhibición de unión estrecha observado previamente con inhibidores de cromonas, se midió  $IC_{50}$  valores a diferentes concentraciones de enzima (a una concentración de sustrato de bencilamina de 0,333 mM) y usando el mismo ensayo espectrofotométrico empleado para la determinación de  $K_i$ . De hecho, se observó un aumento lineal de los valores de  $IC_{50}$  lo que indica que 1 es un inhibidor competitivo de unión fuerte de MAO-B. Un experimento análogo llevado a cabo con ( $\pm$ )-2 reveló que los valores de  $IC_{50}$  no están significativamente influenciados por la concentración de enzima, lo que sugiere que este compuesto es un inhibidor puramente competitivo (35).

Como se observa en la figura 16, en A, el aumento lineal de los valores  $IC_{50}$  determinados a diferentes concentraciones, lo que indica un modo de inhibición de unión fuerte. En B, el gráfico de la velocidad de la enzima ( $v_i$  y  $v_0$  son los valores de velocidad inicial en presencia y ausencia del inhibidor 1, en función de la concentración del inhibidor.



**Figura 16. Inhibición de la MAO B humana por inhibidor de cromonas, de tipo competitivo.** Tomado de Ekström et al., 2022 (35).

El  $K_i$  de unión estrecha para el inhibidor les un orden de magnitud mayor que el obtenido inicialmente ajustando los datos a la ecuación de Michaelis-Menten para la inhibición competitiva ( $0,77 \mu\text{M}$ ). Como se sabe que muchos inhibidores de unión fuerte presentan un inicio lento de inhibición que puede verse significativamente afectado por la presencia del sustrato enzimático, se investigó el modo de unión de estos ligandos de doble objetivo mediante enfoques biofísicos (35).

### **4.3. Moléculas multidiana para el tratamiento de la EA de origen natural**

Adicional a los estudios de moléculas multidiana de origen sintético, se han desarrollado estudios que evalúan el potencial que podrían presentar moléculas de origen natural en el tratamiento de la EA, como podrían ser moléculas extraídas de plantas, ya que, el producto natural es un recurso muy valioso en la búsqueda de precursores químicos con bioactividad potencial y pocos efectos adversos debido a su diversidad estructural (39).

La aún inexistencia de un tratamiento efectivo para tratar o curar la EA, la ha convertido en un problema severo de salud pública a nivel mundial. Como ya se ha descrito previamente, en la actualidad solo existen cinco fármacos aprobados para tratamiento clínico de la EA: tacrina, galantamina, donepezilo, rivastigmina y memantina, sin embargo, la eficacia de estos fármacos se ve limitada y producen efectos secundarios, motivo por el cual es necesario continuar investigando en nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EA. Los productos naturales son una excelente fuente de agentes terapéuticos, ya que contienen una amplia diversidad de moléculas bioactivas (40). En relación con esto, se reportó que para el 2001 sólo se habían estudiado entre el 6%-15% de las plantas con propiedades medicinales, en la identificación y aislamiento de los metabolitos secundarios

con un potencial farmacológico (41), por lo cual hay una gran cantidad de especies vegetales inexploradas fitoquímicamente en relación a su composición química y a su potencial terapéutico frente a algunas de las afecciones de interés mundial donde se incluye la EA. Dentro de las ventajas de trabajar con productos naturales, se encuentra que, al ser estos sintetizados por organismos vivos, tienen mayores probabilidades de cumplir funciones biológicas, lo que les permite, por ejemplo, tener moléculas que se unen a sus posibles receptores con mayor afinidad (42). Además, presentan una amplia diversidad química, mayor complejidad biosintética y propiedades farmacológicas de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (42).

Los productos sintéticos por su parte, se diferencian de los productos naturales en su proceso de obtención, ocasionando que se favorezca la generación de estructuras con un menor número de centros quirales (43) (44), generalmente se sintetizan moléculas de bajo peso molecular, largas longitudes de cadena, un menor número de receptores y donantes de protones, menos oxígenos y más halógenos, nitrógeno y sulfuro, además de presentar una gran cantidad de enlaces de rotación libre, pocos anillos, un alto grado de saturación, etc. Lo que ocasiona, que sean menos específicos por moléculas biológicas en contraste con los compuestos naturales (42).

Es así como existen a nivel mundial grupos multidisciplinarios de investigación que han centrado sus esfuerzos en el análisis de extractos de origen natural buscando una potencial aplicación frente a EA con propiedades farmacológicas multidiana. Por ejemplo, a partir de un “screening” con 81 extractos de las familias *Rutaceae*, *Lauraceae*, *Myristicaceae* y *Piperaceae*, se identificaron 13 extractos con la capacidad antioxidante, y de inhibir la AChE (Tabla 9) (45). A partir de este screening se realizó la evaluación de un grupo pequeño de extractos etanólicos pertenecientes a las familias *Lauraceae*, *Rutaceae* y *Myristicaceae*, en el que fue posible determinar que los extractos de las especies *Ocotea lanceolata*, *Zanthoxylum rohifolium* y *Nectandra reticulata* presentaron actividad agonista de LXR (46).

Finalmente, el estudio racional de las especies activas de la familia *Rutaceae*, condujo al aislamiento de alcaloides isoquinolínicos, a partir del extracto de raíz de *Zanthoxylum rigidum*, encontrando que dos alcaloides benzofenantridínicos, nitidina y avicina, presentaron actividades inhibitorias de AChE, BChE, monoaminoxidasa, y potencial antiagregante de  $A\beta_{1-42}$  (47).

El estudio de los productos naturales no solo involucra preparación y análisis de extractos, sino también el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes para hacer la elucidación estructural de sus componentes y la actividad biológica de los compuestos puros, es así como Deng Y-H et al. estudiaron las propiedades de las plantas de *Selaginella*, donde el objetivo principal de la investigación fue encontrar ingredientes activos multidiaria para el tratamiento de la EA a partir de extractos flavonoides de estas plantas. Para conseguir su objetivo, se aplicó una terapia anti-EA a partir de los extractos obtenidos de las plantas en ratones con EA y se estudió sus resultados mediante la prueba del laberinto acuático de Morris.

Según los datos obtenidos de la investigación, se concluyó que los extractos totales (ET) de las plantas de *Selaginella*, tiene una mejora notable en la función de aprendizaje y memoria para ratones AD.

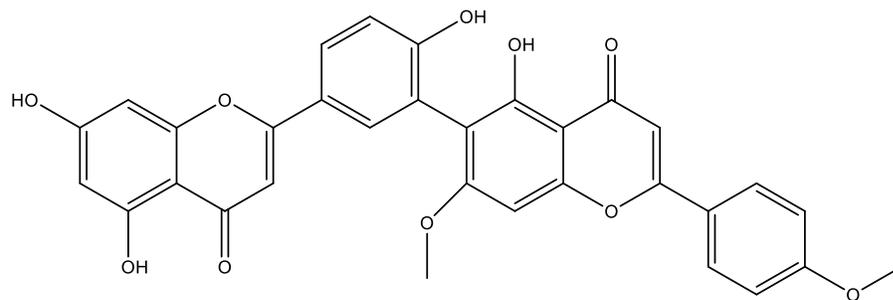
**Tabla 9. Valores IC<sub>50</sub> de los 13 compuestos estudiados.**

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)	
	BACE1	MAO-B
S-1	70,89	- <sup>a</sup>
S-2	17,20	15,74
S-3	2,75	11,72
S-4	81,93	13,89
<b>S-5</b>	<b>7,58</b>	<b>2,91</b>
S-6	20,70	8,81
S-7	3,97	23,17
<b>S-8</b>	<b>0,75</b>	<b>3,62</b>
S-9	4,32	18,21
S-10	3,40	10,24
S-11	2,27	- <sup>a</sup>
<b>S-12</b>	<b>2,82</b>	<b>3,52</b>
<b>S-13</b>	<b>2,72</b>	<b>3,42</b>

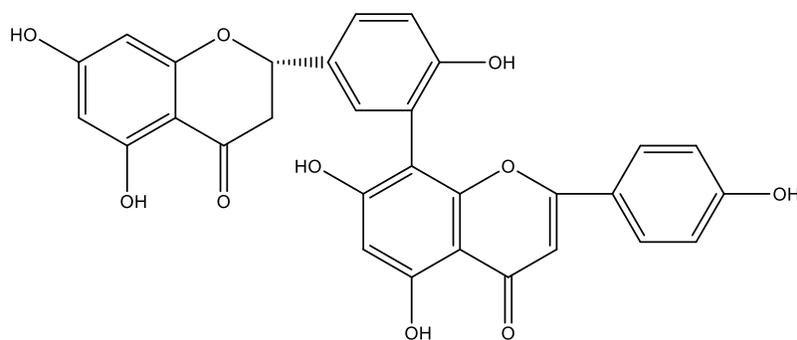
<sup>a</sup> El valor de IC<sub>50</sub> no puede ser calculado en los rangos de concentración predeterminados.

Fuente: Elaboración propia en base a datos extraídos de Deng Y-H, et al., 2017 (48).

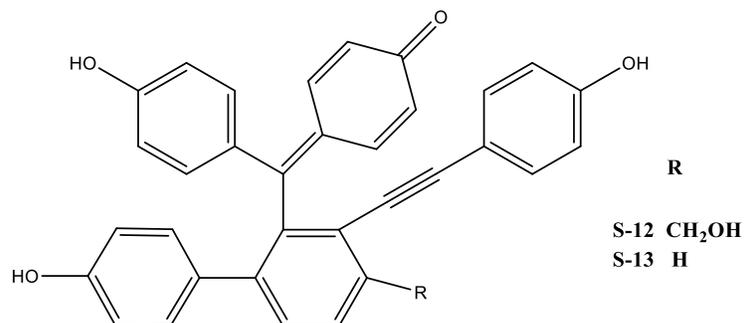
Luego de la fase de experimentación, se probaron los compuestos *in vitro*, donde 13 fueron considerados activos en múltiples dianas, y se concluyó de 4 de estos compuestos (S-8, S-5, S-13 y S-12) presentaban actividades inhibitorias significativas sobre BACE1 y MAO-B. Entre ellos, se ha demostrado que S-8 es el ingrediente más potente contra BACE1 y MAO-B con valores de IC<sub>50</sub> de 0,745 y 3,619 μM, respectivamente. Obteniendo así, algunos compuestos potencialmente activos sobre múltiples dianas, siendo potenciales candidatos para tratar la EA (Figura 17).



S-5



S-8



**Figura 17. Estructuras químicas de los compuestos con actividades inhibitorias significativas (S-5, S-8, S-12 y S-13).**

Recientemente Klose et al. han recopilado información de productos naturales provenientes de algas y de plantas con posible aplicación sobre más de un blanco terapéutico involucrado en la EA, algunos de los hallazgos son resumidos en la tabla 10, donde se describe el metabolito responsable de dicha actividad, la especie de donde ha sido aislada y el mecanismo a través del cual actúa como multidiana (49).

**Tabla 10. Hallazgos sobre productos naturales provenientes de algas y plantas.**

<b>Molécula</b>	<b>Fuente</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Referencia</b>
<b>bis-(2,3,6-tribromo-4,5-dihidroxibenzil) eter</b>	<i>Symphyocladia latiuscula</i>	Inhibidor AChE, BChE y BACE	165
<b>fucofuroeckol-B</b>	<i>Eisenia bicyclis</i>	Inhibidor BACE Induce $\alpha\beta$ citotoxicidad	167
<b>fucoxantina</b>	<i>Sargassun siliquastrum</i>	Antioxidante Inhibidor BChE	177-180
<b>Curcumina</b>	Rizomas de especies de Cúrcuma	Antioxidante, antiinflamatorio, decrece niveles de ROS	
<b>Rapamicina</b>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Reduce deposición de $\alpha\beta$ e hiperfosforilación de proteína tau, disminuye neuroinflamación	107-113

<b>Cannabidiol</b>	<i>Cannabis sativa</i>	Antiinflamatorio, antioxidante, previene neurodegeneración, reduce hiperfosforilación de proteína tau	114-121
--------------------	------------------------	---	---------

Fuente: Elaboración propia en base a datos extraídos de Klose J. et al. 2022. (49)

## CONCLUSIONES

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad multifactorial, para la cual aún no existe un tratamiento curativo, por lo tanto, se hacen necesario nuevos estudios que permitan tener evidencia científica que permita proponer nuevas moléculas capaces de interactuar con más de algunas de las dianas farmacológicas involucradas en dicha afección, dando origen a lo que se conoce como moléculas multidiana como estrategia para la búsqueda de nuevos fármacos.

Las moléculas multidiana podrían resultar en una terapia viable para el tratamiento de enfermedades multicausales, como es el caso de la EA, pues permiten el tratamiento de una o más dianas objetivo al mismo tiempo, lo que otorgaría un tratamiento más completo para cubrir la enfermedad, enfrentándola desde distintos puntos, por lo que el desarrollo de estas es de gran relevancia clínica en la actualidad.

Además, las moléculas multidiana presentan una gran variedad de opciones para enfrentar una enfermedad multicausal, ya que, no solo plantean cubrir la causa de esta, sino que son capaces de cubrir parte de los síntomas asociados a las enfermedades, como es el caso de la depresión, síntoma presente en gran parte de los pacientes de EA. Un enfoque especial, ya que, no solo se centra en dianas conocidas de la enfermedad, que se dirigen al origen de esta, sino que se enfoca, también, en el bienestar del paciente, mientras se enfrenta una diana propia de la enfermedad.

Por otro lado, la existencia de moléculas o compuestos de origen natural permite analizar un número aún mayor de opciones para el tratamiento de diversas enfermedades, y no solo de las multicausales, aunque el mayor impacto podría darse sobre estas al ofrecer una

mayor diversidad estructural, permitiendo el desarrollo de futuros compuestos con actividad en más de una diana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020;25(24):5789.
2. Alzheimer Disease International 2020.
3. A. Armstrong R. Review article What causes alzheimer's disease? *Folia Neuropathologica*. 2013;3:169-88.
4. Silva MVF, Loures CDMG, Alves LCV, De Souza LC, Borges KBG, Carvalho MDG. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*. 2019;26(1).
5. Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine*. 2016;16(3):247-53.
6. Liu P-P, Xie Y, Meng X-Y, Kang J-S. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2019;4(1):29.
7. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:185-204.
8. Fan L, Mao C, Hu X, Zhang S, Yang Z, Hu Z, et al. New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*. 2020;10.
9. Simmons-Stern NR, Deason RG, Brandler BJ, Frustace BS, O'Connor MK, Ally BA, et al. Music-based memory enhancement in Alzheimer's Disease: Promise and limitations. *Neuropsychologia*. 2012;50(14):3295-303.
10. Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2019.
11. Robinson M, Lee BY, Hane FT. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;57(2):317-30.
12. Hane FT, Robinson M, Lee BY, Bai O, Leonenko Z, Albert MS. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;57(3):645-65.
13. Bondi MW, Edmonds EC, Salmon DP. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society*. 2017;23(9-10):818-31.

14. Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019;67(3):779-94.
15. Liargkova T, Eleftheriadis N, Dekker F, Voulgari E, Avgoustakis C, Sagnou M, et al. Small Multitarget Molecules Incorporating the Enone Moiety. *Molecules*. 2019;24(1):199.
16. Gabr M, Ibrahim M. Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*. 2019;14(3):437.
17. Hamulakova S, Kudlickova Z, Janovec L, Mezencev R, Deckner ZJ, Chernoff YO, et al. Design and synthesis of novel tacrine-indole hybrids as potential multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *Future Med Chem*. 2021;13(9):785-804.
18. Broncano S. *Fármacos multidiana en la terapia anti-alzheimer*. Trabajo de fin de grado. Madrid; 2016.
19. Martins M, Silva R, M. M. Pinto M, Sousa E. Marine Natural Products, Multitarget Therapy and Repurposed Agents in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals*. 2020;13(9):242.
20. Xia P, Chen HSV, Zhang D, Lipton SA. Memantine Preferentially Blocks Extrasynaptic over Synaptic NMDA Receptor Currents in Hippocampal Autapses. *Journal of Neuroscience*. 2010;30(33):11246-50.
21. Owen RT. Memantine and donepezil: a fixed drug combination for the treatment of moderate to severe Alzheimer's dementia. *Drugs Today (Barc)*. 2016;52(4):239-48.
22. Marotta G, Basagni F, Rosini M, Minarini A. Memantine Derivatives as Multitarget Agents in Alzheimer's Disease. *Molecules*. 2020;25(17):4005.
23. Spilovska K, Zemek F, Korabecny J, Nepovimova E, Soukup O, Windisch M, et al. Adamantane - A Lead Structure for Drugs in Clinical Practice. *Curr Med Chem*. 2016;23(29):3245-66.
24. Przybyłowska M, Kowalski S, Dzierzbicka K, Inkielewicz-Stepniak I. Therapeutic Potential of Multifunctional Tacrine Analogues. *Current Neuropharmacology*. 2019;17(5):472-90.
25. Spilovska K, Korabecny J, Kral J, Horova A, Musilek K, Soukup O, et al. 7-Methoxytacrine-Adamantylamine Heterodimers as Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease Treatment — Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies. *Molecules*. 2013;18(2):2397-418.

26. Spilovska K, Korabecny J, Horova A, Musilek K, Nepovimova E, Drtinova L, et al. Design, synthesis and in vitro testing of 7-methoxytacrine-amantadine analogues: a novel cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Medicinal Chemistry Research*. 2015;24(6):2645-55.
27. Kaniakova M, Nepovimova E, Kleteckova L, Skrenkova K, Holubova K, Chrienova Z, et al. Combination of Memantine and 6-Chlorotacrine as Novel Multi-Target Compound against Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2019;16(9):821-33.
28. Pérez-Areales FJ, Turcu AL, Barniol-Xicota M, Pont C, Pivetta D, Espargaró A, et al. A novel class of multitarget anti-Alzheimer benzohomoadamantane–chlorotacrine hybrids modulating cholinesterases and glutamate NMDA receptors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;180:613-26.
29. Jan M, Eugenie N, Jaroslav P, Jiri K, Jan Korabecny and Ondrej S. Cholinesterase Inhibitor 6-Chlorotacrine - In Vivo Toxicological Profile and Behavioural Effects. *Current Alzheimer Research*. 2018;15(6):552-60.
30. Simoni E, Daniele S, Bottegoni G, Pizzirani D, Trincavelli ML, Goldoni L, et al. Combining Galantamine and Memantine in Multitargeted, New Chemical Entities Potentially Useful in Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012;55(22):9708-21.
31. Mishra CB, Gusain S, Shalini S, Kumari S, Prakash A, Kumari N, et al. Development of novel carbazole derivatives with effective multifunctional action against Alzheimer's diseases: Design, synthesis, in silico, in vitro and in vivo investigation. *Bioorg Chem*. 2020;95:103524.
32. Bachurin SO, Shevtsova EF, Makhaeva GF, Grigoriev VV, Boltneva NP, Kovaleva NV, et al. Novel conjugates of aminoadamantanes with carbazole derivatives as potential multitarget agents for AD treatment. *Scientific Reports*. 2017;7(1):45627.
33. Ballatore C, Brunden KR, Huryh DM, Trojanowski JQ, Lee VMY, Smith AB. Microtubule Stabilizing Agents as Potential Treatment for Alzheimer's Disease and Related Neurodegenerative Tauopathies. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012;55(21):8979-96.
34. Toda N, Kaneko T, Kogen H. Development of an efficient therapeutic agent for Alzheimer's disease: design and synthesis of dual inhibitors of acetylcholinesterase and serotonin transporter. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2010;58(3):273-87.

35. Ekström F, Gottinger A, Forsgren N, Catto M, Iacovino LG, Pisani L, et al. Dual Reversible Coumarin Inhibitors Mutually Bound to Monoamine Oxidase B and Acetylcholinesterase Crystal Structures. *ACS medicinal chemistry letters*. 2022;13(3):499-506.
36. Edmondson DE, Binda C. Monoamine Oxidases. *Subcell Biochem*. 2018;87:117-39.
37. Farina R, Pisani L, Catto M, Nicolotti O, Gadaleta D, Denora N, et al. Structure-Based Design and Optimization of Multitarget-Directed 2H-Chromen-2-one Derivatives as Potent Inhibitors of Monoamine Oxidase B and Cholinesterases. *J Med Chem*. 2015;58(14):5561-78.
38. Berg L, Andersson CD, Artursson E, Hörnberg A, Tunemalm AK, Linusson A, et al. Targeting acetylcholinesterase: identification of chemical leads by high throughput screening, structure determination and molecular modeling. *PLoS One*. 2011;6(11):e26039.
39. Kim CS, Bae M, Oh J, Subedi L, Suh WS, Choi SZ, et al. Anti-Neurodegenerative Biflavonoid Glycosides from *Impatiens balsamina*. *Journal of Natural Products*. 2017;80(2):471-8.
40. Ahmad S, Ullah F, Sadiq A, Ayaz M, Imran M, Ali I, et al. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase potentials of essential oil of *Rumex hastatus* D. Don collected from the North West of Pakistan. *BMC complementary and alternative medicine*. 2016;16:29-.
41. Atta ur R, Choudhary MI. Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores. A theory of memory. *Pure and Applied Chemistry*. 2001;73(3):555-60.
42. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv*. 2015;33(8):1582-614.
43. Hussain F, Khan Z, Jan MS, Ahmad S, Ahmad A, Rashid U, et al. Synthesis, in-vitro  $\alpha$ -glucosidase inhibition, antioxidant, in-vivo antidiabetic and molecular docking studies of pyrrolidine-2,5-dione and thiazolidine-2,4-dione derivatives. *Bioorg Chem*. 2019;91:103128.
44. Jan MS, Ahmad S, Hussain F, Ahmad A, Mahmood F, Rashid U, et al. Design, synthesis, in-vitro, in-vivo and in-silico studies of pyrrolidine-2,5-dione derivatives as multitarget anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem*. 2020;186:111863.

45. Plazas EA, Avila, M. C., Delgado, W. A., Patino, O. J., & Cuca, L. E. In vitro Antioxidant and Anticholinesterase Activities of Colombian Plants as Potential Neuroprotective Agents. *Research Journal of Medicinal Plants*. 2018;12.
46. Rincón EV. Generación de un modelo in vitro para evaluar la actividad agonista de extractos naturales, obtenidos de plantas de las familias de Lauraceas y Myristicaceas, sobre los receptores X del hígado (LXRs). Maestría thesis. Bogotá; 2017.
47. Plazas E, Hagenow S, Avila Murillo M, Stark H, Cuca LE. Isoquinoline alkaloids from the roots of *Zanthoxylum rigidum* as multi-target inhibitors of cholinesterase, monoamine oxidase A and A $\beta$ (1-42) aggregation. *Bioorg Chem*. 2020;98:103722.
48. Deng Y-H, Wang N-N, Zou Z-X, Zhang L, Xu K-P, Chen AF, et al. Multi-Target Screening and Experimental Validation of Natural Products from Selaginella Plants against Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8.
49. Klose J, Griehl C, Roßner S, Schilling S. Natural Products from Plants and Algae for Treatment of Alzheimer's Disease: A Review. *Biomolecules*. 2022;12(5).