



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS
ACTIVOS CON POTENCIAL
NEUROPROTECTOR PARA EL
TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER A
PARTIR DE UNA ESPECIE DEL
GÉNERO *Zanthoxylum caribaeum*
(RUTACEAE)**

ANDRÉS FELIPE BUSTAMANTE ROMERO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias
Bogotá, Colombia
2022

**BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS
ACTIVOS CON POTENCIAL
NEUROPROTECTOR PARA EL
TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER A
PARTIR DE UNA ESPECIE DEL GÉNERO
Zanthoxylum caribaeum
(RUTACEAE)**

ANDRÉS FELIPE BUSTAMANTE ROMERO

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Neurociencias

Director (a):

Mónica Constanza Ávila Murillo PhD.

Codirector (a):

Adrián Gabriel Sandoval Hernández PhD.

Línea de Investigación:

Neurofarmacología

Grupo de Investigación:

Química de productos naturales vegetales Bioactivos (QUIPRONAB), Grupo de muerte
Celular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias

Bogotá, Colombia

2022

Lo importante es no dejar de cuestionar. La curiosidad tiene su propia razón de existir.

Albert Einstein

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre: Andrés Felipe Bustamante Romero

Fecha 16/02/2022

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, al programa curricular de la Maestría en Neurociencias, a los grupos de Química de productos naturales bioactivos (QUIPRONAB) y el grupo de investigación de muerte celular, que contribuyeron y permitieron el desarrollo de mi tesis y mi formación profesional.

Los autores agradecemos al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, por la financiación de esta investigación mediante el proyecto: "Búsqueda racional de alcaloides isoquinolínicos del género *Zanthoxylum* (Rutaceae) como posibles agentes neuroprotectores para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer" Código 110177758004, convocatoria 777-2017" -RC-854 de 2017.

Al Ministerio de Medio Ambiente por el otorgamiento del Otrosí N° 21 al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados N° 121 del 22 de Enero de 2016 suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Nacional de Colombia, por medio del cual se ampara el uso para investigación del material vegetal que hace parte de esta investigación.

A mis directores de tesis Mónica Ávila y Adrián Sandoval, que fueron parte fundamental en mi proceso de formación y desarrollo de este trabajo.

A todos mis amigos integrantes del grupo QUIPRONAB por tantos momentos vividos en estos años y por su apoyo constante, especialmente a Illya Olaya, Diego Muñoz, Jorge Parra, Erika Plazas y Jeisson Martínez.

A toda mi familia, especialmente a mis padres por estar conmigo en todos los momentos vividos a lo largo de estos años. A Jennyfer por compartir conmigo esta travesía y este

sueño en el que siempre tuve su apoyo incondicional y ser esa voz de aliento y de ánimo en los momentos que más lo necesitaba.

Resumen

BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS CON POTENCIAL NEUROPROTECTOR PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER A PARTIR DE UNA ESPECIE DEL GÉNERO *Zanthoxylum caribaeum* (RUTACEAE)

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común, un desorden neurodegenerativo de carácter multifactorial caracterizado por la presencia de placas amiloides, ovillos neurofibrilares, reducción de la actividad colinesterasa, estrés oxidativo, entre otros mecanismos. A pesar de la inversión en investigación durante las últimas décadas, se considera que la investigación debe tomar nuevos enfoques, buscar nuevas dianas biológicas y desarrollar nuevos fármacos, es por ello que en este trabajo se realiza la búsqueda y caracterización de compuestos con actividad multi-diana a partir de productos naturales, teniendo en cuenta que estudios previos de los grupos de investigación demostraron la actividad biológica y el potencial neuroprotector de especies de la familia Rutaceae y particularmente las pertenecientes al género *Zanthoxylum* de la flora colombiana, las cuales poseen efectos antioxidantes, agonista de LXR e inhibidores de colinesterasas. El objetivo de este trabajo fue realizar una búsqueda de agentes neuroprotectores a partir de la especie *Z. caribaeum*. Inicialmente se obtuvo un extracto mediante maceración etanólica en frío de la raíz, posteriormente se determinaron el tipo de metabolitos presentes usando técnicas de coloración, se fraccionó el extracto usando cromatografía líquida al vacío (CLV), los compuestos se purificaron usando técnicas cromatográficas, se identificó la estructura química de los compuestos mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, se evaluó la capacidad antioxidante mediante el método DPPH, y protección del foto-blanqueo del β -caroteno, se evaluó la actividad inhibitoria de acetil y butiril colinestearasas mediante el método Ellman, se realizaron ensayos de viabilidad celular y neuro-protección por MTT, se evaluó la actividad agonista de LXR mediante el ensayo del gen reportero y se determinó la capacidad antiagregante de A β de los compuestos mediante un modelo *in vitro* de cinética de agregación del péptido

amiloide. Dentro de los resultados, se logró determinar en el extracto la presencia de metabolitos de tipo alcaloidal, fenólicos, aminas, entre otros. Tanto el extracto como algunas fracciones obtenidas, presentaron actividad agonista de LXR, actividad captadora de radicales libres, protección frente a la peroxidación lipídica y actividad inhibitoria de la butiril colinesterasa; de estas fracciones y mediante el aislamiento químico dirigido, se obtuvo el compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol, el compuesto 5,7 -dimetoxi-4H-cromen-4-ona, y una mezcla de esteroides que contiene estigmasterol y β -sitosterol. El compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol presentó actividad agonista de LXR, se observó efecto neuroprotector y actividad antiagregante de $A\beta$; el compuesto 5,7 -dimetoxi-4H-cromen-4-ona se reporta por primera vez en esta especie, presenta efecto neuroprotector y actividad antiagregante de $A\beta$; por su parte, la mezcla de esteroides estigmasterol y β -sitosterol presentó actividad agonista de LXR, efecto neuroprotector y actividad antiagregante de $A\beta$. Nuestros resultados nos permiten concluir que tanto las fracciones y compuestos aislados de *Z. caribaeum* presentan un potencial multifuncional para la terapéutica de la EA.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, *Zanthoxylum caribaeum*, Aislamiento químico biodirigido, multi funcional, LXR.

Abstract

SEARCH FOR ACTIVE PRINCIPLES WITH NEUROPROTECTIVE POTENTIAL FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE FROM A SPECIES OF THE GENER *Zanthoxylum caribaeum* (RUTACEAE)

Alzheimer's Disease (AD) is the most common dementia, a multifactorial neurodegenerative disorder characterized by the accumulation of amyloid plaques, neurofibrillary tangles, reduced cholinesterase activity, oxidative stress, among other mechanisms. Despite the investment in research during the last decades, it is considered that research must take new approaches, search for new biological targets and develop new drugs. Here we carry out the search and characterization of compounds with multifunctional activity from Ethanolic extract of *Z. caribaeum* roots. Previous studies of our research groups demonstrated the biological activity and neuroprotective potential of species of the Rutaceae family and particularly those belonging to the *Zanthoxylum* genus, which have antioxidant effects, LXR agonist activity and cholinesterase inhibitors. The aim of this work was the search for neuroprotective agents from *Zanthoxylum caribaeum*. Ethanolic extract of *Z. caribaeum* roots, was obtained by maceration. The kind of metabolites presents in the extract were determined using coloration assays, the fractionation was carried out using vacuum liquid chromatography (VLC). The compounds were purified by chromatographic techniques, the chemical structures were identified by spectroscopic and spectrometric techniques. The multifunctional potential of ethanolic extract roots, and fractions was determined by antioxidant capacity (DPPH method, and protection from photo-bleaching of β -carotene), inhibitory activity of cholinesterases (acetyl and butyryl cholinesterases), and LXR agonist effect (the gene-reporter assay). In the extract was detected the presence of alkaloidal, phenolic, amines metabolites. The extract and some fractions have LXR agonist activity, free radical scavenging activity, protection against lipid peroxidation, and butyryl cholinesterase inhibitory activity. The compound 10H-furan[3,2-a]carbazole, 5,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one, and a mixture of sterols containing stigmasterol and β -sitosterol were isolated and this multifunctional potential was determined by the LXR agonistic activity, Neuroprotective and the A β antiaggregating capacity in model in vitro of amyloid peptide aggregation kinetics

The compound 10H-furan [3,2-a] carbazole showed LXR agonist activity, neuroprotective effect and antiaggregant activity of A β ; the compound 5,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one is reported for the first time in this species and has a neuroprotective effect and antiaggregant

activity of A β . Stigmasterol and β -sitosterol presented LXR agonist activity, neuroprotective effect and A β antiaggregant activity. Our results allow us to conclude that both the fractions and compounds isolated from *Z. caribaeum* have multifunctional potential for therapeutics in AD.

Keywords: Alzheimer's disease, *Zanthoxylum caribaeum*, Bio-guided Chemical isolation, multifunctional, LXR.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIX
Introducción	1
1. Capítulo 1. Estado Actual del tema	5
1.1 Enfermedad de Alzheimer	5
1.2 Principales Hipótesis	7
1.2.1 Hipótesis Amiloide	7
1.2.2 Agregación Amiloide	9
1.2.3 Hipótesis Colinérgica	12
1.2.4 Hipótesis Tau	13
1.2.5 Hipótesis Neuroinflamatoria	16
1.2.6 Hipótesis de estrés oxidativo	19
1.2.7 Modelo de estrés oxidativo inducido por Paraquat (PQ)	22
1.3 Otros factores que influyen en la Enfermedad de Alzheimer	23
1.3.1 Receptores nucleares X del Hígado	23
1.4 Agentes terapéuticos Actuales	25
1.5 Terapia Multi – diana	28
1.6 Productos Naturales como fuente de agentes multifuncionales	29
1.6.1 Polifenoles	31
1.6.2 Alcaloides	32
1.6.3 Familia Rutácea	35
1.6.4 Especies del género <i>Zanthoxylum</i> como fuente de productos naturales con potencial multifuncional	48
2. Capítulo 2 – Caracterización fitoquímica preliminar y evaluación del efecto multifuncional del extracto etanólico de <i>Zanthoxylum caribaeum</i>	52
2.1 Materiales y Métodos	52
2.1.1 Materiales	52
2.1.2 Métodos	53
2.2 Análisis Estadístico	59
2.3 Resultados y discusión	59
2.3.1 Fraccionamiento y análisis preliminar del extracto etanólico de raíz de <i>Z. caribaeum</i>	59

2.3.2	Determinación de actividad Agonista de LXR del extracto de <i>Z. caribaeum</i> ..	62
2.3.3	Determinación de actividad antioxidante del extracto de <i>Z. caribaeum</i>	66
2.3.4	Determinación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de colinesterasas del extracto y fracciones.....	72
2.3.5	Purificación de las fracciones seleccionadas por su potencial multifuncional	77
3.	Capítulo 3 – Evaluación de la actividad biológica.....	87
3.1	Materiales y métodos	87
3.1.1	Ensayo de MTT	87
3.1.2	Ensayo de actividad del gen reportero	88
3.1.3	Ensayo de neuroprotección.....	89
3.1.4	Ensayo fluorométrico antiagregante de A β 42.....	89
3.1.5	Análisis estadístico	90
3.2	Resultados.....	91
3.2.1	Los metabolitos obtenidos del extracto de <i>Z caribaeum</i> presentan actividad neuroprotectora	91
3.2.2	Los metabolitos obtenidos del extracto de <i>Z. caribaeum</i> activan el receptor LXR	97
3.2.3	Los metabolitos obtenidos del extracto de raíz de <i>Z. caribaeum</i> presentan actividad antiagregante de A β	101
3.3	Análisis de resultados	104
4.	Conclusiones	113
5.	Recomendaciones.....	117
	Bibliografía	119

Lista de figuras

Figura 1.2.2-1: Modelo general representativo para la formación de fibrillas de amiloide mediante mecanismos dependientes de la nucleación (incluida la nucleación primaria y secundaria) y mecanismos independientes de la nucleación (ausencia de nucleación). k_{n1} , k_{n2} , k_{-} , k_{on} , k_{off} y k_{+} representan constantes de velocidad. La fase estacionaria implica el ensamblaje de protofibrillas en fibrillas de amiloide maduras con diferentes estructuras morfológicas y un alto nivel de polimorfismo. Tomado de: Almeida, Z. L., & Brito, R. M. (2020). Structure and aggregation mechanisms in amyloids. <i>Molecules</i> , 25(5), 1195	10
Figura 1.2.2-2: Compuestos naturales reportados con efecto antiagregantes del péptido A β . Modificado de: Pagano, K., Tomaselli, S., Molinari, H., & Ragona, L. (2020). Natural Compounds as Inhibitors of A β Peptide Aggregation: Chemical Requirements and Molecular Mechanisms. <i>Frontiers in Neuroscience</i>	11
Figura 1.3.1-1: Estructura química de la Tacrina	25
Figura 1.3.1-2: Estructura química del Donepezilo	26
Figura 1.3.1-3: Estructura química de la Rivastigmina	26
Figura 1.3.1-4: Estructura química de la Galantamina.....	27
Figura 1.3.1-5: Estructura química de la Memantina	27
Figura 1.3.1-1: Número de reportes por año:” Multi target Natural Products”. Fuente: Scopus	30
Figura 1.6.1-1: Polifenoles con potencial multifuncional.....	32
Figura 1.6.2-1: Alcaloides con potencial multifuncional	34
Figura 1.6.3-1: Flores actinomorfas.....	35
Figura 1.6.3-2: Corola tetrámera	36
Figura 1.6.3-3: Plantas herbáceas espinosas.....	36
Figura 1.6.3-4: Fruto variado, esquizocárpico.....	36
Figura 1.6.3-5: Arbustos Caducifolios	38
Figura 1.6.3-6: Tallos espinosos.....	38
Figura 1.6.3-7: Hojas opuestas paripinnadas.....	38
Figura 1.6.3-8: Estructura química de terpenos aislados de especies del género <i>Zanthoxylum</i>	39
Figura 1.6.3-9: Estructura química de la escopoletina.....	40
Figura 1.6.3-10: Estructura química del psoraleno	40
Figura 1.6.3-11: Estructura química de la Quercitrina	40
Figura 1.6.3-12: Estructura química de la procianidina	41

Figura 1.6.3-13: Estructura química de meridinol	41
Figura 1.6.3-14: Estructura química de la asarinina	42
Figura 1.6.3-15: Estructura química de benzofenantridinas aisladas de especies de <i>Zanthoxylum</i>	43
Figura 1.6.3-16: Estructura de alcaloides bencilisoquinolinicos aislados de <i>Z. quinduense</i>	44
Figura 1.6.3-17: Estructura de Alcaloides berberinicos aislados de especies de <i>Zanthoxylum</i>	45
Figura 1.6.3-18: Estructura de aporfinas aisladas de <i>Z. zanthoxyloides</i>	45
Figura 1.6.3-19: Estructura química de alcaloides quinolónicos aislados de especies de <i>Zanthoxylum</i>	46
Figura 1.6.3-20: Estructura química de alcaloides aislados en menor cantidad de especies de <i>Zanthoxylum</i>	47
Figura 1.6.4-1: Evaluación de la actividad agonista de los extractos frente a LXRB en el modelo generado de células HEK293.....	51
Figura 2.3.1-1: Comparación de los perfiles de HPLC de FZC1-FZC16.....	60
Figura 2.3.1-2: Análisis de las fracciones FZC1- FZC16 con reveladores específicos. Cromatoplacla revelada Cloruro férrico para determinación de fenoles (C+) Quercetina. Cromatoplacla revelada con cloranil en dioxano para la identificación de aminas primarias (C+) L- triptofano. Cromatoplacla Dragendorff para la determinación de alcaloides, (C+) Berberina, Cromatoplacla revelada con ninhidrina para la identificación de aminoácidos	60
Figura 2.3.2-1: Determinación de la viabilidad celular por MTT de las fracciones obtenidas.....	63
Figura 2.3.2-2: Determinación de la actividad agonista de LXR de las fracciones	65
Figura 2.3.3-1: Determinación del efecto captador de radicales libres del extracto de <i>Z. caribaeum</i> y las fracciones FZC1 A FZC16. A. Bioautografía con DPPH, (C+) Quercetina. B. Cromatoplacla fracciones FZC1 A FZC16 revelada con cloruro férrico. (C+) Quercetina C. Cromatoplacla fracciones FZC1 A FZC16 revelada con Dragendorff (C+) Berberina..	67
Figura 2.3.3-2: Actividad Captadora de radicales libres de las fracciones agonistas de LXR del extracto etanólico de <i>Z. caribaeum</i>	68
Figura 2.3.3-3: Determinación cualitativa del efecto protector de la peroxidación lipídica del extracto y las fracciones de <i>Z. caribaeum</i> . A. Bioautografía directa con β -Caroteno. B. Cromatoplacla revelada con $FeCl_3$	70
Figura 2.3.3-4: Evaluación de la actividad protectora de la peroxidación lipídica del extracto etanólico de <i>Z. caribaeum</i>	71
Figura 2.3.4-1: Análisis cualitativo del extracto y fracciones por el análisis de actividad inhibitoria de colinestearasas.	73
Figura 2.3.4-2: Evaluación de la actividad inhibitoria de acetilcolinestearasas a 100 ppm y 10 ppm	74
Figura 2.3.4-3: Evaluación de la actividad inhibitoria de butirilcolinestearasa a 100 ppm y 10 ppm	75

Figura 2.3.5-1: Diagrama de Obtención de los compuestos ZC1 a ZC3.....	77
Figura 2.3.5-2: Especto RMN ¹ H del compuesto ZC1	79
Figura 2.3.5-3: Especto RMN ¹³ C del compuesto ZC1	80
Figura 2.3.5-4: Compuesto ZC1: 10H-furano [3,2-a] carbazol	81
Figura 2.3.5-5: Especto RMN ¹ H del compuesto ZC2	82
Figura 2.3.5-6: Especto RMN ¹³ C del compuesto ZC1	83
Figura 2.3.5-7: Compuesto ZC2: 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona	83
Figura 2.3.5-8: Especto RMN ¹ H de ZC3	85
Figura 2.3.5-9: Especto RMN ¹³ C de ZC3.....	85
Figura 3.2.1-1: Viabilidad celular por el método de MTT del extracto y compuestos aislados de <i>Z. caribaeum</i>	91
Figura 3.2.1-3: Efecto neuroprotector del extracto de <i>Z. caribaeum</i> en líneas celulares SHSY5Y.	93
Figura 3.2.1-4: Efecto neuroprotector de 10H-furano [3,2-a] carbazol en líneas celulares SHSY5Y.	94
Figura 3.2.1-5: Efecto neuroprotector de 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona en líneas celulares SHSY5Y.	95
Figura 3.2.1-6: Efecto neuroprotector de la mezcla de esteroides en líneas celulares SHSY5Y	96
Figura 3.2.2-1: Efecto agonista del gen reportero de luciferasa de 10H-furano [3,2-a] carbazol en líneas celulares HEK293	98
Figura 3.2.2-2: Efecto agonista del gen reportero de luciferasa de 5,7-dimetoxi-4H- cromen-4-ona en líneas celulares HEK293	99
Figura 3.2.2-3: Efecto agonista del gen reportero de luciferasa de la mezcla de esteroides en líneas celulares HEK293	100
Figura 3.2.3-1: Cinética de agregación del péptido Aβ.....	101
Figura 3.2.3-2: Actividad antiagregante del compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol, analizado mediante el ensayo de detección por ThT.	102
Figura 3.2.3-3: Actividad antiagregante del compuesto 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona, analizado mediante el ensayo de detección por ThT.	103
Figura 3.2.3-4: Actividad antiagregante de la mezcla de esteroides, analizado mediante el ensayo de detección por ThT.	104

Lista de tablas

Tabla 1.6.4-1: Actividad inhibitoria de colinesterasas de extractos de especies del género <i>Zanthoxylum</i> . Tomado de (Plazas <i>et al.</i> , 2019).	49
Tabla 2.3.1-1: Análisis con reactivos de coloración seleccionados de FZC1-FZC16	62
Tabla 2.3.2-1: Concentraciones de trabajo obtenidas por MTT	64
Tabla 2.3.5-1: Datos de RMN ¹ H y ¹³ C ZC1	81
Tabla 2.3.5-2: Datos de RMN ¹ H y ¹³ C ZC2	84
Tabla 3.1.4-1: Reactivos de trabajo del ensayo antiagregante Aβ	90
Tabla 3.2.1-1: Concentraciones de trabajo obtenidas por MTT para el extracto y los compuestos aislados de <i>Z. caribaeum</i>	92
Tabla 3.2.2-1: Concentraciones de trabajo obtenidas por MTT para los compuestos aislados de <i>Z. caribaeum</i>	97

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>EA</i>	Enfermedad de Alzheimer
<i>QUIPRONAB</i>	Química de productos naturales vegetales bioactivos
<i>PN</i>	Productos naturales
<i>EOAD</i>	Early onset <i>alzheimer's</i> disease (Enfermedad de inicio temprano)
<i>LOAD</i>	Late onset <i>alzheimer's</i> disease (Enfermedad de inicio tardío)
<i>APP</i>	Proteína precursora amiloide
<i>PSEN 1</i>	Presenilina 1
<i>PSEN 2</i>	Presenilina 2
$A\beta$	Amiloide β
<i>GWAS</i>	Genome wide association study (Estudio de asociación del genoma completo)
<i>ADAM10</i>	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
<i>TREM 2</i>	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
<i>PLD3</i>	Phospholipase D3
<i>ApoE</i>	Apolipoproteína E
<i>LDL</i>	Low density lipoprotein (Lipoproteínas de baja densidad)
<i>HDL</i>	High density lipoprotein (Lipoproteínas de alta densidad)
<i>ROS</i>	Especies reactivas de oxígeno

Abreviatura	Término
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
BACE1	Proteasa β -secretasa
AICD	Fragmento intracelular
ADAM	A Disintegrin And Metallorpottease
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
ACh	Acetilcolina
AChT	Acetilcolinatransferasa
AChE	Acetilcolinesterasa
BChE	Butirilcolinestearasa
nAChR	Receptores nicotínicos
mAChR	Receptores Muscarínicos
SNC	Sistema nervioso central
S	Serina
T	Treonina
Y	Tirosina
O-GlcNAc	N-acetilglucosamina
PDPK	Proteínas quinasas dirigidas por prolina
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
Cdk5	Quinasa dependiente de ciclina 5
AMPK	Monofosfato de adenosina 5
CK1	Caseína quinasa 1
PKA	proteína quinasa dependiente de AMP cíclica A
DYRK-1A	Quinasa 1A de especificidad dual regulada por fosforilación de tirosina

Abreviatura	Término
TPK	Proteínas quinasas de tirosina
PHF	Filamentos pareados helicoidales
SF	Filamentos rectos
IGIV	Inmunoglobulina intravenosa
TLR	Receptores tipo Toll
DCL	Deterioro cognitivo leve
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos
MIP-1 α	Péptido inflamatorio de macrófagos
M-CSF	Colonia de macrófagos estimulante
LTP	Potenciación a largo plazo
NO	Óxido nítrico
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
GSH	Niveles de glutatión
HO ₂	Radical hidroperoxilo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
•OH	Radical hidroxilo
O ₃	Ozono
¹ O ₂	Oxígeno singlete
ROO•	Radicales peroxilo
RO•	Alcoxilo
SQ•	Semiquinona
CO ₃ •-	Carbonato
HOCl	Ácido hipocloroso
HOBr	Ácido Hipobromoso

Abreviatura	Término
HOI	Ácido Hipoyodoso
RNS	Especies de nitrógeno reactivo
NO ₂ •	Radical de dióxido de nitrógeno
NO ₂ ⁻	Nitrito
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
NOS	Óxido nítrico sintasa
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
RNs	Receptores nucleares
RXR	Receptor X Retinoide
LXR-RE	Elementos de respuesta a LXR
LXR	Receptores X del hígado
ABCG1	Proteínas transportadoras ABC de la subfamilia G
ATP	Adenosín trifosfato
NMDA	Receptores N-metil-D-aspartato
MTDL	ligandos multi-diana
PIB	Producto Interno Bruto
PKC	Proteína quinasa C
TRKS	Tirosin quinasas
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno

Abreviatura	Término
MCI	Mild cognitive impairment – Defecto cognitivo leve
PQ	Paraquat
ThT	Tioflavina T
FDA	Food and Drug Administration

Introducción

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo de carácter multifactorial considerado irreversible. La EA es la forma más común de demencia, representa alrededor del 60% del total de los casos y afecta principalmente a personas mayores de 65 años (Reitz *et al.*, 2011). Se estima que esta patología afecta a cerca de 50 millones de personas a nivel mundial, con una incidencia anual de 4 a 6 millones de nuevos casos (Alzheimers Disease International, 2018).

El costo a nivel mundial de la atención médica para pacientes con EA es cercano a los 600 billones de dólares por año, aproximadamente el 1% del PIB mundial (Tsukamoto, 2015). El alto impacto socioeconómico de la EA hace que esta patología sea considerada como un problema creciente de salud pública mundial (Sugino *et al.*, 2015). La encuesta nacional de salud mental en Colombia proyecta que la población adulta mayor en el año 2030 corresponderá al 23%; además, refiere que el 40% de los mayores de 65 años han presentado síntomas de demencia (Romero *et al.*, 2021). En nuestro país la información más reciente reportada por el ministerio de salud mediante el boletín de salud mental en 2017, documenta un aumento de la prevalencia de EA cercana al 9% anual teniendo en cuenta el número de casos atendidos de demencia hasta el 2015 (MinSalud, 2017).

Aunque las causas y mecanismos exactos de muerte neuronal en la EA no se conocen completamente, se ha logrado un gran avance en las últimas décadas en el entendimiento del proceso neurodegenerativo, lo que ha conllevado a reconocer algunos factores bioquímicos implicados en su etiología, entre los cuales encontramos procesos de glicoxidación, lipoxidación y oxidación de proteínas (Sayre *et al.*, 2001).

Sin embargo, muchos otros factores tanto exógenos como endógenos se han relacionado con las rutas desencadenantes de los procesos degenerativos y de la muerte masiva de neuronas colinérgicas (Calsolaro & Edison, 2016; Kepp, 2012; Swerdlow, 2007). Debido al desconocimiento de su etiología, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para la EA

constituye un gran reto. Actualmente, no existen terapias profilácticas ni curativas para la EA, los medicamentos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de esta patología son paliativos, disminuyen los síntomas en etapas tempranas de la enfermedad (Ansari & Khodagholi, 2013).

A pesar de los esfuerzos, se considera que la investigación debe tomar nuevos enfoques, se deben buscar nuevas dianas biológicas y desarrollar nuevos fármacos, lo cual requiere de un esfuerzo multidisciplinario. Nuestro enfoque consiste en la búsqueda y caracterización de agentes con actividad multi-diana para el tratamiento de la EA, lo cual es una tendencia que cada día toma mayor importancia, no solo para EA, sino para diferentes enfermedades complejas (Das & Basu, 2018; Macías, 2016). Una fuente importante de compuestos multi-diana son los productos naturales (PN), los cuales han sido ampliamente estudiados en el grupo de investigación “Química de productos naturales vegetales bioactivos” (QUIPRONAB) y el grupo de investigación en Muerte celular de la Universidad Nacional, quienes han venido trabajando en alianza desde hace más de cinco años con el fin de explorar el potencial de la flora colombiana como fuente de principios activos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. En uno de estos trabajos, a partir de un *screening primario* de actividad biológica se evaluó el potencial neuroprotector de algunas especies de la flora colombiana (Plazas *et al.*, 2018), se determinó que los extractos etanólicos de especies de la familia Rutaceae y particularmente las pertenecientes al género *Zanthoxylum* poseen efectos antioxidantes, e inhibidores de colinesterasas.

Teniendo en cuenta los resultados descritos anteriormente, y considerando algunas dianas moleculares involucradas en el tratamiento de la EA, tales como la Acetilcolinesterasa (AChE), Especies radicales de Oxígeno (ROS), Butirilcolinesterasa (BChE), Apolipoproteína E (APOE), LXR, entre otros, se han realizado diversos estudios, para identificar los potenciales blancos terapéuticos claves en la EA. Tanto ApoE como *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1* (ABCA1), son regulados por los *liver X receptors* (LXR), y se han convertido en un objetivo clave dentro del potencial multifuncional de los metabolitos presentes en las especies vegetales. Teniendo en cuenta lo mencionado, se realizó un *screening* del potencial agonista de LXR en especies del género *Zanthoxylum* determinando que el extracto etanólico de la especie *Zanthoxylum caribaeum* tiene actividad agonista de LXR (Valencia Rincón, 2017).

De acuerdo con lo anteriormente descrito, en esta investigación se determinó el potencial de la especie *Zanthoxylum caribaeum* como fuente de moléculas promisorias mediante la determinación del efecto agonista de LXR, inhibidor de colinesterasa, antioxidante, y neuroprotector, que puedan llegar a ser candidatos a ensayos posteriores más específicos para ser usados como alternativas terapéuticas de la enfermedad. El estudio realizado cuenta con tres capítulos distribuidos así: en el capítulo uno se hace una revisión de la EA, incluyendo las principales hipótesis y los agentes terapéuticos actuales, así como la descripción de la terapia multi-diana como estrategia de la búsqueda de opciones terapéuticas, y de los PN como fuente de metabolitos con potencial multifuncional.

El capítulo dos contiene la metodología y los resultados obtenidos en el *screening* fitoquímico con diferentes ensayos *in vitro*, con el objeto de determinar el potencial multifuncional de la especie, y relacionarlo con el tipo de núcleos presentes, y el procedimiento usado en la obtención de algunos compuestos activos. Finalmente, en el capítulo 3 se muestran los resultados de la evaluación *in vitro* de la actividad neuroprotectora del extracto etanólico y metabolitos aislados de la raíz de *Z. caribaeum*.

1. Capítulo 1. Estado Actual del tema

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA es un desorden neurodegenerativo de carácter multifactorial, caracterizado clínicamente por una pérdida progresiva de memoria, del reconocimiento de lugares y personas y capacidad de orientación (Reitz *et al.*, 2011; Warren, 2008). La EA se presenta de dos maneras, como una enfermedad esporádica o familiar. De acuerdo con esto se ha clasificado en dos grupos, el primer grupo es la EA de inicio temprano (EOAD del inglés: *early onset alzheimer's disease*) y la EA de inicio tardío (LOAD del inglés *late onset alzheimer's disease*). La EA de inicio tardío y de inicio temprano presentan síntomas y cambios histopatológicos similares; sin embargo, el último es generalmente más severo que el primero y se asocia con una tasa de progresión más rápida (Wolfender *et al.*, 2015).

La EOAD es causada por mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*, los cuales codifican para proteínas implicadas en el metabolismo amiloidogénico de APP. El gen *APP*, está localizado en el cromosoma 21 (21q21.3) y se encuentra constituido por 17 exones, codifica para una proteína la cual contiene entre 695 y 770 aminoácidos que participa como un regulador de los procesos de sinapsis y plasticidad neuronal. En relación con la EA se han descrito más de 50 mutaciones implicadas en su desarrollo (Beyer, 2002; Imbimbo *et al.*, 2005; Serrano, 2010).

El mecanismo propuesto para el papel de APP en el desarrollo de la EA se basa en un incremento en la tasa de proteólisis amiloidogénica de la proteína APP inicialmente por la β -secretasa y posteriormente por la γ -secretasa, para su subsiguiente acumulación y oligomerización de péptidos A β (Amiloide β), los cuales se depositan gradualmente como oligómeros formando posteriormente placas difusas (fibrillas y protofibrillas) con la consecuente activación de la microglía y los astrocitos (Hee *et al.*, 2017; O'Brien & Wong, 2011; Selkoe *et al.*, 2016).

El gen *PSEN1* codifica la proteína denominada presenilina 1, está localizado en el cromosoma 14 (región 14q23.3), se encuentra constituido por 12 exones. La función principal de la presenilina 1 es la proteólisis de diversas proteínas. Se han descrito más de 177 mutaciones implicadas en el desarrollo de la enfermedad, las cuales incrementan la función de γ -secretasa sobre APP, aumentando la producción de péptidos A β (Fernández-viadero *et al.*, 2013; Lladó *et al.*, 2010; Selkoe *et al.*, 2016).

El gen de *PSEN2*, está localizado en el cromosoma 1 (región 1q31-42) y se encuentra constituido por 12 exones; codifica para una proteína denominada presenilina 2, la cual tiene como función facilitar la proteólisis de diversas proteínas. Adicionalmente se ha postulado que su mecanismo en la EA se basa en un incremento de la función de γ -secretasa sobre APP, incrementando la producción de los péptidos A β (Fernández-viadero *et al.*, 2013; Selkoe *et al.*, 2016; Sonkusare *et al.*, 2005).

Respecto a LOAD, mediante estudios de GWAS se han descrito diferentes genes como factores de riesgo para el padecimiento de EA, confirmando el gen de ApoE previamente descrito, y otros como ADAM10 (A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10), TREM 2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2), PLD3 (Phospholipase D3), entre otros (W. Chen & Wang, 2015).

El gen que codifica la isoforma $\epsilon 4$ de APOE (ApoE4) produce el mayor riesgo genético de padecer la EA. El gen de *APOE* codifica para la proteína ApoE localizada en el cromosoma 19 (región 19q13) y se encuentra constituido por 4 exones (Swerdlow, 2007). APOE tiene 299 aminoácidos (Imbimbo *et al.*, 2005), su función principal es transportar lípidos a través de la formación de Lipoproteínas de alta densidad (del inglés *High density lipoprotein* (HDL)) en el cerebro (Liang *et al.*, 2004).

Se han descrito 3 isoformas ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) que difieren entre sí por sustituciones de dos residuos de aminoácidos “ApoE2 (Cys112, Cys158), ApoE3 (Cys112, Arg158), y ApoE4 (Arg112, Arg158)” (Beyer, 2002; Butterfield *et al.*, 2002; C. Liu *et al.*, 2013). Las variaciones

polimórficas de ApoE actúan como factores de riesgo heredados y afectan la susceptibilidad genética para LOAD (Beyer, 2002). En el caso del alelo $\epsilon 2$, esta isoforma presenta una disminución de su afinidad hacia sus receptores, mientras que ApoE4 se une preferencialmente a triglicéridos para formar lipoproteínas (Beyer, 2002; Reitz *et al.*, 2011), adicionalmente, el alelo $\epsilon 2$ parece ser un factor protector para LOAD, aunque esta protección no se observa en todos los pacientes que presenten este alelo (De-Almada *et al.*, 2012).

Desde la descripción de la EA, se han postulado diferentes hipótesis sobre su origen o que buscan explicar la demencia. La hipótesis más aceptada ha sido la hipótesis amiloide, sin embargo, otras hipótesis han llevado al desarrollo de terapias farmacológicas como la hipótesis colinérgica, que fue la primera en ser postulada en el año de 1982. Con base en esta, continuaron las investigaciones para determinar la causa de la EA, posteriormente, hacia el año de 1984 se describe la hipótesis amiloide, la cual sigue siendo la más aceptada al día de hoy. Posteriormente al desarrollo de estas hipótesis, se postula hacia el año de 1987 la hipótesis de Tau, las cuales, son consideradas las más vigentes. Adicionalmente, se han postulado otras hipótesis como la hipótesis de especies radicales de oxígeno (ROS), la hipótesis neuroinflamatoria, la hipótesis sobre el hipometabolismo de la glucosa, entre otras (Du *et al.*, 2018), las cuales serán definidas a continuación.

1.2 Principales Hipótesis

1.2.1 Hipótesis Amiloide

La hipótesis amiloide es el principal enfoque para el desarrollo de agentes terapéuticos en la actualidad. La hipótesis amiloide postula que el desequilibrio entre la producción y eliminación de péptidos A β ocasionan su acumulación, dando inicio a los eventos patogénicos característicos de la EA (Lichtenthaler & Haass, 2004). Las placas amiloides están compuestas principalmente por péptidos A β generados a partir del procesamiento proteolítico de APP tanto a nivel intracelular y más abundantemente a nivel extracelular. Los monómeros de A β forman oligómeros como dímeros, trímeros y tetrámeros, hasta formar grandes partículas llamadas protofibrillas, las cuales son insolubles. Los péptidos A β_{x-42} son las especies de A β más neurotóxicas (Karch & Goate, 2015), estimulan la producción de TNF α involucrada en respuestas proinflamatorias (Ekert *et al.*, 2018;

Sengupta *et al.*, 2016). Por su parte, los oligómeros de A β ejercen su toxicidad a través de una variedad de mecanismos que incluyen interacciones directas de la membrana con el receptor (Sengupta *et al.*, 2016).

APP es una proteína integral transmembrana de tipo I, se han descrito tres isoformas predominantes producidas por *splicing* diferencial, con 695, 751 y 770 aminoácidos. La isoforma APP695 se expresa exclusivamente en neuronas. A pesar de que las funciones de la APP no se conocen con exactitud, se han asociado con el crecimiento de las neuritas, el tráfico de proteínas en el axón, la señalización transmembrana, la adhesión celular y el metabolismo de calcio (Menendez-Gonzalez *et al.*, 2018).

El procesamiento proteolítico de la APP puede ocurrir mediante una vía amiloidogénica y una vía no amiloidogénica. En la vía amiloidogénica, la proteasa β -secretasa 1 (BACE1), realiza el primer corte de APP en el extremo N-terminal produciendo el fragmento sAPP β y un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos denominado (C99); posteriormente C99 es proteolizado en su región transmembrana por la γ -secretasa, produciendo los péptidos A β y del fragmento intracelular (AICD) (Imbimbo *et al.*, 2005).

Existen tres grupos principales de ensamblajes de A β , monómeros, oligómeros solubles y fibrillas insolubles que se han denominado 'agrupaciones de A β '. Cada grupo nuevamente abarca múltiples estructuras de agregación A β basadas en varias organizaciones (Goure *et al.*, 2014). Se ha reportado que los oligómeros A β solubles están organizados en diferentes estructuras que van desde dímeros (Walsh & Selkoe, 2007), trímeros, tetrameros (Chen & Glabe, 2006; Walsh & Selkoe, 2007), pentámeros, decameros (Ahmed *et al.*, 2010), ligandos difusibles derivados de A β (Hepler *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 1998), dodecameros y A β *56 (réplicas de trímeros A β) (Lesné *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2016).

Los oligómeros solubles tóxicos se identificaron en cerebros de pacientes AD, son distintos de los monómeros, y de los agregados superiores como las fibrillas, (Kayed *et al.*, 2003). Se ha sugerido que existe una correlación inversa entre el tamaño de los ensamblajes de A β y la potencia de su toxicidad ejercida. A medida que aumenta el tamaño del ensamblaje oligomérico, disminuyen sus efectos nocivos. Se ha evidenciado que las unidades

diméricas de A β son una entidad importante que proporciona los bloques de construcción para los agregados tóxicos (Donald *et al.*, 2016; Garzon-Rodriguez *et al.*, 2000; O'Nuallain *et al.*, 2010). También se observó que los oligómeros pueden formarse a partir de la nucleación secundaria (Cohen *et al.*, 2013). Estudios recientes han demostrado que hay al menos 2 tipos de oligómeros, siendo el tipo 1 relativamente más tóxico que el tipo 2 (P. Liu *et al.*, 2016), pero podría haber muchas más especies de oligómeros A β . Dodecameros y A β *56 parecen ser difusos en todo el tejido y ejercen efectos tóxicos en los cultivos (Sengupta *et al.*, 2016). La alta toxicidad de los oligómeros A β de bajo peso molecular también está respaldada por estudios *in vitro* que muestran que los dímeros A β son tres veces más tóxicos que los monómeros, y los tetrámeros son 13 veces más tóxicos (Sakono & Zako, 2010; Sheng *et al.*, 2015).

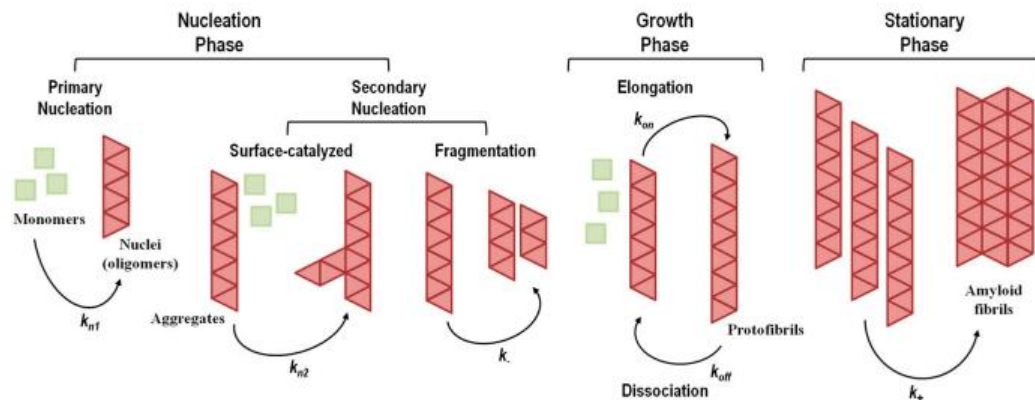
Por su parte, en la vía no amiloidogénica, el procesamiento proteolítico de APP comienza por α -secretasa produciendo un fragmento neuroprotector denominado sAPP α . Esta α -secretasa es un miembro de la familia de metaloproteasas ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*), la cual está encargada de dar lugar a la formación de péptidos solubles e impide la formación de las placas amiloides. La escisión α de la APP se puede inducir mediante la sobreexpresión de ADAM10 o mediante la activación de cascadas de segundo mensajero como por ejemplo la activación de receptores de factor de crecimiento epidérmico y muscarínico que incrementan la producción de sAPP por vías que involucran a la PKC, TRKS, MAPK y las quinasas reguladas por señales extracelulares (Allinson *et al.*, 2003; Cummings, 2002; Hardy & Selkoe, 2002; Lichtenthaler & Haass, 2004; Viola & Klein, 2015).

1.2.2 Agregación Amiloide

De acuerdo con la hipótesis amiloide, la agregación del péptido A β en oligómeros y fibrillas es un paso crítico en la EA, sin embargo, el mecanismo de agregación no se conoce detalladamente (Ikeda *et al.*, 2011). Existen múltiples vías y factores epigenéticos que regulan los mecanismos de agregación en los sistemas amiloides dependiendo de su estado de conformación, ya sean monómeros, fibrillas u oligómeros. Por tanto, se han descrito varios mecanismos de agregación y múltiples vías en función de la secuencia de proteínas, los estados conformacionales adoptados por el monómero amiloidogénico y las

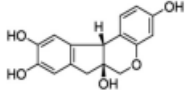
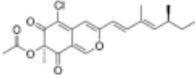
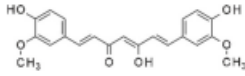
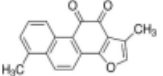
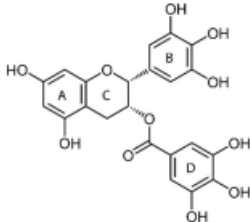
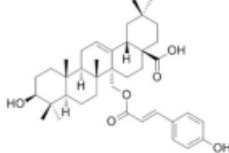
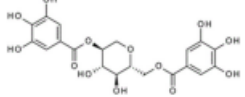
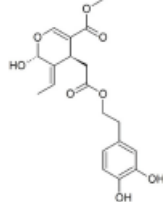
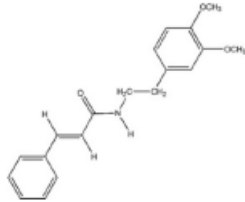
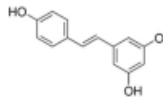
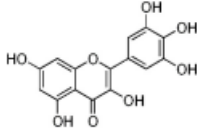
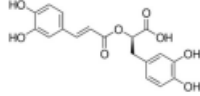
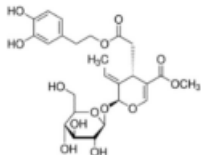
condiciones experimentales (por ejemplo, temperatura, pH y concentración de proteínas). Los procesos de agregación tienen lugar en un amplio rango de tiempo, abarcando varios órdenes de magnitud, con cambios conformacionales que ocurren en milisegundos y formación de partículas observables a simple vista en días, semanas o meses. En la Figura 1.2.2-1, se muestra el mecanismo de formación de amiloide dependiente de la nucleación, también conocida como polimerización por nucleación-elongación, la cual consta de tres pasos consecutivos: (1) retardo inicial o fase de nucleación; (2) fase de elongación, crecimiento, polimerización o fibrilación; (3) fase de equilibrio, estacionaria o de saturación (Almeida & Brito, 2020; Linse, 2019; Pagano *et al.*, 2020).

Figura 1.2.2-1: Modelo general representativo para la formación de fibrillas de amiloide mediante mecanismos dependientes de la nucleación (incluida la nucleación primaria y secundaria) y mecanismos independientes de la nucleación (ausencia de nucleación). k_{n1} , k_{n2} , k_{-} , k_{on} , k_{off} y k_{+} representan constantes de velocidad. La fase estacionaria implica el ensamblaje de protofibrillas en fibrillas de amiloide maduras con diferentes estructuras morfológicas y un alto nivel de polimorfismo. Tomado de: Almeida, Z. L., & Brito, R. M. (2020). Structure and aggregation mechanisms in amyloids. *Molecules*, 25(5), 1195



Diferentes reportes sobre estudios experimentales y computacionales en PN han identificado distintos tipos de compuestos con actividad antiagregante $A\beta$ (Figura 1.2.2-2) (Pagano *et al.*, 2020).

Figura 1.2.2-2: Compuestos naturales reportados con efecto antiagregantes del péptido A β . Modificado de: Pagano, K., Tomaselli, S., Molinari, H., & Ragona, L. (2020). Natural Compounds as Inhibitors of A β Peptide Aggregation: Chemical Requirements and Molecular Mechanisms. *Frontiers in Neuroscience*

Natural product	Chemical structure	Natural product	Chemical structure
Brazilin		Sclerotiorin	
Curcumin		Tanshinone	
Epigallocatechin gallate		Uncarinic acid C	
Ginnalin A		Oleuropein aglycone	
Wgx-50		Resveratrol	
Myricetin		Rosmarinic acid	
Oleuropein			

1.2.3 Hipótesis Colinérgica

La hipótesis colinérgica asocia el deterioro cognitivo y conductual con los bajos niveles de acetilcolina (ACh) y la pérdida de neuronas hipocampales colinérgicas. La ACh es un importante neurotransmisor utilizado por las neuronas colinérgicas que ha estado involucrado en procesos fisiológicos críticos, como la atención, el aprendizaje, la memoria, la respuesta al estrés, la vigilia, el sueño y la información sensorial (Du *et al.*, 2018). El daño de las neuronas colinérgicas se consideró un cambio patológico crítico que se correlacionaba con el deterioro cognitivo en la EA. La reducción de ACh se debe a un desbalance entre la enzima acetilcolintransferasa (AChT) que sintetiza el neurotransmisor y la tasa de degradación mediada por colinesterasas Acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE). Lo cual desencadena una hipofunción colinérgica que se ve reflejada en déficits de los diferentes marcadores colinérgicos como los receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR) (Schliebs & Arendt, 2011).

El término colinérgico se refiere a aquellos receptores que responden al transmisor acetilcolina y son en su mayoría parasimpáticos. Hay dos tipos de receptores colinérgicos, clasificados según sean estimulados por la nicotina o por la muscarina. Dentro del SNC, el hipocampo, la corteza y el tálamo tienen altas densidades de receptores muscarínicos (Prashant *et al.*, 2013; Whitehouse & Au, 1986). Se unen a la acetilcolina para transducir señales en el SNC, ganglios autónomos, músculos lisos y órganos parasimpáticos. Los receptores de acetilcolina muscarínicos son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G que se expresan y regulan la función de las neuronas, el músculo cardíaco y liso, las glándulas y muchos otros tipos de células y tejidos. Estos receptores poseen siete dominios transmembrana y sitios de glicosilación, fosforilación, modificación de lípidos e interacción con proteínas G transductoras de señales (Bourin & Dailly, 2003).

El SNC controla en gran parte la liberación de neurotransmisores desde sitios presinápticos. El receptor recibe el nombre de acetilcolínico nicotínico porque es estimulado por la acetilcolina, un neurotransmisor y por la nicotina, un alcaloide (Goodman & Gilman, 2006). Los nAChR están involucrados en funciones cognitivas complejas y variadas, como la atención, el aprendizaje, la consolidación de la memoria, la excitación y

la percepción sensorial. Generalmente se cree que la mayoría de estos efectos se deben a nAChR presinápticos, sin embargo, los receptores postsinápticos también juegan un papel importante, como lo demuestra su control de la transmisión ganglionar y la transmisión colinérgica rápida, en el hipocampo y la corteza sensorial. Los nAChR pueden estar involucrados en los mecanismos inhibitorios y desinhibidores de la corteza cerebral humana y en el hipocampo de la rata. (Bourin & Dailly, 2003; Whitehouse & Au, 1986)

Las colinesterasas son las enzimas encargadas de finalizar la neurotransmisión colinérgica a través de la hidrólisis de la acetilcolina en acetato y colina. Mediante un impulso nervioso, la ACh es liberada de la neurona al espacio sináptico donde será reconocida por los receptores nicotínicos y muscarínicos, responsables de transmitir la señal. Aunque en el funcionamiento normal del cerebro, la AChE es el principal responsable de la hidrólisis del neurotransmisor, se ha demostrado que, durante el progreso de la EA, la actividad de esta disminuye mientras que la de BChE aumenta gradualmente (Lane *et al.*, 2006).

Posteriormente, la colina es recaptada vía endocitosis por la neurona presináptica y reutilizada para sintetizar el neurotransmisor a partir de coenzima A y la ATP (Macías, 2016; Schliebs & Arendt, 2011). Los estudios sobre BChE, señalan que su aumento se da para suplir el rol catalítico de AChE y de esta forma mantener la transmisión neuronal. La BChE tiene influencia sobre la modulación del control motor, la conciencia, la cognición y el comportamiento por la regulación del nivel de acetilcolina. Por lo tanto, las dos enzimas son consideradas blancos moleculares promisorios o potenciales para la búsqueda de agentes capaces de restaurar la función colinérgica (Carvajal & Inestrosa, 2011). La AChE es una proteína atractiva para el diseño racional de medicamentos y para el descubrimiento de inhibidores de ACh (Ahmed & Gilani, 2009; Kim *et al.*, 2013).

1.2.4 Hipótesis Tau

El gen *TAU* constituido por 16 exones está localizado en el cromosoma 17 (región 17q21), codifica para las seis isoformas de la proteína Tau generadas por *splicing* alternativo, Tau tiene como función principal la estabilización de microtúbulos, incluyendo los axonales a través de la interacción con la tubulina para estabilizar el citoesqueleto neuronal. La proteína se localiza principalmente en los axones del SNC (Kametani & Hasegawa, 2018; Kocahan & Do, 2017; Mandelkow & Mandelkow, 2012).

El mayor interés en Tau proviene de su agregación en EA y otras tauopatías, se ha sugerido que Tau es la causa de la EA llevando al desarrollo de la hipótesis Tau, sin embargo, los detractores sugieren que la fosforilación irregular de Tau es una consecuencia de los procesos de la enfermedad y no son la causa (Mandelkow & Mandelkow, 2012; Sanabria-Castro & Monge-Bonilla, 2017).

En la EA se ha descrito que la proteína Tau sufre varias modificaciones, entre ellas la fosforilación, la monometilación de arginina, la acetilación de lisina, la monometilación de lisina, la dimetilación de lisina, la ubiquitilación de lisina y la serina, modificación de N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) unida a O₂, siendo la fosforilación, la más representativa en la EA (Du *et al.*, 2018). Se han descrito una variada cantidad de proteínas quinasas de Tau, que se pueden subdividir en tres clases: proteínas quinasas dirigidas por prolina (PDPK) como lo son la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina 5' (AMPK). Por otro lado, están las proteínas quinasas no PDPK como lo son la Caseína quinasa 1 (CK1), la proteína quinasa A (PKA) y la quinasa 1A de especificidad dual regulada por fosforilación de tirosina (DYRK-1A) y por último las proteínas quinasas de tirosina (TPK) (Iqbal *et al.*, 2005; Johnson & Stoothoff, 2004; Z. Liu *et al.*, 2015; Stoothoff & Johnson, 2005).

La fosforilación de la proteína Tau es un proceso metabólico normal, crítico para controlar la unión de Tau a los microtúbulos, y está en curso dentro del cerebro en todo momento. (Sanabria-Castro & Monge-Bonilla, 2017). La fosforilación de Tau parece representar una de las etapas patógenas más críticas de la tauopatía; por lo tanto, las quinasas y las fosfatasas involucradas en la hiperfosforilación y la desfosforilación de Tau representan objetivos enzimáticos de la terapia anti-Tau (Giacobini & Gold, 2013). La fosforilación es un proceso de adición de grupos fosfato en los aminoácidos, es la modificación postraduccional más común de la proteína Tau, que afecta su solubilidad, localización, función, interacción con los socios y susceptibilidad a otras modificaciones postraduccionales (Iqbal *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2013; Stoothoff & Johnson, 2005).

Debido a su carácter hidrófilo, Tau no adopta la estructura plegada compacta típica de la mayoría de las proteínas citosólicas. La agregación patológica de Tau es baja dada su alta solubilidad, pero puede ser segmentada por motivos hidrófobos cortos que forman estructuras β (Kocahan & Do, 2017; Mandelkow & Mandelkow, 2012; Sabbagh & Dickey, 2016; Swerdlow, 2007). Se han descrito dos funciones principales de Tau, las cuales son su capacidad para promover el ensamblaje y mantener la estructura de los microtúbulos. La Tau polimerizada en ovillos neurofibrilares es aparentemente inerte y no se une a la tubulina ni promueve su ensamblaje en microtúbulos, hasta el 40% de la Tau anormalmente hiperfosforilada en el cerebro EA está presente en el citosol y se polimeriza en filamentos helicoidales emparejados. La Tau citosólica anormalmente hiperfosforilada no se une a la tubulina y promueve el ensamblaje de los microtúbulos, sino que inhibe el ensamblaje y altera los microtúbulos (Castellani *et al.*, 2019; Iqbal *et al.*, 2005; Sanabria-Castro & Monge-Bonilla, 2017).

La proteína Tau tiene 85 sitios putativos de fosforilación de serina (S), treonina (T) y tirosina (Y), entre los cuales, 28 muestran susceptibilidad de ser fosforilados exclusivamente en cerebros con EA, 16 sitios se encuentran fosforilados tanto en EA como en cerebros de control, 31 sitios putativos están fosforilados en condiciones fisiológicas y 10 son sitios de fosforilación supuesta sin una quinasa identificada (Martin *et al.*, 2013).

En la EA, la proteína Tau cerebral es de tres a cuatro veces más hiperfosforilada que la Tau cerebral adulta normal y en este estado hiperfosforilado se polimeriza en filamentos helicoidales emparejados (PHF) mezclados con filamentos rectos (SF) formando nudos neurofibrilares. La Tau anormalmente hiperfosforilada en el cerebro con EA se distingue de la Tau hiperfosforilada transitoriamente por su capacidad de secuestrar Tau normal, MAP1 y MAP2 e interrumpir los microtúbulos, y auto-ensamblarse en PHF/SF. La proteína Tau citosólica anormalmente hiperfosforilada, debido a la oligomerización, a diferencia de la tau normal, es sedimentable y al auto-ensamblarse en PHF/SF, pierde su capacidad de secuestrar MAP normales (Iqbal *et al.*, 2005). La Tau puede estar hiperfosforilada y puede agregarse como depósitos fibrilares detectables en los tejidos, tanto en el envejecimiento como en la enfermedad neurodegenerativa. La hipótesis de que p-Tau es neurotóxico ha provocado construcciones relacionadas con isómeros, oligómeros, y el "prión Tau" (Sanabria-Castro & Monge-Bonilla, 2017).

En la EA, se observa la presencia de ovillos neurofibrilares, que son agregados proteicos intracelulares de la proteína Tau en una forma hiperfosforilada (Dumont & Beal, 2011; Swerdlow, 2007). En condiciones patológicas, la agregación de Tau deteriora los axones neuronales causando neurodegeneración. El aumento de la hiperfosforilación de Tau conlleva a que la proteína sea propensa a su agregación, reduzca su afinidad por los microtúbulos, altere el funcionamiento del transporte axonal y, por lo tanto, influya en la plasticidad neuronal (Du *et al.*, 2018).

Las estrategias para modular a Tau implican el bloqueo de su agregación, estabilización de microtúbulos, regulación e inhibición de quinasas y fosfatasas que gobiernan las modificaciones de Tau. Sin embargo, la mayoría de estos esfuerzos han fallado en ensayos clínicos. El bloqueador de la agregación de Tau, TRx0237 mostro beneficios en los ensayos de fase III. En cuanto al tratamiento con vacunas activas dirigidas a Tau (ACI35 y AADvac-1) y las vacunas pasivas (RG6100 y ABBv-8E12) se encuentran actualmente en ensayos clínicos de fase I y II. La inmunoglobulina intravenosa (IGIV), es la única vacuna pasiva en los ensayos clínicos de fase III, sin embargo, no logró alcanzar los niveles de eficacia en pacientes con EA leve a moderada. En general, las terapias dirigidas a Tau siguen siendo difíciles debido a la comprensión incompleta de la EA, la falta de biomarcadores robustos y sensibles para el diagnóstico y el monitoreo de la respuesta, y la obstrucción de la barrera hematoencefálica (Du *et al.*, 2018).

1.2.5 Hipótesis Neuroinflamatoria

La evidencia creciente sugiere que la patogénesis de la EA no se limita únicamente a las poblaciones neuronales, sino que incluye mecanismos inmunológicos en el cerebro. Las proteínas mal plegadas y agregadas se unen a receptores de reconocimiento de patrones en microglía y astrogía, las cuales desencadenan una respuesta inmune innata caracterizada por la liberación de mediadores proinflamatorios, que contribuyen a la progresión de la patología. Recientes análisis de GWAS sugieren que varios genes que aumentan el riesgo de EOAD, codifican factores que regulan el catabolismo glial de proteínas mal plegadas y la reacción inflamatoria. Es probable que los factores externos, como la inflamación sistémica y la obesidad, interfieran con los procesos inmunológicos

del cerebro y promuevan la progresión de la enfermedad (Calsolaro & Edison, 2016; Heneka *et al.*, 2015).

La neuroinflamación se está reconociendo como un proceso complejo que tiene aspectos beneficiosos y saludables en el mantenimiento de la homeostasis cerebral y la resolución de lesiones; pero también puede ser perjudicial si se mantiene de forma crónica durante años y décadas, en cuyo caso las vías inmunes cerebrales activadas pueden causar debilitamiento o muerte a tejidos sanos, colaterales a sitios de lesión o daño histológico (por ejemplo, placas amiloides y Ovillos neurofibrilares (NFT del inglés *Neurofibrillary tangles*)) (Heneka *et al.*, 2015).

Los astrocitos y las células microgliales constituyen las poblaciones celulares implicadas en la respuesta inflamatoria en el SNC. Las células microgliales son los macrófagos residentes del SNC; estos representan alrededor del 10% de la población del SNC y desempeñan un papel crucial, no solo en la neurogénesis, la plasticidad neuronal y la regeneración, sino también como una primera línea de defensa inmune en caso de cualquier tipo de lesión cerebral (Ardura-Fabregat *et al.*, 2017; Calsolaro & Edison, 2016). En la EA, hay un punto de inflexión a lo largo de su evolución fisiopatológica donde las células gliales mantienen una respuesta inflamatoria sobre-expresada que se sinergia con la acumulación de A β y tau, e impulsa la sinaptotoxicidad y la neurodegeneración de una manera autorreforzada (Hampel *et al.*, 2020).

Adicionalmente, las células microgliales presentan la capacidad de fagocitar productos tóxicos, liberar factores citotóxicos y pueden ser células presentadoras de antígeno. En ausencia de estímulos extraños, las células microgliales se encuentran en estado de "reposo" o inactivadas; sin embargo, con una morfología ramificada, la microglía puede escanear regiones cercanas y su entorno sin interferir con las neuronas y las actividades neuronales y puede monitorear todo el parénquima cerebral cada pocas horas. Cuando se activan, pasan por cambios morfológicos, convirtiendo su forma en ameboide activada y móvil, capaces de llegar al sitio de la lesión (Ardura-Fabregat *et al.*, 2017; Calsolaro & Edison, 2016).

Revisiones recientes sugieren que la microglía activada puede cumplir funciones de protección a través de la eliminación de placas amiloides nacientes. La microglía portadora

de receptores tipo Toll (TLR), fagocitan eficientemente A β , mientras que la microglía negativa para TLR no tiene esta actividad (Heneka *et al.*, 2015).

Los estudios de GWAS muestran que diferentes variantes genéticas están relacionadas potencialmente con los procesos de neuroinflamación tales como TREM2, CD33, PILRA, CR1, MS4A, CLU, ABCA7, EPHA1 y HLA-DRB5-HLA-DRB1. La mayoría de estos genes están involucrados en procesos de señalización intracelular proinflamatoria, renovación celular, la actividad sináptica, metabolismo de los lípidos y el tráfico de vesículas. Los estudios proteómicos indican que una gran cantidad de vías moleculares aberrantes interconectadas, activadas y perpetuadas por TNF- α , TGF- β , IL-1 β y la proteína receptora TREM2, están involucradas en los procesos de neuroinflamación (Hampel *et al.*, 2020).

La neuroinflamación en la EA, en lugar de ser un simple espectador activado por placas seniles emergentes y ovillos neurofibrilares, contribuye tanto o más a la patogénesis como las placas y los ovillos en sí mismos. Esto se evidencia mediante la expresión de genes de los receptores inmunes, incluidos TREM2 y CD33, los cuales están asociados con la EA. El análisis de las manifestaciones clínicas que preceden a la EA, como el deterioro cognitivo leve (DCL), sugieren también una implicación temprana y sustancial de la inflamación en la patogénesis de la enfermedad (Heneka *et al.*, 2015).

Las citocinas contribuyen a casi todos los aspectos de la neuroinflamación, incluidos los procesos pro y antiinflamatorios, las lesiones neuronales, la quimioatracción y la respuesta de la microglía a los depósitos de A β . El aumento de A β en ratones transgénicos TgAPPsw y PSAPP envejecidos se asocia con el aumento de la liberación de citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-6, IL-1 α y GM-CSF (Heneka *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2005). Esta observación sugiere que la acumulación de A β es un factor clave que impulsa las respuestas neuroinflamatorias en EA. Además, la exposición de microglía a A β ₁₋₄₂ incrementa la liberación de citocinas proinflamatorias (es decir, pro-IL-1 β , IL-6, TNF- α), péptido inflamatorio de macrófagos (MIP-1 α) y colonia de macrófagos -estimulante (M-CSF) (Lue *et al.*, 2001). Además, los niveles de MCSF en el plasma y el SNC de los pacientes con EA están significativamente elevados en comparación con los controles

sanos de la misma edad o los pacientes con deterioro cognitivo leve (Heneka *et al.*, 2015; Laske *et al.*, 2010).

Existen múltiples evidencias que sugieren que el ambiente proinflamatorio presente en el cerebro con EA y en modelos de amiloidosis cerebral en ratones transgénicos asume niveles perjudiciales. Por ejemplo, el riesgo de transición de MCI a EA es mayor en sujetos con presencia elevada de CSF de la citocina proinflamatoria TNF- α y niveles disminuidos de TGF- β antiinflamatorio (Tarkowski *et al.*, 2003). IL-1 β , TNF- α y otras citocinas pueden afectar la función neuronal incluso antes de conducir a cambios estructurales, como lo demuestra la supresión de LTP de la transmisión sináptica. Las interacciones múltiples, así como la expresión elevada de citocinas / quimiocinas adicionales y receptores inmunes innatos, favorecen un estado de activación similar al fenotipo clásico proinflamatorios en la EA (Heneka *et al.*, 2015).

1.2.6 Hipótesis de estrés oxidativo

El estrés oxidativo, es un desequilibrio entre los procesos bioquímicos que conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la cascada antioxidante celular, causa alteraciones moleculares que conducen a la falla de las funciones biológicas y, en última instancia, la muerte celular. Todos los organismos aeróbicos producen al menos niveles mínimos de ROS, principalmente derivados de la producción secundaria de superóxido durante la reducción de oxígeno molecular por las mitocondrias. Además, el H₂O₂, producido por las oxidasas como la monoaminoxidasa, puede provocar una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo en los tejidos enriquecidos con estas enzimas. En los últimos años, el aumento en la investigación sobre el óxido nítrico (NO) como un segundo mensajero en neurotransmisión y señalización ha mostrado que el NO es liberado enzimáticamente por la microglía activada, junto con el superóxido (Sayre *et al.*, 2001).

Los radicales libres son especies químicas con un electrón no apareado y se forman durante los procesos fisiológicos y patológicos. Aunque las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un papel fundamental en varias vías celulares y de señalización en concentraciones fisiológicas (regulación del ciclo celular, fagocitosis y activación de enzimas), la generación excesiva de ROS provoca varios efectos dañinos, incluidos el daño a los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas (Manoharan *et al.*, 2016).

El sistema nervioso es particularmente vulnerable a los efectos nocivos de ROS y las especies reactivas de nitrógeno (NRS), ya que tiene mayor cantidad de oxígeno para producir energía, adicionalmente, el cerebro contiene altas concentraciones de PUFA (Ácidos grasos poliinsaturados) que son altamente susceptibles a la peroxidación lipídica. De hecho, las placas seniles y los ovillos neurofibrilares se asocian directamente con el daño oxidativo en la EA, ya que estos péptidos pueden producir ROS (Du *et al.*, 2018).

Las ROS son moléculas reactivas que contienen oxígeno que se generan por estrés oxidativo. Un nivel moderado de ROS es crítico en los mecanismos de defensa celular para luchar contra agentes extraños, y desencadena la activación de vías de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) modulando ciclo celular, expresión génica, supervivencia celular y apoptosis (Patten *et al.*, 2010; Veal & Day, 2011). En condiciones fisiológicas normales, las células producen pequeñas cantidades de ROS, y los niveles de ROS están equilibrados por varios sistemas antioxidantes. El desequilibrio entre la generación de ROS y la defensa antioxidante provoca la acumulación excesiva de ROS, conllevando al estrés oxidativo (Dasuri *et al.*, 2013). En resumen, el estrés oxidativo representa una amenaza significativa para el cerebro, debido a su alta demanda de oxígeno, a la abundancia de los metales redox-activos (hierro o cobre), a los ácidos grasos poliinsaturados (sustratos para la peroxidación de lípidos) y a la deficiencia de los niveles de glutatión (GSH) (Haque *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2015; Wang & Michaelis, 2010)

Las ROS se generan tras la reducción de O_2 , y consisten en radicales libres y especies no radicales. En particular, las ROS que desempeñan funciones críticas en el sistema biológico incluyen radicales anión superóxido (O_2^- u $O_2^{\bullet-}$), radical hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\bullet OH$), ozono (O_3) y oxígeno singlete ($1O_2$). Además, ROS también incluyen los radicales peroxilo (ROO^{\bullet}), alcoxilo (RO^{\bullet}), semiquinona ($SQ^{\bullet-}$) y carbonato ($CO_3^{\bullet-}$), junto con los ácidos hipocloroso ($HOCl$), hipobromoso ($HOBr$) y hipoiodoso (HOI). Algunas de las especies de nitrógeno reactivo (RNS), que contienen un átomo de oxígeno, también se consideran como uno de estos tipos, como el radical de óxido nítrico (NO o NO^{\bullet}), radical de dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}), nitrito (NO_2^-) y peroxinitrito ($ONOO^-$) (Haque *et al.*, 2019)

Generalmente considerado como el principal instigador del daño por estrés oxidativo, el radical hidroxilo reacciona de manera no discriminatoria con todas las biomacromoléculas a velocidades controladas por difusión, es decir, dentro de distancias de nm desde su sitio de generación. El radical hidroxilo puede ser producido por la radiación gamma, pero es más comúnmente generado fisiológicamente por la reacción de Fenton entre metales de transición reducidos (generalmente hierro (II) o cobre (I)) y H_2O_2 (Cheignon *et al.*, 2018; Sayre *et al.*, 2001). Estudios extensos señalaron el papel del anión superóxido, el radical hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico en la neurodegeneración mediada por estrés oxidativo en la EA (Manoharan *et al.*, 2016).

Por otro lado, otro radical involucrado es el óxido nítrico. El óxido nítrico (NO) se sintetiza a partir de L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS); en los tejidos, la NOS se producen en tres isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). En el cerebro, están presentes las tres isoformas de NOS, Particularmente iNOS y eNOS se expresan de manera inusual en la EA, especialmente en asociación con depósitos de $A\beta$. El aumento de la deposición de $A\beta$ da como resultado un aumento de la expresión de mRNA y proteínas de iNOS y la generación de NO. El NO puede interactuar rápidamente con el anión superóxido O_2^- formando un peroxinitrito más reactivo (ONOO⁻). ONOO⁻ puede inducir la peroxidación lipídica y alteraciones funcionales en las proteínas y los ácidos nucleicos, lo que eventualmente lleva a la muerte neuronal (Asiimwe *et al.*, 2016).

Se ha observado que las células tienen mecanismos de regulación y reparación del daño oxidativo. Estos mecanismos incluyen la producción de moléculas antioxidantes y enzimas, como la glutatión peroxidasa. Sin embargo, el cerebro tiene un sistema antioxidante relativamente deficiente, lo que explica su susceptibilidad al daño oxidativo (Cardoso *et al.*, 2010; Christen, 2018).

Se sabe que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de una serie de enfermedades, en particular, está relacionado con la etiología de la EA. Se han detectado elevados niveles de ROS en cerebros de pacientes con EA por lo que se ha asociado la patología al estrés oxidativo. Se ha observado aumento de la oxidación de proteínas, nitración de proteínas, glicoxidación y peroxidación de lípidos, asociado a la acumulación de $A\beta$, que a su vez incrementan el estrés oxidativo (Christen, 2018; Du *et al.*, 2018).

En la EA se ha evidenciado que las placas A β forman agregados ricos en iones metálicos de cobre, hierro o zinc. Los iones metálicos activos redox, como por ejemplo el cobre, pueden catalizar la producción de ROS en presencia de A β , incrementando los niveles del radical hidroxilo que es el más reactivo, aumentando el daño oxidativo tanto en el péptido A β como en las moléculas circundantes (proteínas, lípidos, entre otros) (Cheignon *et al.*, 2018). Adicionalmente, el estrés oxidativo activa la actividad de la β -secretasa (BACE), la cual se encuentra involucrada en el procesamiento de APP a A β ; lo anterior sugiere que la amiloidosis en la EA es un evento secundario (Tamagno *et al.*, 2002).

La evidencia del estrés oxidativo generalizado en la EA son las observaciones del aumento de la oxidación del ARN, el aumento de la oxidación del ADN y la disminución de la reparación en el líquido cefalorraquídeo, y el aumento de la peroxidación lipídica, como se evaluó recientemente mediante la medición de isoprostanos, productos no enzimáticos de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Sayre *et al.*, 2001).

1.2.7 Modelo de estrés oxidativo inducido por Paraquat (PQ)

El PQ (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo), es un herbicida que, debido a su bajo costo, rápida acción y a sus características medioambientales es uno de los más usados en el mundo. El principal mecanismo de toxicidad de la exposición al PQ es la inducción de estrés oxidativo y daño mitocondrial, un mecanismo de toxicidad común provocado por muchas toxinas ambientales y pesticidas (Drechsel & Patel, 2008). También se cree que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial desempeñan un papel fundamental en la patogenia de la EA (Lin & Beal, 2006). Por lo tanto, los modelos experimentales de exposición al PQ podrían ser útiles no solo para validar el papel de la exposición a pesticidas en la patogénesis de la EA, sino también para estudiar los mecanismos de la enfermedad de la EA (Rhee, 2006).

Su mecanismo de acción tóxica, radica en ser reducido enzimáticamente en la cadena respiratoria, principalmente por la NADPH-citocromo P450 reductasa, la NADH ubiquinina oxidoreductasa (complejo I), la xantina oxidasa (XO), y la óxido nítrico sintetasa (NOS) para formar un radical libre de PQ \cdot más NADP $^+$. El PQ \cdot es rápidamente re-oxidado en

presencia de O_2 originándose el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Por lo tanto, el PQ juega un papel catalítico en este proceso redox, generando O_2 a expensas de NADPH. Éste a continuación dirige la formación de otras ROS, principalmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediada por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), y radical hidroxilo (HO) a través de la reacción de Fenton, en presencia de metales (Fe^{++} y Cu^{++}). Estos radicales libres producirán efectos deletéreos en la célula (Blanco-Ayala *et al.*, 2014).

En condiciones normales, la mayor parte del H_2O_2 celular es producido por las mitocondrias. Se implicó que el aumento de la generación mitocondrial de H_2O_2 era importante para la patogénesis de la EA (Du *et al.*, 2008; Manczak *et al.*, 2006). Además, se demostró que el PQ aumenta la producción de H_2O_2 por parte de las mitocondrias cerebrales (Castello *et al.*, 2007; L. Chen *et al.*, 2012).

Varios estudios que tienen en cuenta el estrés oxidativo como principal mecanismo de toxicidad inducida por PQ sugieren una terapia antioxidante como alternativa viable, de hecho, se ha demostrado que los antioxidantes naringina, silimarina, extracto de *Bathysa cuspidata*, ácido alfa-lipoico, quercetina, C-ficocianina, bacósidos y vitamina C pueden ser útiles en el tratamiento contra la toxicidad inducida por PQ (Blanco-Ayala *et al.*, 2014). Los principales mecanismos implicados en el efecto protector de estos antioxidantes incluyen la reducción del estrés oxidativo, la inflamación, y la inducción de defensas antioxidantes.

1.3 Otros factores que influyen en la Enfermedad de Alzheimer

1.3.1 Receptores nucleares X del Hígado

La superfamilia de receptores nucleares (RNs) son un grupo de proteínas relacionadas filogenéticamente que comparte propiedades estructurales (Robinson-rechavi, 2003; Sever & Glass, 2013). Los RNs son factores transcripcionales activados por pequeños ligandos que regulan la expresión de un gran número de genes de forma dependiente del tipo y contexto celular. La localización subcelular de los RNs es dinámica y repercute sobre sus funciones transcripcionales. En presencia de su ligando específico, los RNs se acumulan en el núcleo para modular la expresión de sus genes blanco (Ortega Domínguez *et al.*, 2015).

Los receptores X del hígado (LXRs) son una subfamilia de RNs compuesta por dos miembros conocidos, LXR α y LXR β , pertenecientes a la clase II de los receptores nucleares que forman heterodímeros funcionales con el Receptor X Retinoide (RXR). Los agonistas naturales de los LXRs son derivados oxidados del colesterol denominados “oxisteroles”, que promueven la unión al ADN a elementos de respuesta a LXR (LXR-RE) en regiones reguladoras de genes diana, promoviendo la actividad transcripcional de la RNA polimerasa (Sandoval Hernández *et al.*, 2015).

El gen RN1H3 en humanos codifica para la proteína LXR α (receptor nuclear, subfamilia 1, grupo H, miembro 3) localizado en el cromosoma 11 (región 11p11.2). Este receptor está regulado por formas específicas oxidadas del colesterol, los oxisteroles, y por productos que median la biosíntesis del colesterol. LXR α , se expresa predominantemente en hígado, bazo, riñón, tejido adiposo e intestino, mientras que LXR β es ubicuamente expresado a bajos niveles. Se conocen tres variantes de LXR α , (LXR α 1, LXR α 2y LXR α 3), las cuales son generadas por inicio alternativo de la transcripción y por splicing alternativo. LXR α 1, es la más expresada en la mayoría de los tejidos, excepto en testículos donde LXR α 2 es principal. LXR α 3 se expresa en bajos niveles en pulmón, glándula tiroides y bazo. Adicionalmente, se ha demostrado que LXR α puede regular la transcripción en respuesta a cAMP (Mouzat *et al.*, 2011; Sandoval Hernández *et al.*, 2015).

Los LXR también son importantes reguladores de la transcripción del metabolismo del colesterol. LXR α y LXR β son receptores nucleares dependientes de los esteroides activados en respuesta al exceso de colesterol celular. Los genes regulados transcripcionalmente por LXR, tales como ABCA1 y proteínas transportadoras ABC de la subfamilia G (ABCG1), promueven la excreción de colesterol celular y mantienen la homeostasis de esteroides. Los ratones que carecen de LXR, acumulan esteroides en sus tejidos y presentan arterosclerosis, mientras que los agonistas sintéticos de LXR promueven el transporte reverso del colesterol y protegen a los ratones contra la aterosclerosis (Crunkhorn, 2012; Sandoval Hernández *et al.*, 2015; Sodhi & Singh, 2013; Zelcer, 2012).

Entre las funciones de LXR, se encuentra su papel como sensor de colesterol y regulador de la homeostasis de lípidos (Kang & Rivest, 2012). La activación de LXR induce la

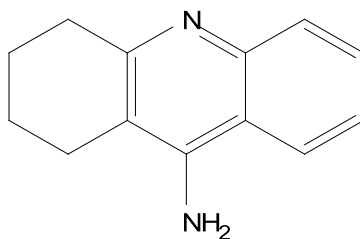
expresión de genes involucrados en el transporte de colesterol como proteínas de unión a ATP (ABCA1) y ApoE, además regula a la baja genes implicados en la síntesis de este lípido (Hozoji *et al.*, 2008). LXR juegan un papel importante en la EA debido a la función de los receptores en la regulación de la inflamación y el metabolismo del colesterol. Diferentes estudios han demostrado en modelos animales de EA que los agonistas sintéticos de LXR reducen la carga de A β , posiblemente a través de un mecanismo proteolítico dependiente del incremento de la expresión de ABCA1 y ApoE (Steffensen *et al.*, 2012).

1.4 Agentes terapéuticos Actuales

En la actualidad hay una limitada disponibilidad de alternativas terapéuticas, las cuales solo tienen efectos paliativos, demostrando la necesidad de realizar investigación en nuevas terapias. El uso de medicamentos en el tratamiento no ha tenido un gran avance con el paso del tiempo. Dentro de las opciones terapéuticas actuales, se encuentran diferentes tipos de fármacos que serán descritos a continuación:

Los medicamentos actualmente aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA se dividen en colinérgicos y neuro-protectores. De acuerdo con la hipótesis colinérgica al inhibir la enzima que degrada el neurotransmisor AChE es posible aumentar su concentración. Apoyados en esta hipótesis, en 1993 se desarrolló la tacrina Fig. [1.4-1](#), el cual fue el primer inhibidor de AChE (iAChE) autorizado para el tratamiento de la EA, sin embargo, fue retirado del mercado pocos años después debido a su alta hepatotoxicidad (Macías, 2016).

Figura 1.3.1-1: Estructura química de la Tacrina



Posteriormente fueron aprobados otros inhibidores de colinesterasas, tales como el donepezilo Fig. [1.4-2](#) en 1996, rivastigmina Fig. [1.4-3](#) en 2000 y galantamina Fig. [1.4-4](#) en

2001; los dos últimos son usados solamente en el tratamiento de la forma leve o moderada de la enfermedad. Los inhibidores de AChE ayudan a disminuir los síntomas cognitivos, pero no detienen ni retrasan la progresión de la enfermedad. Finalmente, la memantina Fig. **1.4-5** fue uno de los últimos tratamientos aprobados por la FDA y comenzó a comercializarse en el año 2002. Este fármaco tiene un mecanismo de acción diferente, actúa sobre la vía glutamatérgica mediante el bloqueo de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) de glutamato. La memantina, igual que los inhibidores de AChE ha resultado ser paliativa desacelerando los síntomas de la enfermedad. (Macías, 2016; Sonkusare *et al.*, 2005).

Figura 1.3.1-2: Estructura química del Donepezilo

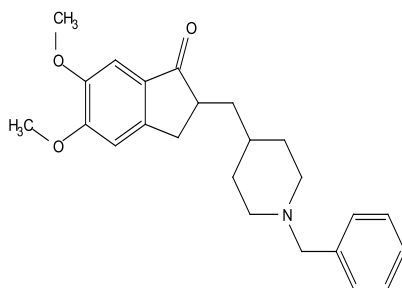


Figura 1.3.1-3: Estructura química de la Rivastigmina

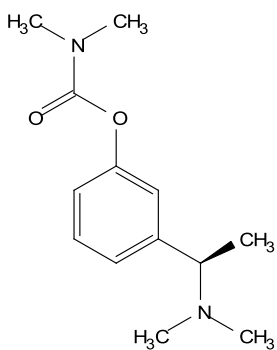
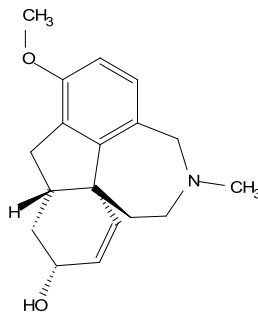
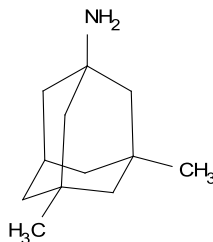


Figura 1.3.1-4: Estructura química de la Galantamina**Figura 1.3.1-5:** Estructura química de la Memantina

Actualmente, la industria farmacéutica trabaja en la búsqueda de nuevas moléculas que mejoren la calidad de vida del paciente y tengan una mayor efectividad en el tratamiento de la patología de la EA. El enfoque terapéutico de las más recientes investigaciones, se centran en el desarrollo de inhibidores de BACE-1, anticuerpos monoclonales, inhibidores de la agregación de A β , inhibidores de la glutamil ciclase, inhibidores del receptor RAGE e inhibidores de la agregación de la proteína Tau (Macias Villamizar *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, el enfoque más tradicional de abordar un solo objetivo en el proceso de la enfermedad, no ha sido satisfactorio versus las altas expectativas de éxito en la mitigación de los síntomas o la modificación de la enfermedad y cura de esta patología. Lo anterior evidencia que en la actualidad hay una limitada disponibilidad de alternativas terapéuticas, las cuales solo tienen efectos paliativos, demostrando la necesidad de realizar investigación en nuevas terapias, el uso de medicamentos en el tratamiento, no ha tenido un gran avance con el paso del tiempo. Las estrategias hasta ahora usadas, que principalmente se han enfocado en un blanco molecular, deben ser revaluadas, en

consideración a la complejidad, y la etiología desconocida de la patología, por lo tanto la terapia multi diana, puede ser una opción importante en la búsqueda de opciones de tratamiento.

1.5 Terapia Multi – diana

Las terapias multi-diana o multifuncionales son estrategias enfocadas en el tratamiento de enfermedades complejas, que surgen para suplir las deficiencias del paradigma “una enfermedad, un blanco molecular”. Dentro de esta estrategia se busca modular dos o más dianas de la enfermedad selectivamente al mismo tiempo, lo anterior se puede lograr de dos formas principalmente: por medicación múltiple o con ligandos multi-diana. En la multi-medicación se usan combinaciones de medicamentos con diferentes mecanismos de acción, los cuales se administran en combinación o en dosis individuales. La principal desventaja de esta es que el uso de varios medicamentos simultáneamente aumenta la toxicidad por biotransformación (Geldenhuis & Schyf, 2013).

La segunda estrategia conocida como ligandos multi-diana (MTDL), se enfoca en el desarrollo de un único compuesto capaz de modular dos o más blancos moleculares a la vez (Hughes *et al.*, 2016). Los MTDL son entidades químicas individuales que modulan simultáneamente múltiples objetivos. Las moléculas están concebidas para interactuar directa pero débilmente con múltiples objetivos, evitando así el desafío de administrar múltiples fármacos con diferentes niveles de biodisponibilidad, farmacocinética y metabolismo. En la terapia multimodal hay dos formas de obtener MTDLs, por la combinación de farmacóforos de moléculas activas o por tamizajes frente a blancos de interés. Los MTDLs en los cuales se combinan farmacóforos suelen obtenerse a partir de compuestos con previa actividad comprobada y por medio de técnicas computacionales se realizan diseños racionales de síntesis en donde se unen dichos fragmentos, dentro de este grupo se encuentran los ligandos híbridos (Hughes *et al.*, 2016).

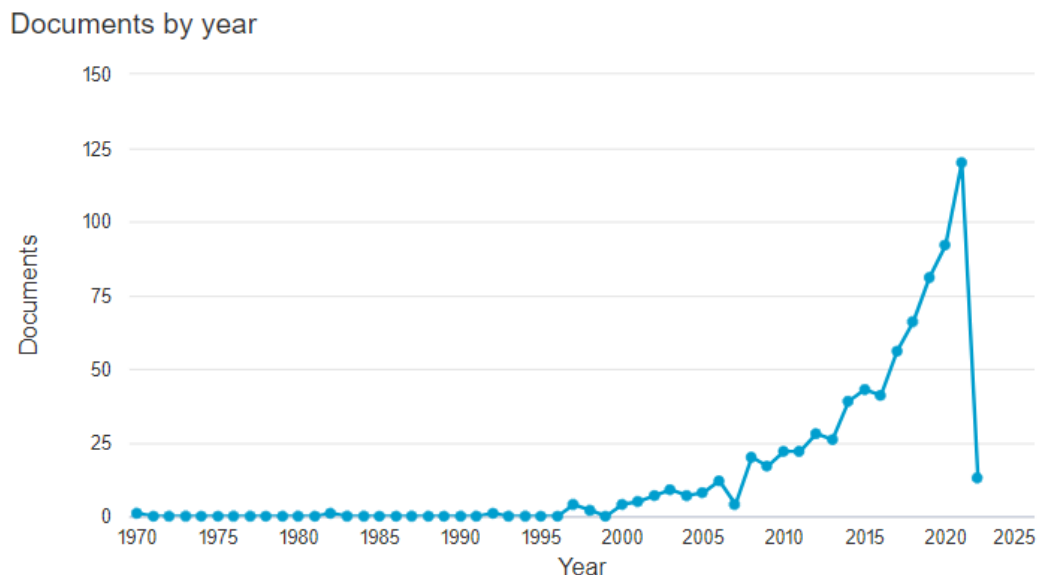
Los estudios multi diana para la EA en los que más se investiga, son aquellos que combinan la capacidad de ser inhibidores de la enzimáticos de colinesterasas y de afectar otros mecanismos como la síntesis de las placas β Amiloide (Macías, 2016), en

consideración a que los inhibidores de colinesterasas, únicamente alivian los síntomas de la EA a corto plazo, pero no detienen el progreso de la enfermedad, inhibidores de enzimas como BACE 1-2, la cual está involucrada directamente en la síntesis de las placas β -amiloides, que a la vez sean capaces de inhibir colinesterasas, pueden generar efectos sinérgicos y convertirse en una solución eficaz para el tratamiento de la enfermedad. De acuerdo a los reportes (Piazzi *et al.*, 2008; Zhu, 2009), muchas de las moléculas con potencial multifuncional que en muchos casos son obtenidas por síntesis química, tienen características estructurales muy similares a las encontradas en muchas especies naturales, y de manera especial, en PN de origen botánico.

1.6 Productos Naturales como fuente de agentes multifuncionales

El interés en el potencial multi-diana de los metabolitos presentes en los PN de origen botánico ha crecido de forma importante. En los últimos cinco años las publicaciones se han incrementado sustancialmente, debido a los prometedores resultados que se han reportado en modelos *in vitro*, *in vivo* y computacionales, en la figura **1.6-1** se muestra el aumento de los reportes en los últimos 40 años. Las investigaciones relacionadas con enfermedades neurodegenerativas como el EA, han tenido el mismo comportamiento, y cada vez son más los estudios orientados a la búsqueda de compuestos con acción neuroprotectora o a la búsqueda de esqueletos moleculares que puedan servir como plantilla para obtención de compuestos sintéticos con actividad potenciada.

Figura 1.3.1-1: Número de reportes por año: "Multi target Natural Products". Fuente: Scopus



En la actualidad se sabe que los PNs han jugado un papel muy importante en la supervivencia y adaptación de las especies; al ser sintetizados en rutas en donde son reconocidos por un gran número de enzimas (Ansari & Khodagholi, 2013). Debido a estas características los PNs, más específicamente los compuestos de origen botánico, constituyen una de las fuentes más promisorias de *scaffolds* privilegiados con características multimodales para el tratamiento de enfermedades complejas como el Alzheimer.

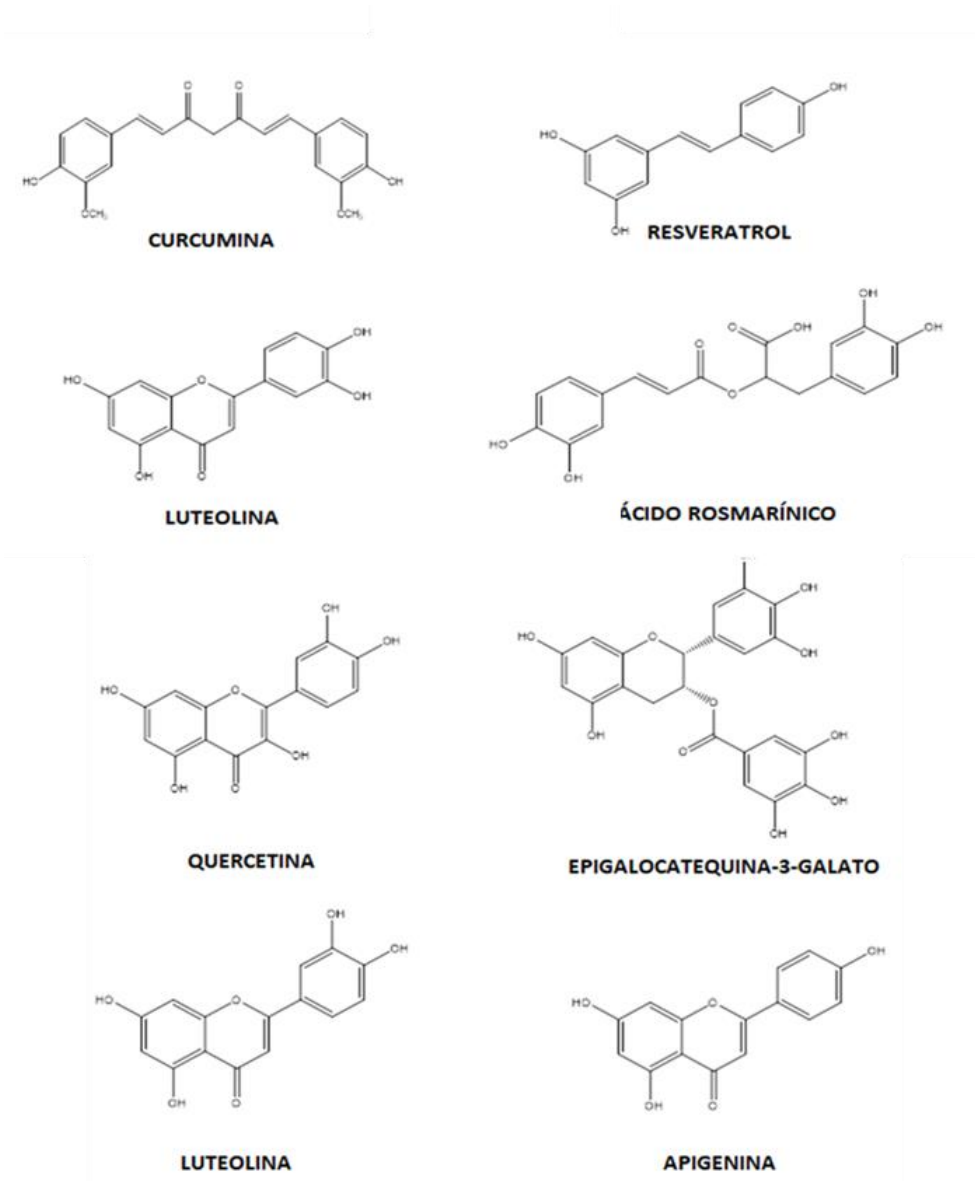
A la fecha se ha reportado un amplio número de *small molecules* con potencial multi-diana y actualmente algunos se encuentran en etapas clínicas (Geldenhuis & Schyf, 2013; Hughes *et al.*, 2016). Los compuestos presentes en los PNs multifuncionales conocidos se caracterizan por poseer núcleo polifenol, terpeno o alcaloide y por presentar actividad inhibitoria frente a las colinesterasas junto con otras propiedades adicionales como capacidad antioxidante, neuroprotectora, antiinflamatoria o inhibición de la agregación de β - amiloide (Zhang *et al.*, 2011). A continuación, se hace una descripción de estos tipos de metabolitos y de su potencial multifuncional.

1.6.1 Polifenoles

Los Polifenoles son metabolitos ampliamente distribuidos en plantas, biosintéticamente derivados de ácido shikímico, o de biosíntesis mixta, se caracterizan estructuralmente por tener varios anillos aromáticos polihidroxilados, y son moduladores de receptores involucrados en procesos neurodegenerativos (Williams & Howes, 2011). Cumarinas, Xantonas, Fenil propanoides, lignanos neolignanos, estilbenos, y flavonoides polihidroxilados son considerados compuestos polifenólicos con actividad multifuncional ya que su estructura los hace excelentes captadores de radicales libres, y muchos de ellos al tener esqueletos moleculares voluminosos, son inhibidores de colinesterasas, dichas estructuras en muchos casos han sido inspiración para la síntesis de análogos híbridos con mayor potencial farmacológico que fueron objeto de ensayos pre clínicos (Teismann & Ferger, 2000).

La curcumina es el metabolito fenólico que posee los mayores estudios orientados a determinar su efecto multifuncional, debido a sus propiedades como antiinflamatorio, antioxidante, agente aclarante de A β , inhibidor de la agregación de A β , por todo lo anterior se ha concluido que tiene potencial terapéutico para la EA. Además, debido a su capacidad para emitir fluorescencia y unirse a A β , la curcumina tiene potencial como agente de diagnóstico por imágenes. También se ha encontrado que estimula la proliferación de células progenitoras neurales embrionarias y la neurogénesis en el hipocampo adulto, potencialmente beneficiosos para la neuroplasticidad (Goozee *et al.*, 2016; Yao & Xue, 2014). Flavonoides como la luteolina, naringenina, y quercetina, los cuales son de amplia distribución en la naturaleza, inhiben la AChE *in vitro* y mejoran la capacidad cognitiva *in vivo*, aumentando los niveles de ACh en la corteza cerebral (Ansari & Khodaghali, 2013). La quercetina es un inhibidor selectivo de butirilcolinesterasa, además es capaz de inhibir las monoaminaoxidasas y de bloquear la agregación de A β , lo que la hace opción terapéutica para EA, más aún porque se ha demostrado que este tipo de compuestos son altamente biodisponibles y pueden atravesar barrera hematoencefálica (Greig *et al.*, 2005; Porat *et al.*, 2006; Youdim *et al.*, 2004). En la figura **1.6-2** se presentan las estructuras de polifenoles con potencial multifuncional.

Figura 1.6.1-1: Polifenoles con potencial multifuncional



1.6.2 Alcaloides

Los PN de mayor uso para el tratamiento de la EA son los alcaloides. Históricamente estos han sido fuente de *scaffolds* que han sido aprobados como medicamentos, como es el

caso de la galantamina o bien que han servido de plantillas para el diseño de análogos (Konrath *et al.*, 2013). La fisostigmina aislada de las semillas de la especie Africana *Physostigma venenosum*, demostró ser un potente inhibidor de colinesterasas y mejoró las funciones cognitivas en animales y humanos, sin embargo su biodisponibilidad es restringida. Con el fin de mejorar las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del alcaloide se ensayaron diferentes análogos, lo cual permitió el desarrollo de la rivastigmina actualmente aprobada por la FDA para el tratamiento de las formas leve y moderada de la enfermedad (Hamouda *et al.*, 2013).

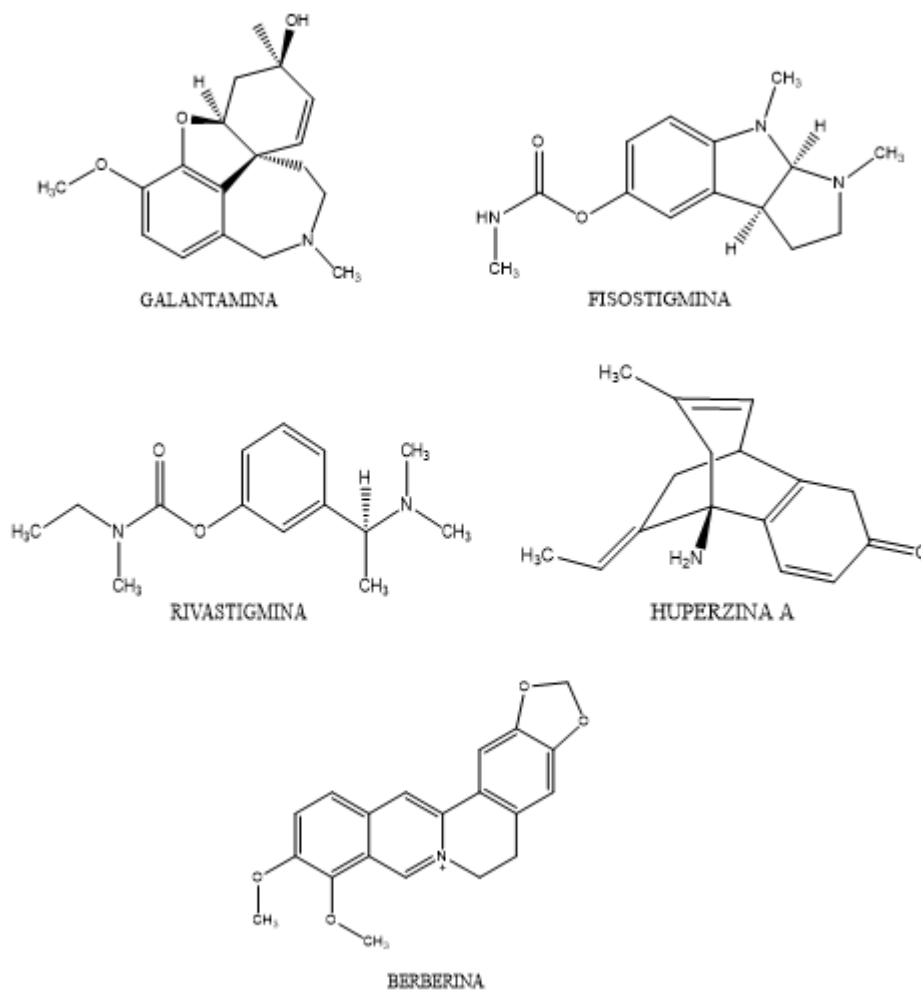
La Huperzina A, alcaloide obtenido a partir especies del género *Huperzia* (Lycopodiaceae), es un inhibidor reversible de colinesterasas, neurotrófico y neuroprotector. En estudios *in vivo* demostró mejorar las funciones cognitivas en animales y humanos, con pocos efectos secundarios. Otros alcaloides como la nantenina, harmina y harmalina, además de ser anticolinérgicos, inhiben la agregación de A β y la hiperfosforilación de tau, se unen a receptores claves en la neuroprotección y disminuyen la acción de quinasas (Xing *et al.*, 2014; Zhang, 2012).

Si bien algunos de estos alcaloides han presentado problemas de biodisponibilidad, reacciones adversas o hasta el momento no han sido evaluados en modelos *in vivo* siguen siendo de gran interés para la investigación y desarrollo de agentes terapéuticos multi-diana ya sea como fármacos híbridos o multifuncionales (Konrath *et al.*, 2013). Dentro de este grupo, los alcaloides isoquinolínicos se destacan por su alto potencial multimodal, al presentar actividad frente a diferentes blancos moleculares de la EA. Los alcaloides han sido aislados a partir de diferentes órganos, de un gran número de especies vegetales; principalmente en las familias Papaveraceae, Berberidaceae, Ranunculaceae y Fumariaceae. En donde se encuentran la mayor variedad de subgrupos distribuidos en diferentes géneros. También se pueden encontrar de forma más restringida, dependiendo del núcleo, en familias como: Rutaceae (bencilisoquinolinas, quinolonas protoberberinas y benzofenantridinas) Annonaceae, Magnoliaceae, Lauraceae (bencilisoquinolinas, bis-bencilisoquinolinas, aporfinas, oxoaporfinas), Euphorbiaceae (isoquinolinas, proaporfinas, taspinas), Menispermaceae y Aracaceae (oxoaporfinas), Liliaceae (fenetilisquinolinas, homoproaporfinas) y Amaryllidaceae (Phillipson *et al.*, 2012). La berberina, el alcaloide isoquinolínico con mayor cantidad de investigaciones, debido a su potencial actividad biológica, demostró en ensayos *in vitro* tener actividad antioxidante, ser inhibidor de

BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS CON POTENCIAL
NEUROPROTECTOR PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER A PARTIR DE UNA ESPECIE DEL GÉNERO *Zanthoxylum*
caribaeum (RUTACEAE)

colinesterasas (AChE y BChE), monoaminoxidasa, antiagregante de β -amiloide y reguladora de los niveles de colesterol (Ji & Shen, 2011)(Ansari & Khodagholi, 2013) En la figura 1.6.2-1 se presentan las estructuras de alcaloides con potencial multifuncional.

Figura 1.6.2-1: Alcaloides con potencial multifuncional



En consideración a la importancia que revisten los alcaloides, por el potencial multifuncional que estos han mostrado, orientado principalmente al ser opciones en tratamiento de patologías neurodegenerativas con el EA, ha motivado que muchos grupos de investigación interesados en este tipo de estudios, direccionen sus investigaciones a la

búsqueda de alcaloides con potencial multifuncional. Estudios previos realizados en el grupo de investigación en química de PN vegetales bioactivos, han mostrado que especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae) poseen metabolitos tipo alcaloide con actividad inhibitoria de colinesterasas, actividad captadora de radicales libres, y actividad protectora de β -caroteno. A continuación, se describen las generalidades de la familia Rutaceae y el género *Zanthoxylum*.

1.6.3 Familia Rutácea

Esta familia comprende plantas leñosas, árboles, arbustos y en algunos casos hierbas, entre las características botánicas más sobresalientes de las plantas que pertenecen a la familia Rutaceae encontramos la presencia de hojas esparcidas u opuestas, simples o compuestas, glabras y con puntos translucidos debido a las glándulas oleíferas; flores actinomorfas Fig. 1.6.3-1, raramente zigomorfas, cáliz y corola tetrámeros Fig. 1.6.3-2 o pentámeros, estambres cuatro o más; tálamo desarrollado entre los estambres o por encima de los mismos, plantas herbáceas siempre verdes o caducifolias, a veces espinosas Fig. 1.6.3-3; carpelos cuatro o cinco, a veces en mayor número o reducidos a uno, ovario ségero sincárpico o en cápsula; fruto variado: esquizocárpico Fig. 1.6.3-4 o en cápsula, drupa o baya, y hesperidio.

Figura 1.6.3-1: Flores actinomorfas



Figura 1.6.3-2: Corola tetrámera



Figura 1.6.3-3: Plantas herbáceas espinosas



Figura 1.6.3-4: Fruto variado, esquizocárpico



La familia Rutaceae está constituida por 167 géneros y alrededor de 1700 especies, distribuidas en seis subfamilias Rutoidea, Dyctiolomatoidea, Flindersioidea, Spathelioidea, Toddalioidea y Aurontioidea (Fatima *et al.*, 1988). Geográficamente se encuentra ubicada en regiones tropicales, subtropicales y algunas especies se encuentran en zonas templadas del planeta (Biodiversity, 2006). En Colombia se encuentra ampliamente

distribuida, y representada por 20 géneros: Amyris, Angostura, Casimiroa, Citrus, Coleonema, Cusparia, Erythrochiton, Esembeckia, Galipea, Hortia, Moneria, Murralla, peltostigma, petiveria, pilocarpus, Pitavia, Raptia, Ruta, Ticores y *Zanthoxylum* (SPICA®, 2001).

El creciente interés por el estudio de las plantas de la familia Rutaceae se debe al gran protagonismo que ellas tienen en la medicina tradicional. Sus aplicaciones son muy variadas van desde el tratamiento de enfermedades, la aplicación industrial como es el caso de las especies del género *Citrus*, cuyos frutos son muy utilizados en la industria alimenticia, además de las hojas, flores y cáscaras de los mismos, de los cuales se extraen aceites esenciales muy usados en la elaboración de saborizantes, aromatizantes y perfumería. Poseen también uso como plantas ornamentales y como fuente de maderas de excelente calidad usada en la fabricación de muebles y en construcción, los usos reportados por la medicina tradicional han motivado muchos estudios químicos, los cuales evidencian la riqueza metabólica de la familia, dentro de los compuestos más abundantemente reportados están los alcaloides de diferente núcleos básicos según la procedencia biosintética, cumarinas, limonoides, terpenos, y otros metabolitos de menor importancia para la familia debido a que son menos frecuentes tales como los derivados del ácido benzoico. Existen numerosos reportes en los cuales se describe de manera detallada los diferentes metabolitos aislados de esta familia botánica. (Fatima *et al.*, 1988; Gray & Waterman, 1978).

▪ Género *Zanthoxylum*

El género *Zanthoxylum* pertenece a la familia Rutaceae y está representado por más de 250 especies que están ampliamente distribuidas en las regiones tropicales (Negi, Bisht, Bhandari, Singh, & Sundriyal, 2011). Se encuentra distribuido en el continente americano “Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Islas del caribe, Colombia, Costa Rica, Estados Unidos, Honduras, México, Panamá, Perú, Puerto Rico y Venezuela”, en el continente asiático “China, India, Indonesia, Japón, Malasia y Vietnam”, y por último en el continente africano “Camerún, Kenia y Nigeria” (Macías Villamizar *et al.*, 2007).

Las especies del género *Zanthoxylum* se encuentran como arbustos o arbolillos caducifolios Fig. 1.6.3-5 de 4-6 m de altura como máximo, de tallos espinosos Fig. 1.6.3-6 y ramillas de color marrón. Las hojas se disponen opuestas paripinnadas Fig. 1.6.3-7, con 3-11 folíolos ovados, de 3,7-6,5 cm de longitud, con el ápice agudo, de color verde fuerte

BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS CON POTENCIAL
NEUROPROTECTOR PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER A PARTIR DE UNA ESPECIE DEL GÉNERO *Zanthoxylum*
caribaeum (RUTACEAE)

en el haz y más claro en el envés y jóvenes pubescentes en el envés. Las flores son de color verdoso dispuestas en cimas axilares sésiles que nacen después que las hojas, carecen de cáliz y tienen 4-5 pétalos (Macias Villamizar *et al.*, 2007).

Figura 1.6.3-5: Arbustos Caducifolios



Figura 1.6.3-6: Tallos espinosos

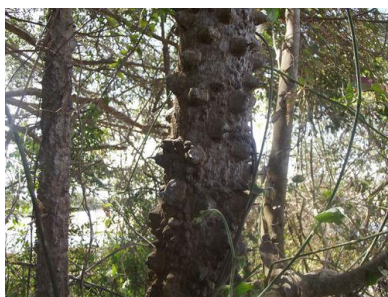


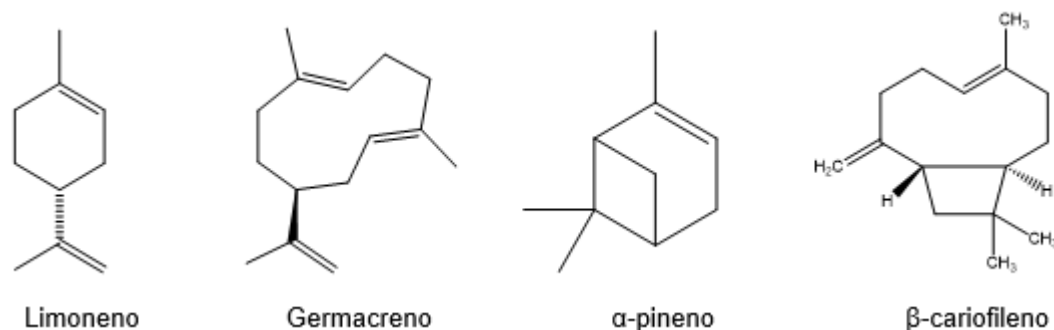
Figura 1.6.3-7: Hojas opuestas paripinnadas



Del género *Zanthoxylum* se han obtenido aceites esenciales caracterizados por ser una mezcla compleja de compuestos (Boehme *et al.*, 2008). Se han descrito diversos compuestos, los más comúnmente encontrados son de tipo terpénico siendo muy común

la presencia de: limoneno, germacreno D, α -pineno y β -cariofileno (**Fig. 1.6.3-8**), a estos aceites se les ha reportado actividad insecticida, citotóxica, antibacteriana, larvicida, antiinflamatoria, analgésica, antinociceptiva, antioxidante, hepatoprotectora, antiplasmodial, antiproliferativa, antihelmíntica, antiviral, anticonvulsiva y antifúngica (Boehme *et al.*, 2008; Negi *et al.*, 2011).

Figura 1.6.3-8: Estructura química de terpenos aislados de especies del género *Zanthoxylum*



Los estudios químicos realizados en los extractos de las especies del género *Zanthoxylum* han permitido evidenciar que los compuestos más abundantes en el género son los alcaloides, cumarinas, lignanos, amidas, flavonoides, y esteroides (Boehme *et al.*, 2008; Macias Villamizar *et al.*, 2007). A continuación se mencionarán algunos ejemplos de cada tipo de estos compuestos más representativos para el género.

Se han reportado gran diversidad de compuestos tipo cumarina, ejemplo de estos son la escopoletina Fig 1.6.3-9, la cual tiene reportada actividad bacteriostática, anti inflamatoria, entre otras, y se ha obtenido en cantidades apreciables a partir de la especie *Z. rhoifolium* (Espino, 2018); otro ejemplo importante por el tipo de aplicación que posee es el psoraleno Fig. 1.6.3-10, una furanocumarina con potente actividad fotoprotectora usada en el tratamiento de psoriasis, eccemas, vitiligo, anti fúngico, se ha aislado de especies como *Z. americanum* (Bafi-Yebova *et al.*, 2005).

Figura 1.6.3-9: Estructura química de la escopoletina

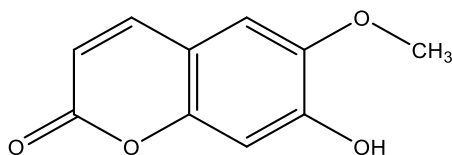
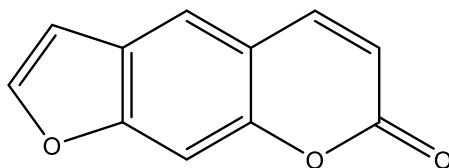


Figura 1.6.3-10: Estructura química del psoraleno



Los metabolitos tipo flavonoide, han sido reportados ampliamente, siendo más abundantes flavonas, flavonoles, flavonas O-glicosiladas, y flavonoides diméricos; algunos ejemplos de los compuestos reportados más abundantes son, la quercitrina Fig. 1.6.3-11, el cual posee actividad antibacteriana y se ha obtenido a partir de varias especies del género *Zanthoxylum* (Chávez, 2011). La procianidina B3 Fig. 1.6.3-12, es un flavonoide dímérico con potente actividad antioxidante aislada de especies como *Z. piperatum* (Alvarez Caballero, 2017; Macias Villamizar *et al.*, 2007).

Figura 1.6.3-11: Estructura química de la Quercitrina

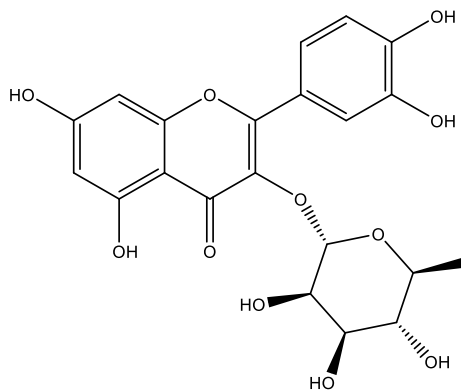
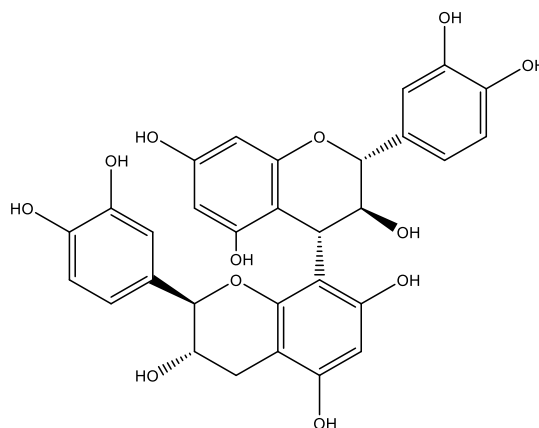


Figura 1.6.3-12: Estructura química de la procianidina

Los lignanos obtenidos como dímeros de unidades C_6C_3 son metabolitos ampliamente aislados de especies del género y la familia, con diversidad de núcleos y sustituciones químicas, algunos de los compuestos reportados son el meridinol Fig 1.6.3-13, el cual tiene reportada actividad sedativa y se obtiene a partir de la *Z. fagara* (Amaro-Luis *et al.*, 1988); otro ejemplo de los metabolitos flavonoides es la asarinina Fig 1.6.3-14, la cual tiene reportada actividad antibacteriana, antilarvica; aislada entre otras especies de *Z. liebmannianum*, *Z. rhoifolium*, y *Z. rigidum* (Macias Villamizar *et al.*, 2007; Mata *et al.*, 1998).

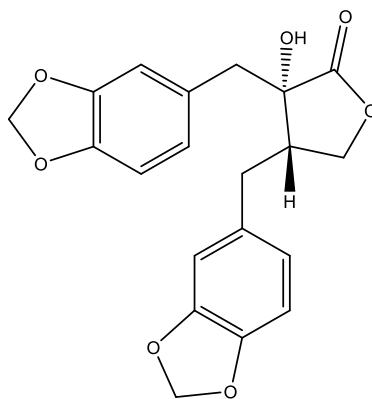
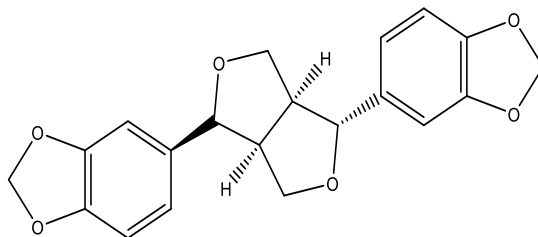
Figura 1.6.3-13: Estructura química de meridinol

Figura 1.6.3-14: Estructura química de la asarinina

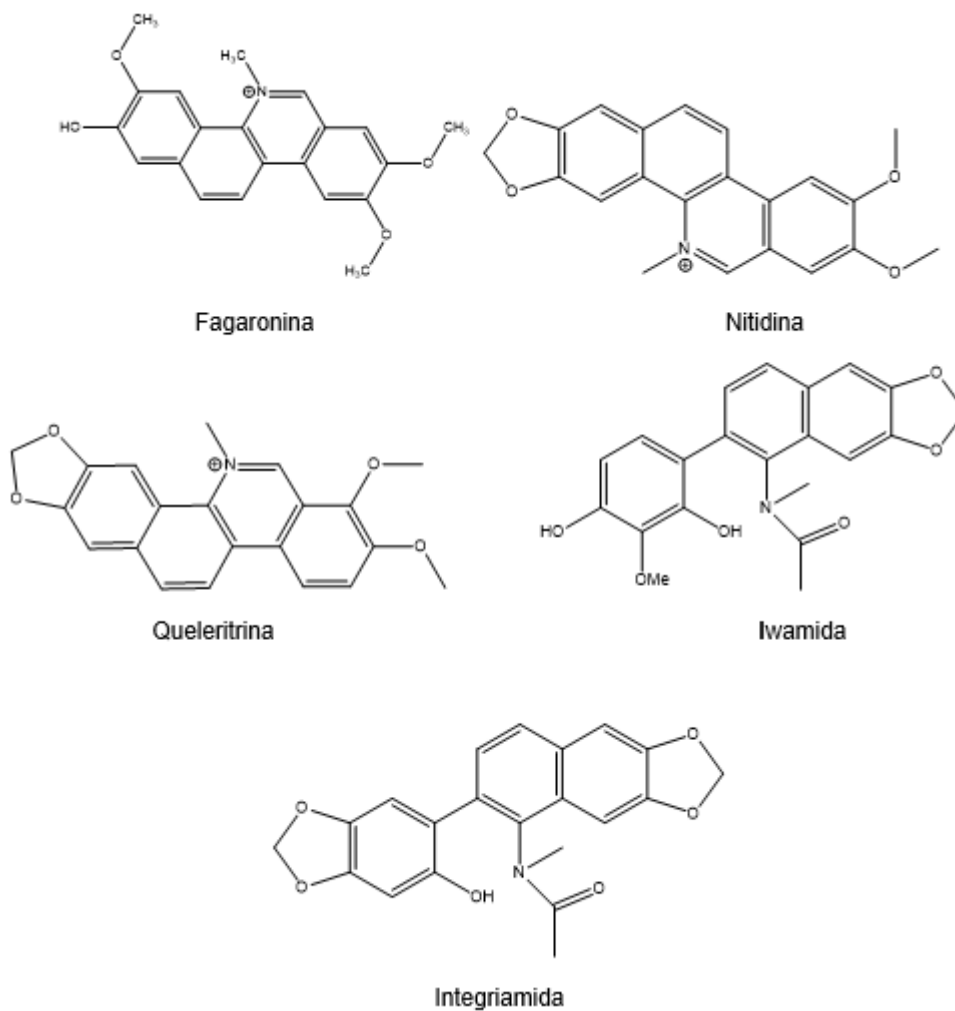


Los compuestos de tipo alcaloide aislado en especies de *Zanthoxylum*, se encuentran presentes en la mayoría de las especies y se han aislado de diferentes órganos de las plantas, encontrándose en mayor cantidad en el tronco y la corteza de la raíz (Dieguez *et al.*, 2004), poseen una amplia diversidad estructural, teniendo en cuenta la importancia de este tipo de metabolitos por la cantidad que se han aislado, a continuación se realiza una descripción más amplia de los tipos de compuestos reportados para el género.

Alcaloides de Isoquinolínicos

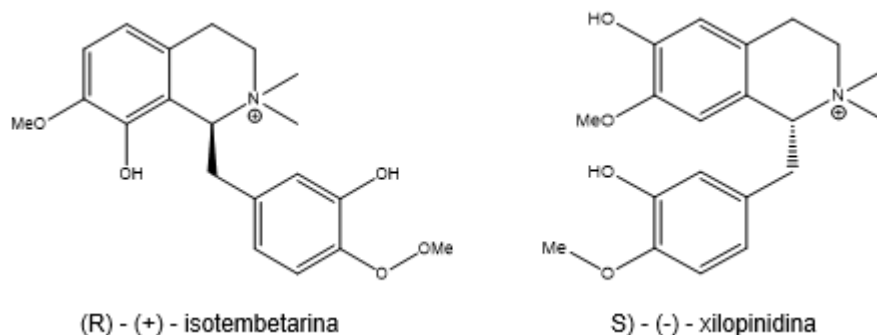
Las benzofenanthridinas pertenecen a la clasificación de los alcaloides isoquinolínicos; este tipo de alcaloides son los más reportados en el género *Zanthoxylum* y presentan gran importancia debido a la variada actividad biológica que presentan, entre las cuales destaca la actividad antiviral, antitumoral, anti leucémica, antifúngica, efectos citotóxicos y cardiovasculares, entre otros (Addae-Mensah *et al.*, 1989; Krane *et al.*, 1985; Patiño & Cuca, 2004). Los principales representantes de este tipo de alcaloides por el número de reportes que presentan son: fagaronina, nitidina, las cuales presentan actividad anticancerígena (Shaw, Kenneth R., Zhang, 2015), queleritina que presenta actividad antioxidante, actividad inhibitoria de la proteína quinasa c y actividad antibacteriana, y sanguinarina. Los compuestos con estructura química similar a la iwamida y la integriamida, aislados de varias especies del género *Zanthoxylum*, han sido clasificados por diferentes autores dentro de las benzofenanthridinas (Krane *et al.*, 1985). En la figura 1.6.3-15 se presentan las estructuras de los alcaloides mencionados.

Figura 1.6.3-15: Estructura química de benzofenantridinas aisladas de especies de *Zanthoxylum*



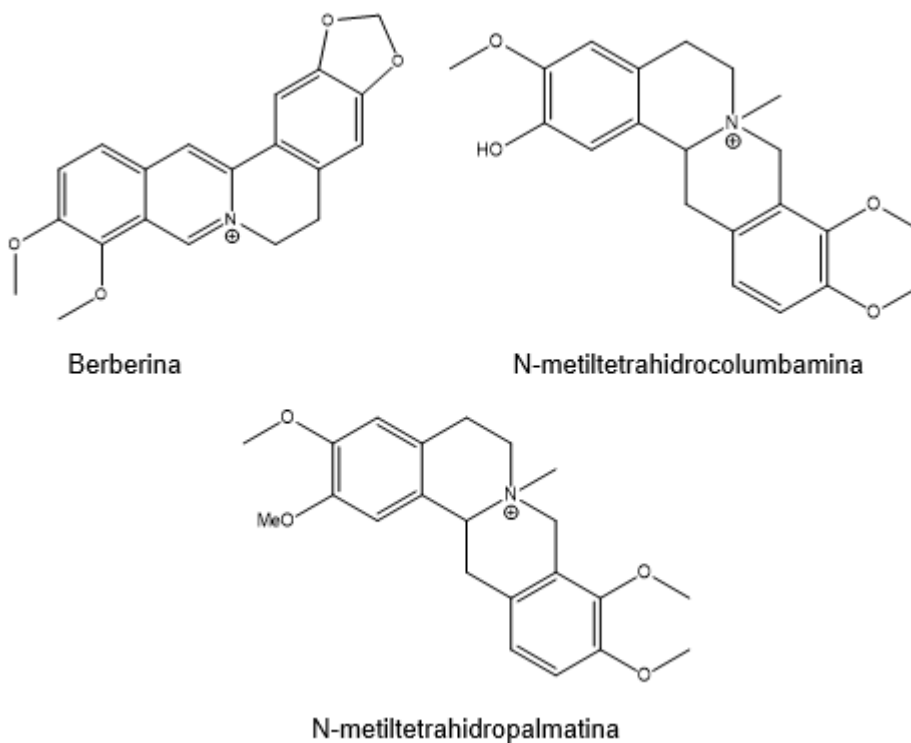
Los alcaloides de bencilisoquinolinos, presentan una distribución más reducida respecto a los de tipo benzofenantridinicos (Ling *et al.*, 2009; Waterman, 2007) (Patiño & Cuca, 2004). En el género *Zanthoxylum* no son los más comunes, pero se han encontrado en algunas especies, como alcaloides cuaternarios, ejemplo de esto son: (R) - (+) – isotembetarina **1.6.3-16** que presenta actividad anti inflamatoria y analgésica (Moriyasu *et al.*, 1997), y la (S) - (-) - xilopinidina que se han aislado de la corteza de *Z. quinduense* (Patiño, 2010).

Figura 1.6.3-16: Estructura de alcaloides bencilisoquinolinos aislados de *Z. quinduense*.



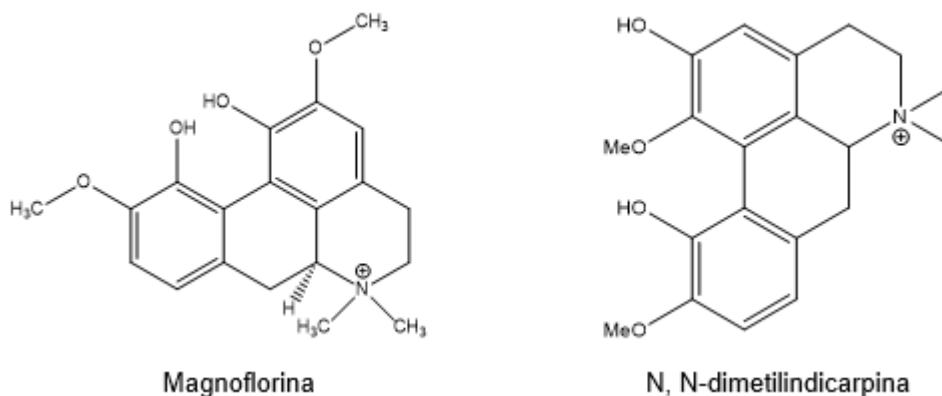
Los alcaloides de tipo berberínico y protoberberínico se han aislado, en diversas especies del género *Zanthoxylum*, el compuesto más representativo por la cantidad de reportes y actividades farmacológicas comprobadas que posee es la berberina (figura 1.6.3-17), se comercializa como suplemento dietario, y coadyuvante en el tratamiento de patologías como comprobada diabetes, hipercolesterolemia, presión arterial alta, aterosclerosis, además presenta actividad leishmanicida, y capacidad de reducir factores de riesgo en la EA por su acción neuroprotectora (Cai *et al.*, 2016), y las tetrahydroberberinas como N-metiltetrahydrocolumbamina y N-metiltetrahidropalmatina han sido importantes por que presentan actividad antibacteriana (Patiño *et al.*, 2011).

Figura 1.6.3-17: Estructura de Alcaloides berberinicos aislados de especies de *Zanthoxylum*



Se han aislado alcaloides aporfínicos tales como la Magnoflorina, que es un potente ansiolítico, antioxidante, inhibidor de la α – tirosinasa, presenta actividad anti inflamatoria y es anticancerígeno (C. Li & Wang, 2014), y la N, N-dimetilindicarpina (Figura 1.6.3-18), obtenida de la corteza de la raíz de *Z. zanthoxyloides*, la cual posee una importante actividad antiinflamatoria (Patiño Ladino & Cuca Suárez, 2010; Queiroz *et al.*, 2006).

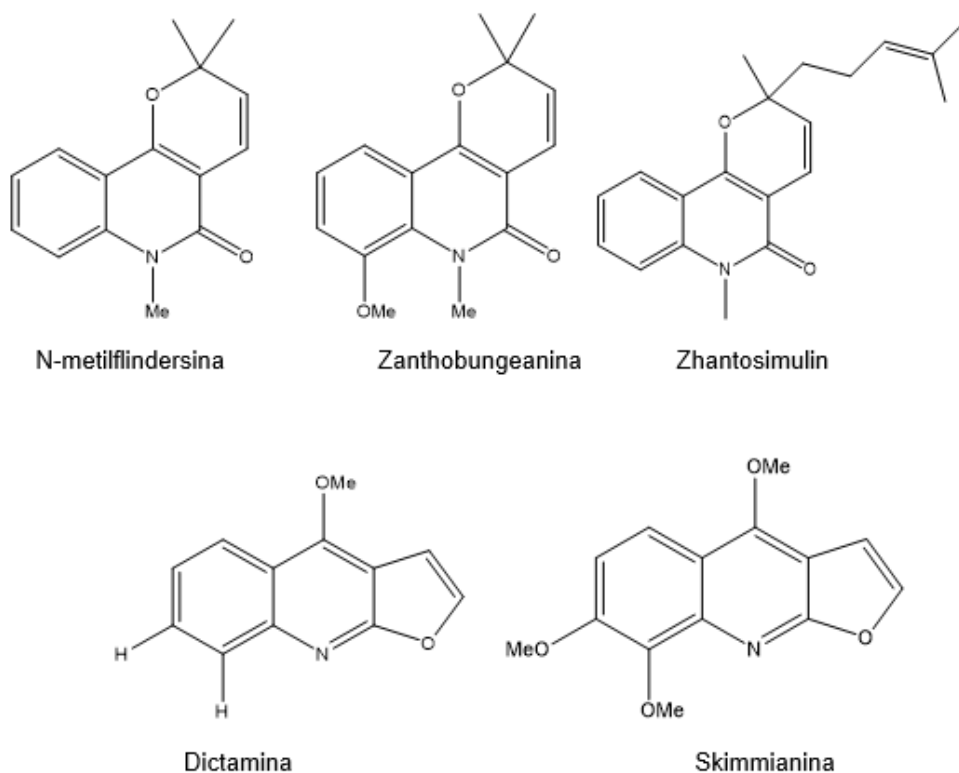
Figura 1.6.3-18: Estructura de aporfinas aisladas de *Z. zanthoxyloides*



Alcaloides Quinolónicos

Este tipo de alcaloides son muy comunes en el género *Zanthoxylum*, se divide principalmente en dos tipos: las furoquinolinas y las piranoquinolinas. En su gran mayoría se caracterizan por tener un grupo carbonilo en la posición 2 del núcleo quinolínico simple y se denominan 2-quinolonas (Waterman, 1993). De las piranoquinolinas, se han aislado alcaloides tales como la N-metilflindersina, que presenta actividad antibacteriana, insecticida y larvicida; la zanthobungeanina (Cuca S & Taborda M, 2007; Suárez *et al.*, 2011) y la zantosimulin, la cuales han demostrado un importante efecto citotóxico (Chen *et al.*, 1997). En cuanto a las furanoquinolinas, se han reportado metabolitos tales como la dictamina, que presenta actividad insecticida (Rodríguez, 2012) y skimmianina que presenta actividad fotomutagénica (Paulini *et al.*, 1987). En la figura 1.6.3-19 se presentan las estructuras de alcaloides quinolónicos aislados de especies de *Zanthoxylum*.

Figura 1.6.3-19: Estructura química de alcaloides quinolónicos aislados de especies de *Zanthoxylum*

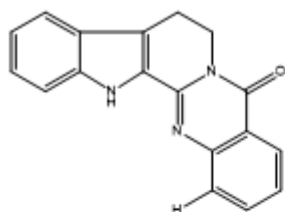


Otros alcaloides

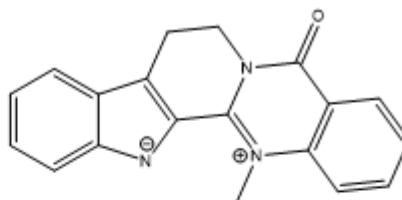
Además de los tipos de estructuras descritas anteriormente, se ha documentado la presencia en menor cantidad de otros tipos de metabolitos de núcleo alcaloidal, los cuales se mencionarán a continuación: se ha reportado alcaloides de tipo indolopiridoquinazolina como la rutaecarpina que presenta actividad antiagregante plaquetaria (Sheen *et al.*, 1996), inhibe la producción de prostaglandinas (Woo *et al.*, 2001), es protector cardiovascular (Tian *et al.*, 2019).

Alcaloides de tipo indolopiridoquinazolina como la dehidroevodiamina, la cual que presenta actividad inhibitoria de acetilcolinestearasa, modulador de la actividad de la glicógeno sintasa kinas-3 (GSK-3) (Kang *et al.*, 2018)(Liao *et al.*, 2011), y disminuye los niveles del péptido β -Amiloide (Liao *et al.*, 2011). Alcaloides carbazolicos, entre los cuales se encuentran el 4-metoxi-10H-furo[3,2-a] carbazol y el 10H-furo[3,2-a] carbazol los cuales presentan actividad antibacterial, antifúngica, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria y antitumoral (Fig. 1.6.3-20) (Macias Villamizar *et al.*, 2007).

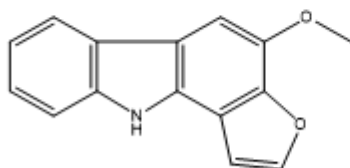
Figura 1.6.3-20: Estructura química de alcaloides aislados en menor cantidad de especies de *Zanthoxylum*



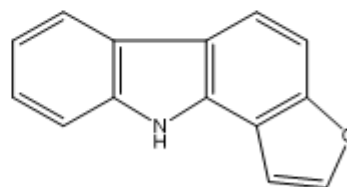
Rutaecarpina



Dehidroevodiamina



4-metoxi-10H-furo[3,2-a] carbazol



10H-furo[3,2-a] carbazol

1.6.4 Especies del género *Zanthoxylum* como fuente de productos naturales con potencial multifuncional

Estudios recientes en diversas especies de plantas colombianas como las Lauraceae, Piperaceae, Rutaceae y Myristicaceae, se han desarrollado con el fin de evaluar la actividad antioxidante e inhibitoria de acetilcolinesterasas, con el fin de determinar su potencial neuroprotector (Plazas *et al.*, 2018).

Se evidenció que algunos de los extractos analizados de especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae) y *Ocotea* (Lauraceae) presentaron una fuerte inhibición de AChE con IC₅₀ inferior a 50 µg/mL. Se observó que los extractos más activos presentan metabolitos de tipo alcaloides isoquinolínicos, que están relacionados con la actividad inhibitoria de AChE (Plazas *et al.*, 2018). En conclusión, estudios previos realizados por nuestro equipo de investigación demuestran el potencial que presentan estas especies, principalmente el género *Zanthoxylum* (Rutaceae), para llevar a cabo un aislamiento biodirigido de los metabolitos responsables de la actividad deseada como potenciales moléculas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Teniendo en cuenta que el género *Zanthoxylum* presenta un alto potencial para el tratamiento de patologías neurodegenerativas, se llevó a cabo un estudio de actividad inhibitoria donde se evaluaron 41 extractos alcaloidales de nueve especies de *Zanthoxylum*, los resultados de estos ensayos se presentan en la tabla 1.6.4-1 (Plazas *et al.*, 2019).

Tabla 1.6.4-1: Actividad inhibitoria de colinesterasas de extractos de especies del género *Zanthoxylum*. Tomado de (Plazas *et al.*, 2019).

Sample code	Specie	Place of collection	Part/Extract	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	
				EeAChE	EqBChE
1C	<i>Z. schreberi</i> (J.F. Gmel.) Reynel	Tena	Bark/chloroform	14.11 ± 0.06	44.94 ± 0.49
1A			Bark/aqueous	478.0 ± 2.6	203.5 ± 4.9
2C			Root bark/chloroform	8.44 ± 0.04	28.07 ± 0.24
2A			Root bark/aqueous	206.3 ± 0.8	261.9 ± 8.1
3C	<i>Z. rhoifolium</i> Lam.	Viotá	Root/chloroform	24.98 ± 0.11	56.21 ± 0.64
3A			Root/aqueous	623.8 ± 4.4	267.4 ± 7.6
4C			Root bark/chloroform	9.67 ± 0.05	22.38 ± 0.19
4A			Root bark/aqueous	363.8 ± 2.6	90.23 ± 1.63
5C	<i>Z. caribaeum</i> Lam.	Viotá	Bark/chloroform	24.39 ± 2.50	351.9 ± 2.5
5A			Bark/aqueous	294.2 ± 1.2	> 1000
6C			Bark/chloroform	187.5 ± 1.1	69.71 ± 0.69
6A			Bark/aqueous	334.2 ± 2.0	324.3 ± 0.9
7C	<i>Z. rigidum</i> Humb. & Bonpl. ex Willd	Apulo	Root/chloroform	92.30 ± 0.80	135.7 ± 1.0
7A			Root/aqueous	206.7 ± 1.6	501.2 ± 1.2
8C			Bark/chloroform	246.9 ± 1.3	111.9 ± 1.7
8A			Bark/aqueous	782.1 ± 1.3	359.9 ± 9.4
9C	<i>Z. martinicense</i> (Lam) DC.	Apulo	Root/chloroform	23.33 ± 0.10	45.47 ± 0.42
9A			Root/aqueous	300.8 ± 1.5	110.9 ± 1.5
10C			Bark/chloroform	24.29 ± 0.17	172.70 ± 2.66
10A			Bark/aqueous	119.5 ± 8.8	30.71 ± 7.74
11C	<i>Zanthoxylum</i> sp	Apulo	Root/chloroform	24.29 ± 0.17	48.22 ± 0.41
11A			Root/aqueous	729.0 ± 5.7	> 1000
12C			Bark/chloroform	36.06 ± 0.24	60.57 ± 0.52
12A			Bark/aqueous	187.2 ± 2.6	245.9 ± 3.6
13C	<i>Z. caribaeum</i> Lam.	Viotá	Root/chloroform	335.8 ± 1.9	131.8 ± 1.2
13A			Root/aqueous	138.0 ± 7.0	171.8 ± 14.6
18C			Bark/chloroform	211.9 ± 1.3	333.5 ± 1.9
18A			Bark/aqueous	207.9 ± 19.1	23.01 ± 1.06
19C	<i>Z. monophyllum</i> (Lam.) P. Wilson	Arbeláez	Root/chloroform	67.57 ± 0.37	149.7 ± 0.4
19A			Root/aqueous	76.29 ± 0.58	429.3 ± 0.4
20C			Root/chloroform	5.01 ± 0.31	130.9 ± 1.4
21C			Root/chloroform	5.67 ± 0.49	11.40 ± 0.38
21A	<i>Z. quinduense</i> Tul.	Tena	Root/aqueous	124.5 ± 10.0	340.9 ± 8.5
22C			Bark/chloroform	574.4 ± 2.9	142.1 ± 0.8
22A	<i>Z. fagara</i> (L.) Sarg.	Tocaima	Bark/aqueous	> 1000	787.6 ± 13.9
23C			Bark/chloroform	193.2 ± 1.3	138.5 ± 1.3
23A	<i>Z. rhoifolium</i> Lam.	Guayabal de Siquima	Bark/aqueous	623.0 ± 7.6	279.5 ± 2.7
24C			Wood/chloroform	344.5 ± 2.8	245.2 ± 2.1
24A			Wood/aqueous	499.1 ± 5.7	> 1000
25C			Bark/chloroform	94.4 ± 0.9	351.9 ± 0.3
25A	<i>Z. rhoifolium</i> Lam.	Santa Barbara (S/der)	Bark/aqueous	657.0 ± 11.2	285.8 ± 3.4

IC₅₀ values are shown as the mean ± SEM of three independent experiments performed at least in duplicate.

Entre los resultados observados en este estudio, se encontró que 15 extractos (36,5%) de 9 especies mostraron una fuerte inhibición de AChE (> 80% a 100 µg mL⁻¹) con valores de IC₅₀ inferiores a 100 µg mL⁻¹. Además, el 29% del total de extractos probados presentó una alta inhibición contra BChE, mostrando valores de IC₅₀ inferiores a 100 µg mL⁻¹. La mayoría de ellos (90%) corresponden a extractos alcaloidales clorofórmicos, en la mayoría de los casos, los valores de IC₅₀ presentados contra BChE fueron significativamente más bajos en comparación con AChE (Plazas *et al.*, 2019).

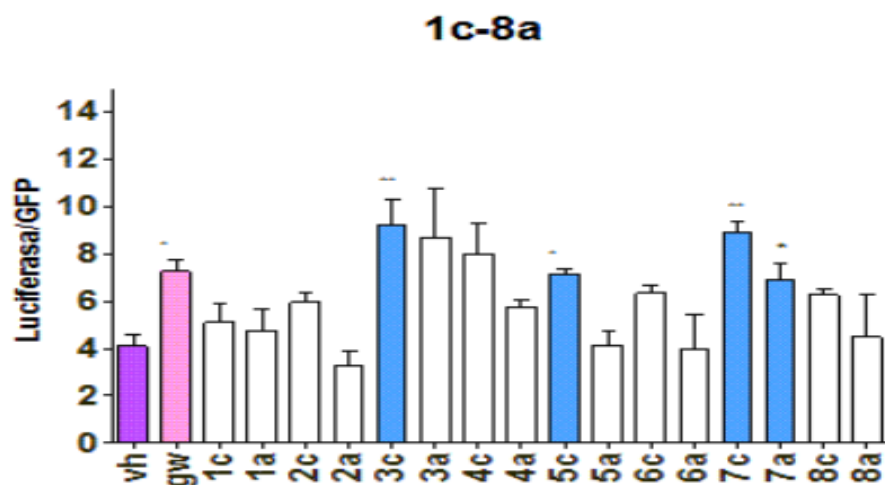
De acuerdo a los resultados de la tabla 1.6.4-1, se evidencia que los extractos acuosos mostraron tener menor efectividad que los clorofórmicos, excepto la raíz y la corteza de *Z. caribaeum*, la raíz y la corteza de *Z. rhoifolium* y la corteza de *Z. martinicense*, lo que sugiere que en la mayoría de especies ensayadas, los alcaloides que tienen actividad

inhibitoria de colinesterasas son de mediana polaridad. (Plazas *et al.*, 2019). Actualmente, existen pocos estudios sobre la composición química de *Z. caribaeum*, teniendo en cuenta esta baja cantidad de información, y la actividad presentada por la especie en los estudios previos, se concluyó que es importante la búsqueda e identificación de los compuestos o las fracciones enriquecidas responsables de la actividad observada en los estudios previos.

En consecuencia, la búsqueda de metabolitos y sus actividades terapéuticas, y al determinar el potencial del *Z. caribaeum* para el tratamiento de la EA, en consideración a las diferentes dianas que pueden ser exploradas y de las cuales hablamos en este capítulo, y complementando los resultados anteriores, en nuestro equipo de investigación se han realizado estudios en algunas especies del género *Zanthoxylum*, para determinar el efecto de estas sobre blancos terapéuticos que se conoce como un factor clave en el desarrollo de la EA el cual es el ApoE. Por tal motivo la regulación de ApoE y ABCA1 por los LXR, se ha convertido en un objetivo clave dentro del potencial multifuncional de los metabolitos presentes en las especies vegetales.

Teniendo en cuenta lo anterior, en nuestro equipo de investigación se estudió el efecto agonista frente a LXRb de diversos extractos de plantas pertenecientes a diferentes familias de plantas, incluida la familia Rutaceae, en un modelo de células HEK293 que expresan LXR (Valencia Rincón, 2017). En la fig. **1.6.4-1** se evidencia que el extracto 7c perteneciente a *Z. caribaeum* presenta una buena actividad agonista de los receptores LXR. Por tal motivo, podemos observar que con los diversos estudios previos que se han realizado sobre los extractos de *Z. caribaeum*, se puede considerar con una especie vegetal con metabolitos que presentan actividad multifuncional enfocada a procesos neurodegenerativos.

Figura 1.6.4-1: Evaluación de la actividad agonista de los extractos frente a LXRb en el modelo generado de células HEK293.



En conclusión, el género *Zanthoxylum* se puede considerar como una fuente promisoría de diversos compuestos con potencial neuroprotector y regulador de diversas vías implicadas en la EA. Teniendo en cuenta lo reportado en literatura, los estudios previos de nuestro equipo de investigación, y que no existen muchos reportes de la composición química de la especie *Zanthoxylum caribaeum*, en los siguientes capítulos se presentará el estudio fitoquímica dirigido del extracto con potencial neuroprotector, y la determinación de su efecto y de los metabolitos aislados frente a algunos modelos relacionados con la patología de EA.

2. Capítulo 2 – Caracterización fitoquímica preliminar y evaluación del efecto multifuncional del extracto etanólico de *Zanthoxylum caribaeum*

Las enfermedades neurodegenerativas como el EA son un problema de salud pública mundial creciente, la baja efectividad de los tratamientos actuales, hacen que la continua búsqueda de opciones terapéuticas se convierte en un interesante objeto de estudio. En este sentido los PN son una fuente muy promisoría de moléculas con importante diversidad química y múltiples acciones biológicas, por esto los grupos de investigación de Muerte Celular y Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB), han aunado esfuerzos en la determinación de especies vegetales que puedan ser fuente de agentes activos para esta patología. A partir de estos estudios conjuntos se seleccionó a la especie *Zanthoxylum caribaeum* para ser objeto de investigación.

En este capítulo se describirán los resultados de la evaluación del potencial multifuncional del extracto etanólico de la raíz de *Z. caribaeum*, a partir de su efecto como captador de radicales libres, inhibidor de peroxidación lipídica, inhibidor de colinesterasas, y agonista de LXR; A partir de los que se realizó la caracterización fitoquímica preliminar del extracto y la obtención de algunos metabolitos presentes en el mismo.

2.1 Materiales y Métodos

2.1.1 Materiales

Los solventes utilizados durante el proceso de fraccionamiento y purificación del extracto fueron grado analítico marca Merck KGaA (Darmstadt – Germany), Mallinckrodt (USA), Omnisolv (Darmstadt – Germany), Honeyweel (USA) y J.T. Baker (USA). Para las bioautografías directas y los chequeos cromatográficos realizados en el procedimiento de

fraccionamiento se utilizaron cromatofolios de sílica gel HF₂₄₅ de 0.25 mm de espesor. Para la cromatografía líquida al vacío se usó sílica gel 60 G para TLC Macherey - Nagel (Düren – Germany). Como fases estacionarias para la cromatografía en columna se usaron, sílica gel para cromatografía en columna flash (40-63 µm), y Sephadex® LH20 (Sigma-Aldrich). Los espectros de RMN 1D y 2D fueron registrados en un equipo Bruker Avance 400 (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C), utilizando como patrón de referencia los picos de los solventes CDCl₃ y MeOD (Merck). Los espectros de HPLC fueron tomados en un equipo Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 (Detector: DAD, λ: 330 nm, Flujo: 1 mL/min, t: 41 min, Columna: C8 – 250 x 4,6 mm de 5 µm Symmetry, Fase móvil: Gradiente Acetonitrilo: Agua). Las absorbancias para las determinaciones de actividad antioxidante, y actividad inhibitoria de colinesterasas fueron registradas en un lector de micro placas Accu Reader.

2.1.2 Métodos

▪ Material Vegetal

El material vegetal corresponde a la raíz de la especie *Zanthoxylum caribaeum*, la recolección del material vegetal fue llevada a cabo en el municipio de Apulo, en el departamento de Cundinamarca, la especie fue determinada por el biólogo Álvaro Clavijo del Instituto de Ciencias Naturales. Un espécimen reposa en el Herbario Nacional Colombiano con el número COL- 596911.

▪ Obtención del extracto etanólico

La raíz colectada de la especie *Z. caribaeum*, se partió finamente, y se secó a temperatura ambiente, 960 g de raíz seca, se molió y se extrajo exhaustivamente por maceración en frío con etanol al 96%, el extracto etanólico se filtró y concentró a presión reducida, hasta eliminar el solvente y obtener el extracto etanólico seco.

▪ Fraccionamiento del extracto de raíz de *Z. caribaeum*

La mayor parte del extracto etanólico obtenido, correspondiente a 35,3 g, se sometió a fraccionamiento mediante cromatografía líquida al vacío (CLV), usando como fase móvil solventes de polaridad creciente: hexano (Hex), cloroformo (CHCl₃), acetato de etilo (AcOEt), y Metanol (MeOH). Las fracciones eluidas se recolectaron, concentraron a

presión reducida para eliminar el solvente, y se reunieron por similitud de su perfil previo chequeo en TLC, obteniendo 16 fracciones reunidas. Teniendo en cuenta los resultados de actividad de las fracciones, se procedió a realizar aislamiento y purificación, usando cromatografías de diferentes tipos y de forma sucesiva en busca de determinar algunos de los compuestos presentes en las fracciones activas.

▪ **Cromatografía en capa fina con reactivos de coloración**

El extracto y las fracciones reunidas fueron sembrados sobre cromatofolios de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck de 0,1 mm de espesor, y eluidas usando mezcla de Cloroformo: Acetato de etilo 8:2, el solvente remante se eliminó, y posteriormente los cromatofolios se asperjaron con reactivos específicos de coloración seleccionados teniendo en cuenta la quimiotaxonomía del género.

▪ **Determinación *in vitro* de la actividad captadora de radicales libres mediante el método DPPH**

Para la determinación de la capacidad captadora de radicales libres de las fracciones reunidas, se utilizó el método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), usando bioautografía directa para determinar que parte de las fracciones tienen el efecto deseado. Las fracciones probadas se sembraron en cromatofolios de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck de 0,1 mm, usando como eluyente Tolueno: Acetato de isopropilo (6:4), el solvente remante se eliminó y la placa se asperjó con solución metanólica de DPPH al 0.2%, las zonas de inhibición correspondientes a los compuestos captadores de radicales, se observan sobre la placa como zonas amarillas, sobre un fondo morado característico de la solución del radical (Kumar *et al.*, 2014).

Una vez determinada las fracciones que poseían compuestos captadores de radicales, se determinó el % de actividad captadora de radiales libres. Soluciones stock de 0,5 mg/mL en metanol de las fracciones determinadas como activas en el ensayo cualitativo, se diluyeron hasta alcanzar concentraciones correspondientes a 100ppm, 50ppm, 25ppm, 10ppm, 1ppm, 0,1ppm, 0,01ppm. Alícuotas de 10 µL de las soluciones de prueba en

metanol junto con 190 μL de DPPH metanólico 0.1mM, se colocaron en cajas de 96 pozos, mediante una incubación a temperatura ambiente durante 30 min. Las lecturas se realizaron a 515 nm.

- **Determinación de la actividad antioxidante por protección de β -Caroteno.**

Para la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* mediante el método aclaramiento de β -caroteno, se utilizó bioautografía directa para determinar las fracciones que poseían compuestos activos. Las fracciones ZCF1 a ZCF16 se sembraron en cromatofolios de TLC de sílica gel 60 HF₂₅₄, las placas se eluyeron en el sistema Cloroformo: Acetato de etilo 8:2, una vez eluída la placa el solvente remanente se dejó secar, y se asperjó con solución de β – caroteno en cloroformo. Los compuestos y/o fracciones que poseen actividad se observan como manchas incoloras sobre la placa (Leon & Reyes, 2017).

Las fracciones que mostraron inhibición en el ensayo de bioautografía directa, se sometieron a la determinación del % de actividad antioxidante, a través de un ensayo en microplacas para determinar la capacidad protectora de los compuestos frente a la peroxidación lipídica. A partir de una solución *stock* de 400 ppm en cloroformo de las fracciones a ensayar, se obtuvieron las soluciones de trabajo de 100 y 10 ppm. Alícuotas de 50 μL de las soluciones de prueba junto con 150 μL de suspensión de ácido linoleico- β -caroteno se midieron a una absorbancia de 470 nm durante un tiempo de 200 min, tomando lecturas durante cada minuto a una temperatura de 45°C. Se utilizó Quercetina y Ácido cafeico como control positivo (Leon & Reyes, 2017).

- **Determinación de la actividad inhibitoria de colinesterasas**

Para la determinación de la actividad inhibitoria de colinesterasas *in vitro*, se utilizaron dos tipos de técnicas: Bioautografía directa sobre placas de TLC (determinación cualitativa), las muestras ensayadas que presenten inhibición en el ensayo cualitativo, se someten al ensayo colorimétrico de Ellman para cuantificar la inhibición. Los dos procedimientos se describen a continuación.

▪ Bioautografía directa

Las fracciones ensayadas se sembraron en cromatofolios de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck de 0,2 mm, usando como eluyente Tolueno: Acetato de isopropilo (6:4), el solvente remanente se eliminó y la placa se asperjó con solución de acetilcolinesterasa de anguila eléctrica a 4 UA/mL en buffer fosfatos 0,1 M pH 8,0. Se deja secar la placa para evitar el desplazamiento de las sustancias en la placa y el desprendimiento de la sílica, posteriormente se incubó a 37°C en cámara húmeda durante 30 min. Posteriormente, asperjar la placa con una solución de 2,5 mg/mL de acetato de α naftilo en etanol, se deja secar la placa y se incubó a 37°C en cámara húmeda durante 30 min.; finalmente, asperjar con solución de Fast Blue (2,5 mg/mL en H₂O). los compuestos inhibidores de AChE aparecen como manchas incoloras contra un fondo púrpura (Castellanos-Castillo, 2014; Marston *et al.*, 2002).

Las fracciones que mostraron inhibición en el ensayo cualitativo, se sometieron al ensayo colorimétrico cuantitativo a través de un ensayo en placas para determinar la actividad inhibitoria de colinesterasas. Se adicionó 50 μ L de cada concentración de inhibidor (muestras a evaluar) en los pocillos (excepto en los pocillos de control negativo), posteriormente se colocó 50 μ L de la enzima excepto en las muestras control. Posteriormente se preincubó la placa durante 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación, se adicionó 100 μ L de sustrato premezclado (ATCI y DTNB) y reactivo de Ellman: 50 μ L de ATCI (concentración de ensayo de 1000 μ M) y 50 μ L de DTNB (concentración de ensayo de 500 μ M) en cada pocillo. Finalmente, se colocó la placa en el lector y se realizaron las lecturas a una absorbancia a 412 nm durante 30 minutos.

- **Determinación *in vitro* de la actividad agonista de LXR**

Línea Celular HEK293

La línea celular HEK293 fue generada a partir de la transformación de células humanas embrionarias de riñón, con fragmentos de ADN de adenovirus humano de tipo 5 (Ad5). La línea celular HEK293 es ampliamente utilizada en el estudio de proteínas típicas de células neuronales, pues tiene muchas características en común con neuronas tempranamente diferenciadas (Thomas & Smart, 2005).

Su fácil manipulación hace a las células HEK293 un excelente modelo de trabajo. Estas células mantienen una estabilidad fenotípica y electrofisiológica hasta el pase 30, luego de lo cual es necesario trabajar con una alícuota nueva para asegurar que las condiciones de trabajo sean óptimas (Solomon *et al.*, 2009). La confluencia ideal para transfectarlas es del 70%. Gracias a esta última característica y al hecho de no expresar ninguna isoforma de LXR, se seleccionó esta línea para la generación del modelo para evaluar la activación de LXRB con los extractos vegetales.

Para la determinación de la actividad *in vitro* agonista de LXR, se utilizaron una serie de metodologías las cuales serán descritas a continuación.

- **Determinación de viabilidad celular por MTT**

Determinación de las concentraciones de trabajo.

El ensayo de MTT permite inferir la viabilidad celular de forma indirecta. Consiste en evaluar la actividad mitocondrial a través de la reducción de la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) en un compuesto coloreado de formazan, por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. El producto de la reacción se acumula intracelularmente en cristales, por lo cual para su cuantificación es necesario lisar las células y disolver los cristales. De esta forma a mayor concentración de formazan, mayor actividad mitocondrial y por ende mayor viabilidad celular (Liu & Peterson, 1997; Stockert *et al.*, 2012; Supino, 1995).

El procedimiento que se llevó a cabo para la determinación de la viabilidad celular se explica a continuación:

Se cultivó la línea celular HEK293 en medio DMEM hasta una confluencia del 70%, se tripsinizó, y posteriormente se suspendieron las células a una densidad de 10000 células/pozo, se sembraron las células en una caja de 96 pozos, se incubaron las cajas durante 24 horas, posteriormente se removió el medio de siembra y se reemplazó por el tratamiento en medio sin suplementar, se incubó durante 24 horas y posteriormente se adicionó 10 μ L de solución 5 mg/mL de MTT a cada pozo, se incubó durante 4 horas a 37°C, hasta obtener un precipitado morado visible, se retiró el medio y se solubilizaron los cristales con 100 μ L de solución de Buffer de lisis para MTT, se agitaron las cajas en un agitador orbital a una velocidad de 60 – 90 rpm, durante 15 min y finalmente se registraron las absorbancias en un lector multiplaca a 550 nm.

- **Determinación de actividad agonista de LXR**

Transfección de células HEK

Paralelamente a la evaluación de la citotoxicidad de los extractos sobre las líneas celulares, se generó un sistema para estudiar la activación de LXRb en las células HEK293. El sistema consiste en transfectar las células con un plásmido de expresión para LXRb (pCMX-LXRb), un plásmido que permita expresar un gen reportero (Luciferasa) dependiente de la activación de LXRb (LXRE-Luc), y finalmente un plásmido cuyo gen reportero (GFP) no dependa de LXRb para expresarse (pEGFP-N1) (Invitrogen, 2006; Rienzo *et al.*, 2009; Smale, 2010).

El procedimiento que se llevó a cabo para la determinación de la viabilidad celular se explica a continuación:

Se cultivó la línea celular HEK293 en medio DMEM hasta una confluencia del 70%, se Tripsinizó, y posteriormente se suspendieron las células a una densidad de 10000 células/pozo, se sembraron las células en una caja de 96 pozos, se incubaron durante 24 horas, posteriormente se removió el medio de siembra y se reemplazó por una mezcla de transfección; la cual consiste en lipofectamina y los plásmidos (GFP 1,6 ng, LXR 6,6 ng, LUC 33,3 ng) disueltos en Optimem. Se incubó durante 24 horas y posteriormente se removió el medio de siembra y se reemplazó por el tratamiento en medio sin suplementar,

se incubó durante 24 horas y posteriormente se retira el medio, se adiciona el Kit de Luciferasa y finalmente se registraron las absorbancias en un lector multiplaca a 550 nm.

2.2 Análisis Estadístico

Se obtuvieron tres replicas independientes por cada tratamiento, los datos se expresaron como el promedio \pm SEM. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías usando el software Graph Pad Prism 8.

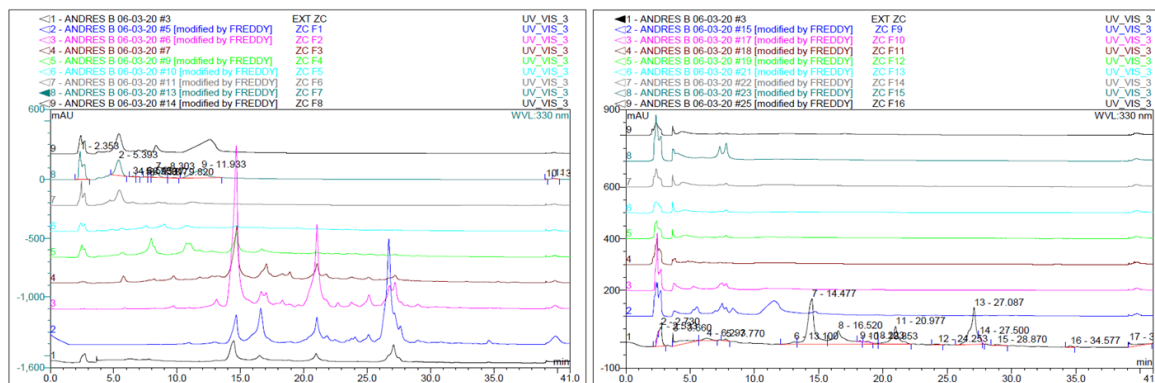
2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Fraccionamiento y análisis preliminar del extracto etanólico de raíz de *Z. caribaeum*

A partir de la extracción exhaustiva del material vegetal seleccionado por los resultados de actividad preliminar obtenidos, correspondiente a 960 g de la raíz seca y molida de *Z. caribaeum*, usando maceración en frío con etanol como método de extracción, se obtuvieron 45.1 gramos de extracto etanólico, del cual 35,29 gramos se sometieron a fraccionamiento usando CLV con solventes de polaridad creciente (Hex, CHCl₃, AcOEt, MeOH). Las fracciones eluidas de la columna se reunieron por su similitud en placa delgada preparativa, agrupándose en 16 fracciones finales, las cuales se numeraron como FZC1 a FCZ16. A las fracciones se les realizó un control por HPLC-DAD (Fig. 2.3.1-1) con el fin de evaluar la complejidad de las fracciones obtenidas respecto al extracto y como un control de seguimiento en el posterior proceso de purificación. En el desarrollo de la metodología se determinó que la longitud de onda donde se evidenciaba una mayor absorbancia de los metabolitos presentes corresponde a 330 nm.

BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS CON POTENCIAL
NEUROPROTECTOR PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER A PARTIR DE UNA ESPECIE DEL GÉNERO *Zanthoxylum*
caribaeum (RUTACEAE)

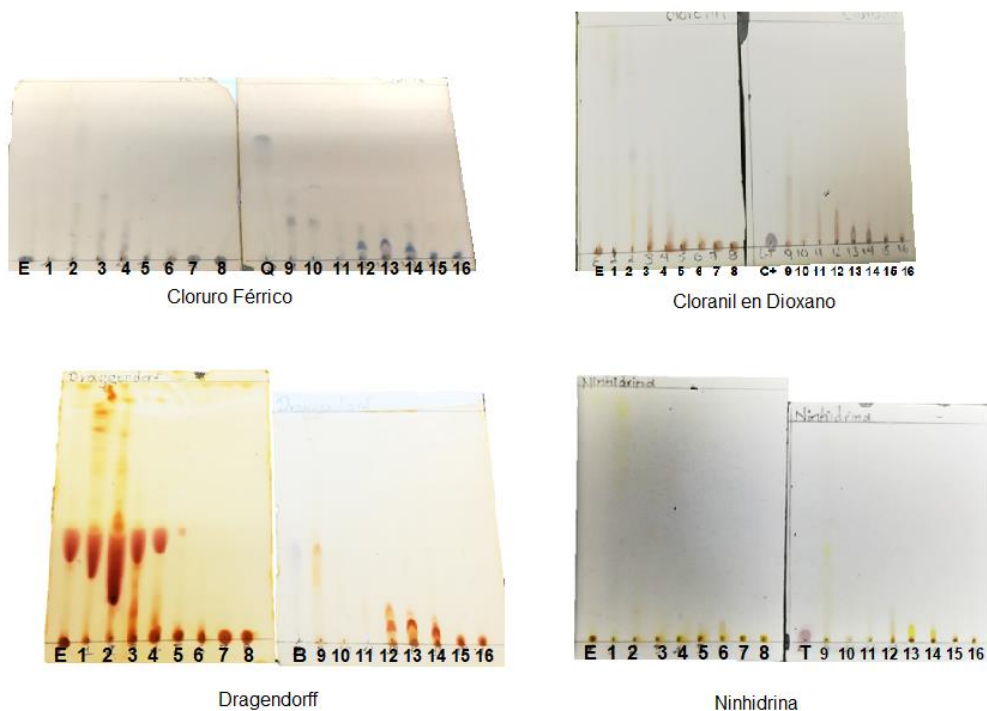
Figura 2.3.1-1: Comparación de los perfiles de HPLC de FZC1-FZC16. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis por HPLC.



Para determinar el tipo de metabolitos presentes en las fracciones, estas se sometieron a un análisis con reactivos de coloración, los cuales fueron seleccionados teniendo en cuenta la quimiotaxonomía del género, y los metabolitos reportados con actividad multifuncional relacionada con EA. Con estas premisas, como reveladores específicos se usaron: reactivo de Draggendorf (alcaloides), Ninhidrina (aminoácidos), cloranil en dioxano (aminas primarias y secundarias no heterocíclicas), y Cloruro férrico (Fenoles). En la figura **2.3.1-2** se evidencian los resultados obtenidos.

Figura 2.3.1-2: Análisis de las fracciones FZC1- FZC16 con reveladores específicos. Cromatoplaca revelada Cloruro férrico para determinación de fenoles (C+) Quercetina. Cromatoplaca revelada con cloranil en dioxano para la identificación de aminas primarias

(C+) L- triptofano. Cromatoplaça Dragendorff para la determinación de alcaloides, (C+) Berberina, Cromatoplaça revelada con ninhidrina para la identificación de aminoácidos



La coloración generada sobre las placas se produce si existe reacción química con los reveladores utilizados, lo cual permite determinar la presencia de un tipo de estructura en la muestra analizada, en este sentido los reactivos de coloración nos permiten evidenciar la presencia o ausencia de un núcleo en particular. Para el caso de este estudio los resultados muestran la presencia de compuestos fenólicos principalmente en las fracciones FZC12 A FCZ16, la coloración azul obtenida por la formación de complejos de hierro con los polifenoles presentes en el extracto, los cuales debido a la coloración observada se presume son derivados del ácido gálico (Lock, 2016).


De otro lado, en todas las fracciones se observa la presencia de compuestos nitrogenados heterocíclicos y con aminas libres, por las coloraciones obtenidas con los reactivos de Dragendorff y cloranil en dioxano sobre las cromatoplaças, es importante resaltar que el uso de los dos reactivos buscaba determinar el tipo de compuestos nitrogenados presentes en el extracto, los resultados obtenidos muestran la posible presencia de compuestos con nitrógeno heterocíclico y nitrógeno en forma de aminas libres (no forman parte de un ciclo),

BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS CON POTENCIAL
NEUROPROTECTOR PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER A PARTIR DE UNA ESPECIE DEL GÉNERO *Zanthoxylum*
caribaeum (RUTACEAE)

mientras que no se detecta la presencia de amidas, o aminoácidos en el extracto. Estos resultados son comparables con lo reportado anteriormente para el género (Macias Villamizar *et al.*, 2007). En la tabla 2.3.1-1, se resumen los resultados del análisis realizado con reactivos de coloración sobre TLC.

Tabla 2.3.1-1: Análisis con reactivos de coloración seleccionados de FZC1-FZC16

FRACCIÓN	REVELADOR				FRACCIÓN	REVELADOR			
	FeCl ₃ Fenoles	Dragendorff Alcaloides	Cloranil aminas primarias	Ninhidrina Aminoácidos y amidas		FeCl ₃ Fenoles	Dragendorff Alcaloides	Cloranil aminas primarias	Ninhidrina Aminoácidos y amidas
FZC1					FZC 9				
FCZ2					FZC10				
FCZ3					FZC11				
FCZ4					FZC12				
FCZ5					FZC13				
FCZ6					FZC14				
FCZ7					FZC15				
FCZ8					FZC16				

*  Presencia del tipo de metabolito en la fracción

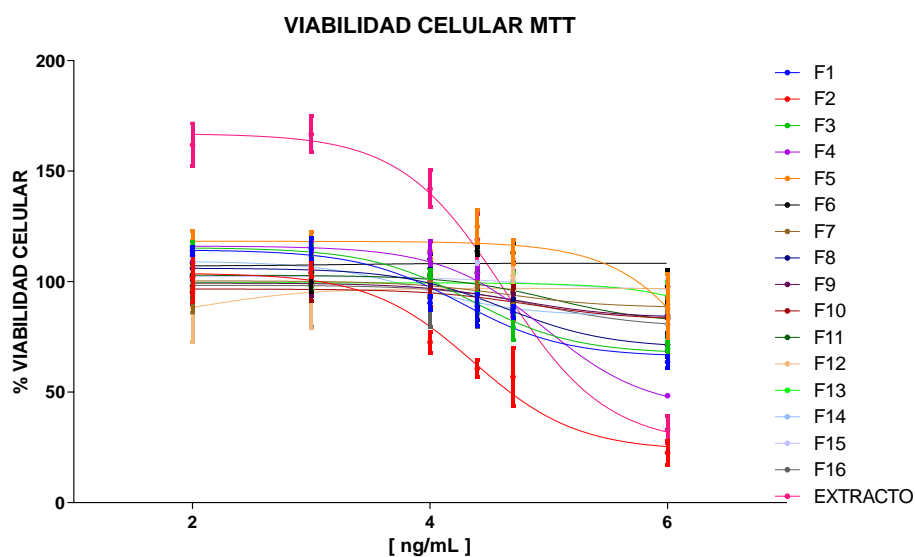
Una vez realizado el fraccionamiento del extracto y la determinación de algunos de los tipos de núcleos presentes en las fracciones, se procedió a realizar un *Screening* de actividad para determinar el potencial multifuncional relacionado con la EA del extracto, y así determinar cuáles serían las fracciones seleccionadas para someter a purificación.

2.3.2 Determinación de actividad Agonista de LXR del extracto de *Z. caribaeum*

▪ Determinación de viabilidad celular por MTT

Al extracto etanólico y fracciones de la raíz de *Z. caribaeum*, se les realizó el ensayo de determinación de la viabilidad celular por MTT. Inicialmente se determinaron las concentraciones de trabajo con una dosis subletal mayor al 80% (Fig 2.3.2-1), se seleccionó la concentración administrada como pretratamiento a la línea celular HEK293, las cuales se encuentran en la tabla 2.3.2-1.

Figura 2.3.2-1: Efecto de las fracciones obtenidas sobre la viabilidad celular por MTT.



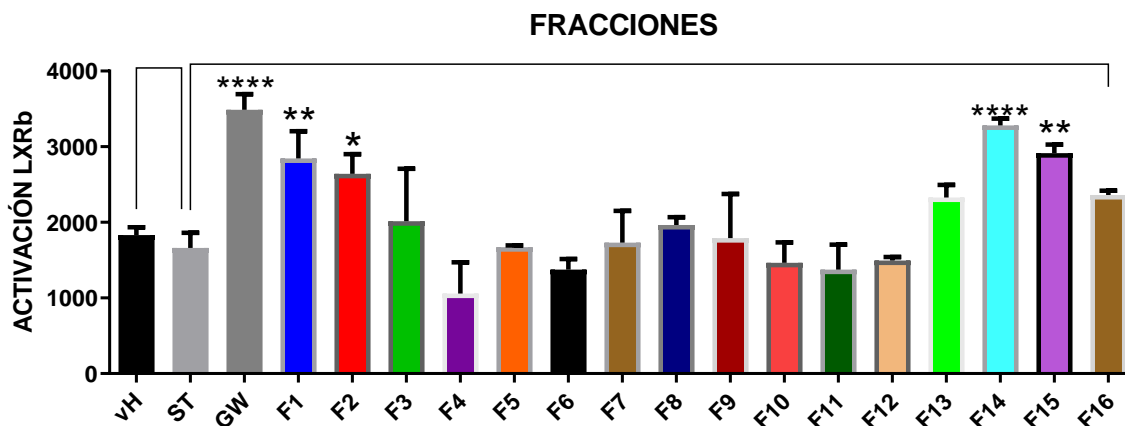
Nota: La viabilidad celular se evaluó por ensayo de MTT, se graficó el % de la viabilidad celular, en función de la concentración del extracto y/o las fracciones. Las curvas se representan en colores de acuerdo con la fracción, datos se muestran como la media \pm SEM por triplicado.

Tabla 2.3.2-1: Concentraciones de trabajo obtenidas por MTT

FRACCIÓN	CONCENTRACION DE TRABAJO	FRACCIÓN	CONCENTRACION DE TRABAJO
FZC1	10 µg/mL	FZC9	50 µg/mL
FZC2	1 µg/mL	FZC10	25 µg/mL
FZC3	25 µg/mL	FZC11	50 µg/mL
FZC4	50 µg/mL	FZC12	25 µg/mL
FZC5	100 µg/mL	FZC13	100 µg/mL
FZC6	100 µg/mL	FZC14	100 µg/mL
FZC7	50 µg/mL	FZC15	100 µg/mL
FZC8	25 µg/mL	FZC16	100 µg/mL

▪ **Determinación de actividad agonista de LXR**

Una vez se determinaron las concentraciones de trabajo mediante el ensayo de MTT, se procedió a realizar el ensayo de la actividad agonista de LXR. Para este ensayo se siguió el protocolo anteriormente descrito y después del análisis de los datos se obtuvieron los resultados que se presentan en la figura **2.3.2-2**.

Figura 2.3.2-2: Determinación de la actividad agonista de LXR de las fracciones

Nota: Ensayo de gen reportero de Luciferasa en línea celular HEK293. Se grafico la tasa de cambio en % de la actividad Luciferasa por cada fracción evaluada normalizada respecto al vehículo. El control positivo fue el agonista sintético GW3965 (GW; gris oscuro). Los datos se representan como la media \pm SEM realizado por triplicado, seguido de una prueba de comparaciones multiples por t-student, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

En la figura anterior, se muestra en negro el resultado de la actividad Luciferasa basal, obtenida en células transfectadas con los plásmidos sin presencia del agonista sintético GW3965 (GW). Cuando las células transfectadas fueron tratadas con el agonista sintético GW se observó un incremento de la actividad del reportero de aproximadamente 1,90 veces (***: $P < 0.001$). Cuando las células transfectadas fueron tratadas con las fracciones FZC1-FZC16, se observó un incremento estadísticamente significativo en la actividad del reportero de aproximadamente 1,79 veces generado por la fracción FZC14 respecto al vehículo, siendo esta la fracción con la mayor actividad. Con los resultados obtenidos, las fracciones que presentaron actividad agonista de LXR comparada contra el agonista GW3965, son las fracciones FZC1, FZC2, FZC14 y FZC15 (Sandoval *et al.*, 2015; Sodhi & Singh, 2013). Nuestros resultados concuerdan con el estudio de Valencia (2017), donde se probaron extractos etanólicos pertenecientes a las familias Lauraceae, Rutaceae y Myristicaceae, en las cuales se determinó que los extractos de las especies especie, *Zanthoxylum rohifolium* presentó actividad agonista de LXR. En otros estudios, Bustos (2021), estudio el efecto de los extractos de las especies *Z. martinicense*, *Zanthoxylum sp.*, *Z. rohifolium*, demostrando el potencial agonista LXR de las especies estudiadas. En

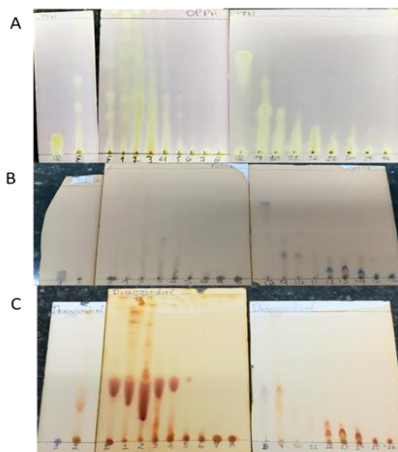
conclusión, se ha demostrado que tanto la familia Rutaceae como el género *Zanthoxylum* presentan potencial agonista de LXR, es importante tener en cuenta que en ninguno de los estudios previos se ha determinado los metabolitos responsables de la actividad agonista de LXR (Bustos, 2021).

2.3.3 Determinación de actividad antioxidante del extracto de *Z. caribaeum*

- **Determinación *in vitro* de la actividad captadora de radicales libres mediante el método DPPH**

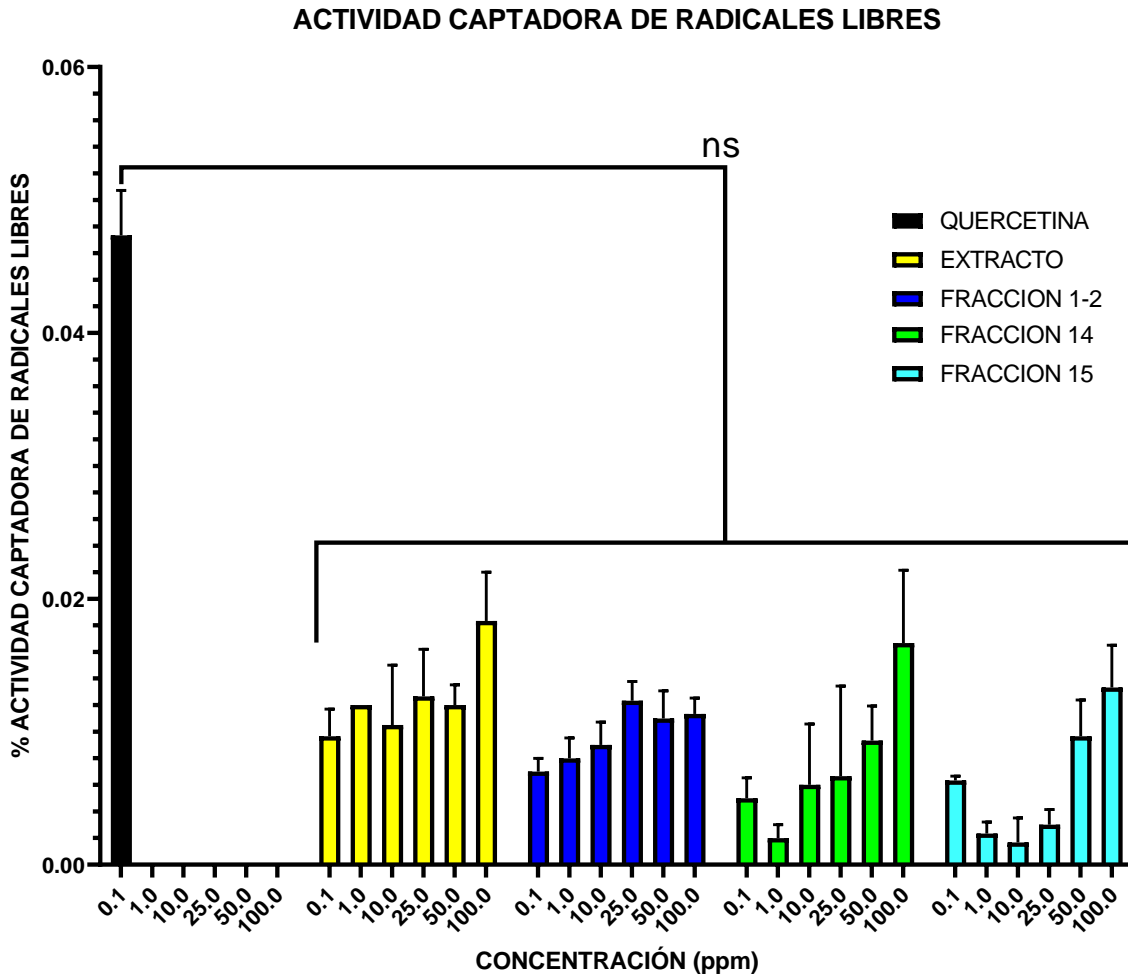
Al extracto etanólico y fracciones de la raíz de *Z. caribaeum*, se les realizó el análisis de actividad captadora de radicales libres utilizando al método DPPH. Primero, se le realizó un análisis cualitativo para determinar si el extracto y las fracciones a una concentración de 1000 ppm, presentan actividad antioxidante. En la figura **2.3.3-1** se observan los resultados de la bioautografía directa, las placas muestran que tanto el extracto como las fracciones, presentan actividad captadora de radicales libres, los compuestos activos presentan coloraciones amarillas debidas a la reacción con la solución del radical asperjada sobre la placa. Como control positivo se usó quercetina. Si comparamos la respuesta de las fracciones FZC1 a FZC 16 frente al DPPH con las cromatoplasmas obtenidas después de someter las fracciones a los reveladores específicos se puede atribuir la actividad observada a la por la presencia de compuestos con OH fenólico, en las fracciones, aunado a la presencia de alcaloides, ya que es conocido que algunos compuestos de tipo alcaloidal presentan actividades antioxidantes importantes tal como fue documentado en el capítulo 1 de esta tesis (Garro *et al.*, 2015; Sonboli *et al.*, 2010). En la figura **2.3.3-1** se presentan los resultados de la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH, comparada con los ensayos de coloración de fenoles y alcaloides.

Figura 2.3.3-1: Determinación del efecto captador de radicales libres del extracto de *Z. caribaeum* y las fracciones FZC1 A FZC16. A. Bioautografía con DPPH, (C+) Quercetina. B. Cromatoplaaca fracciones FZC1 A FZC16 revelada con cloruro férrico. (C+) Quercetina. C. Cromatoplaaca fracciones FZC1 A FZC16 revelada con Dragendorff (C+) Berberina.



A pesar de que todas las fracciones mostraron tener compuestos captadores de radicales libres, se seleccionaron para el ensayo cuantitativo aquellas que mostraron actividad agonista de LXR teniendo en cuenta que el objetivo de este *Screening* de actividad, es determinar el potencial multifuncional del extracto y en consecuencia de sus componentes. En la figura **2.3.3-2**, se presentan los resultados de actividad captadora de radicales en términos de porcentaje de las fracciones seleccionadas a partir de la actividad agonista LXR en las concentraciones seleccionadas.

Figura 2.3.3-2: Actividad Captadora de radicales libres de las fracciones agonistas de LXR del extracto etanólico de *Z. caribaeum*



Nota: En el eje Y se observa el % de la actividad captadora de radicales libres, en el eje X se observa la Quercetina (Negro) representa el control positivo. Las barras coloreadas corresponden al extracto y las fracciones evaluadas previamente seleccionadas respecto a las fracciones activas del ensayo de actividad agonista de LXR. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3 por cada experimento).

A las diferentes concentraciones ensayadas, se observa que tanto el extracto como las fracciones no muestran una buena actividad comparada contra el control positivo Quercetina a una concentración de 0,1 ppm, en la figura 2.3.3-2 se evidencia el efecto

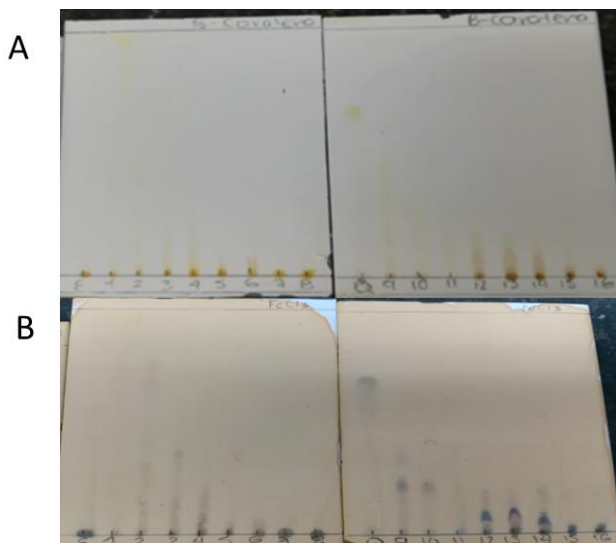
dosis-respuesta de las fracciones ensayadas. La actividad mostrada se puede atribuir a compuestos de tipo fenólicos o alcaloidales observados en los ensayos de coloración, los cuales reportan actividad antioxidante (Lara *et al.*, 2020; Ross *et al.*, 2008; Xu & Chang, 2007). Previamente se ha determinado que el género *Zanthoxylum* presenta actividad antioxidante (Guleria *et al.*, 2013; Mojica, 2021) gracias a componentes tales como flavonas, flavonoles, Xantonas (Lara *et al.*, 2020; Ross *et al.*, 2008; Tchinda *et al.*, 2009).

A pesar de que en el análisis químico de coloración realizado en esta investigación se detectó de forma clara la actividad antioxidante de los metabolitos presentes en las fracciones y el extracto, es probable que los compuestos presentes en las muestras objeto de este estudio sean estructuralmente distintos, o que existan efectos antagónicos y disminuyan la actividad del mismo. Estudios recientes en nuestro grupo de investigación han determinado que compuestos de tipo alcaloidal y derivados de ácido benzoico presentan actividad captadora de radicales libre (Mojica, 2021).

- **Determinación *in vitro* de la actividad antioxidante mediante el método β - caroteno del extracto**

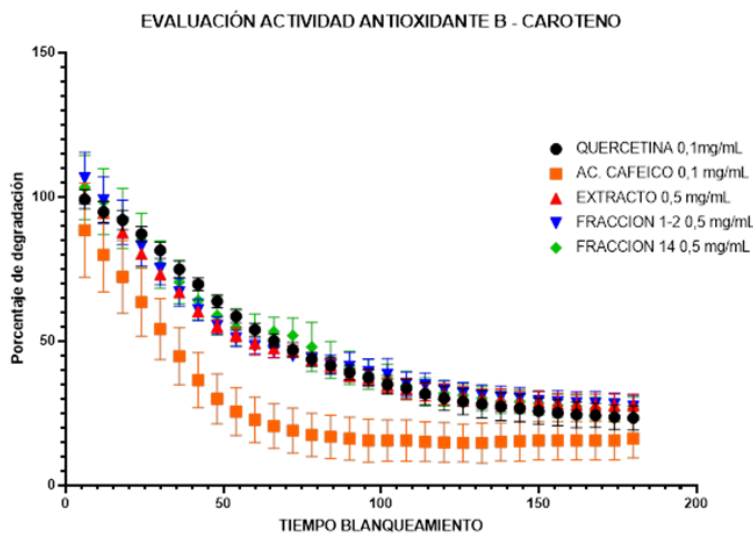
Al extracto etanólico crudo de la raíz de *Z. caribaeum* y a sus fracciones, se les realizó el análisis de actividad antioxidante mediante el método β – caroteno. El sistema que contiene β -caroteno y ácido linoleico, promueve la formación de radicales libres peroxilo, debido a la oxidación del ácido linoleico inducida por el calor que blanquea el β -caroteno en la emulsión (Ndhlala, Moyo, & Van Staden, 2010). El mecanismo de reacción implica que los radicales libres del ácido graso formados por la sustracción de un átomo de hidrógeno de uno de sus grupos metilenos atacan las moléculas de β -caroteno las cuales pierden sus dobles enlaces que les da la característica de su color anaranjado en estado reducido (Lai, & Lim, 2011); por tanto el blanqueo de carotenoides vía oxidación inducida por calor y la decoloración resultante puede ser inhibida o disminuida por los antioxidantes que donan átomos de hidrógeno para neutralizar radicales (Dawidowicz, & Olszowy, 2010; Leon-García & Reyes-Zaquinala, 2017). En la figura **2.3.3-3** se presentan los resultados de la bioautografía directa con β -Caroteno.

Figura 2.3.3-3: Determinación cualitativa del efecto protector de la peroxidación lipídica del extracto y las fracciones de *Z. caribaeum*. A. Bioautografía directa con β -Caroteno. B. Cromatoplaca revelada con FeCl_3 .



Los compuestos que ejercen protección en la reacción de peroxidación lipídica generada en el bioensayo, se presentan como manchas de color amarillo sobre la placa de TLC, si comparamos las zonas de la bioautografía que presentan la coloración indicativo de la actividad protectora con la cromatoplaca de TLC revelada con FeCl_3 , podemos concluir que son los compuestos fenólicos los responsables del efecto de la protección observada en la mayoría de las fracciones. Las fracciones con el mayor efecto agonista de LXR se sometieron al ensayo cuantitativo para determinar el efecto de las fracciones frente a la degradación del β -caroteno, los resultados se presentan en la figura 2.3.3-4.

Figura 2.3.3-4: Evaluación de la actividad protectora de la peroxidación lipídica del extracto etanólico de *Z. caribaeum*



Nota: En el eje Y se observa el % de degradación del β - caroteno, en el eje X se observa el tiempo de blanqueamiento del β - caroteno con el uso de Quercetina (Negro) y ácido cafeico (anaranjado) como controles positivos y el extracto y las fracciones (Rojo, azul y verde) previamente seleccionadas respecto a las fracciones activas del ensayo de actividad agonista de LXR. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes ($n=3$ por cada experimento).

El ensayo de decoloración de β -caroteno es uno de los métodos más antiguos y con mayor número de reportes para determinar la actividad antioxidante de especies capaces de inhibir la peroxidación lipídica. Como se describió en la sección 2.1.2.6. durante el ensayo se emplea una emulsión acuosa de ácido linoléico y el β -caroteno, el uso de esta emulsión genera limitantes en razón a que por solubilidad en algunos casos se podría subestimar la actividad de sustancias antioxidantes que por su estructura presentan fenómenos de repulsión hidrofóbica, razón por la cual se observa un importante porcentaje de degradación del β -caroteno en el tiempo, este efecto no se esperaba en razón a que los resultados de la bioautografía directa con β -caroteno en la cual se observan compuestos que pueden tener efecto protector de la peroxidación lipídica. En estudios previos, se ha determinado que extractos del género *Zanthoxylum* tienen efecto protector sobre la peroxidación lipídica (Bustos, 2021; Guleria *et al.*, 2013) y más específicamente,

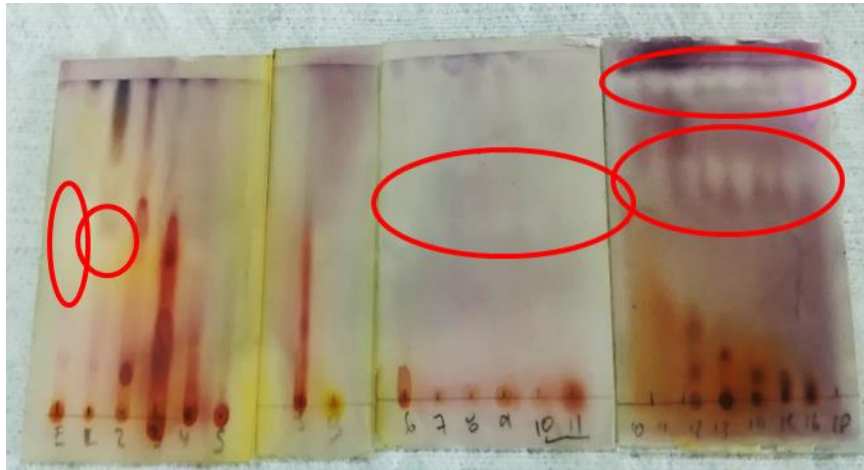
compuestos alcaloidales y ácidos de la especie *Z. caribaeum* presentan este mismo efecto (Mojica, 2021).

El aumento de radicales libres conduce a mayor deterioro cognitivo y muerte neuronal, ya que se vincula directamente con el aumento de la acumulación de Tau, A β , daños mitocondriales, desregulación lipídica, en ese sentido el extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* y las fracciones evaluadas son fuente de PN con potencial multifuncional debido a la acción captadora de radicales, protectora de peroxidación, y el efecto agonista de LXR, determinadas en este capítulo.

2.3.4 Determinación *in vitro* de la actividad inhibitoria de colinesterasas del extracto y fracciones

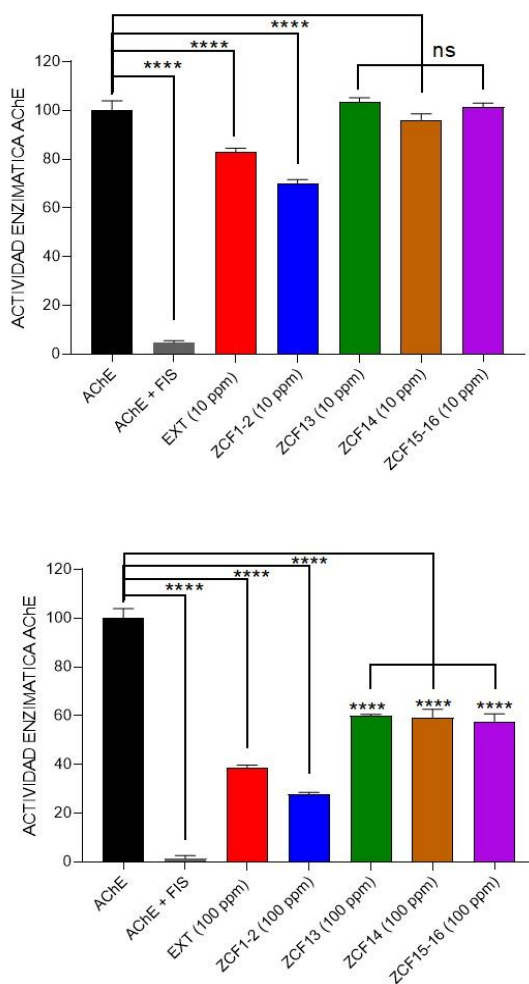
Al extracto etanólico y fracciones de la raíz de *Z. caribaeum*, se les realizó el análisis de actividad inhibitoria de colinesterasas. Primero, se realizó un análisis cualitativo para determinar si el extracto y las fracciones presentan actividad inhibitoria frente a AChE a una concentración de 1 mg/mL. Como se observa en la figura **2.3.4-1**, el extracto como algunas de las fracciones, presentan una decoloración en la placa desarrollada por la inhibición de la hidrolisis del ester del acetato de α naftilo, mediada por la enzima AChE, lo que indica una actividad inhibitoria de colinesterasas; esta actividad se puede explicar probablemente por la presencia de grupos alcaloidales presentes en las muestras evaluadas; previamente, se ha reportado que los alcaloides son responsables de realizar esta actividad inhibitoria según lo descrito por Carpinella (2010)(Plazas *et al.*, 2018).

Figura 2.3.4-1: Análisis cualitativo del extracto y fracciones por el análisis de actividad inhibitoria de colinesterasas.



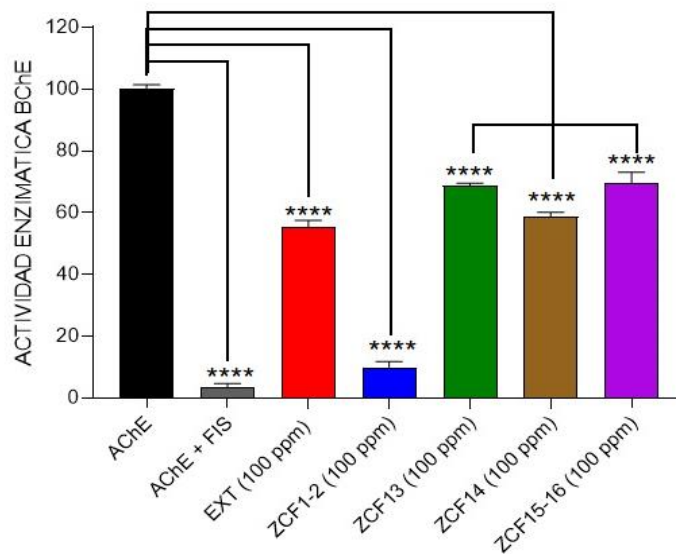
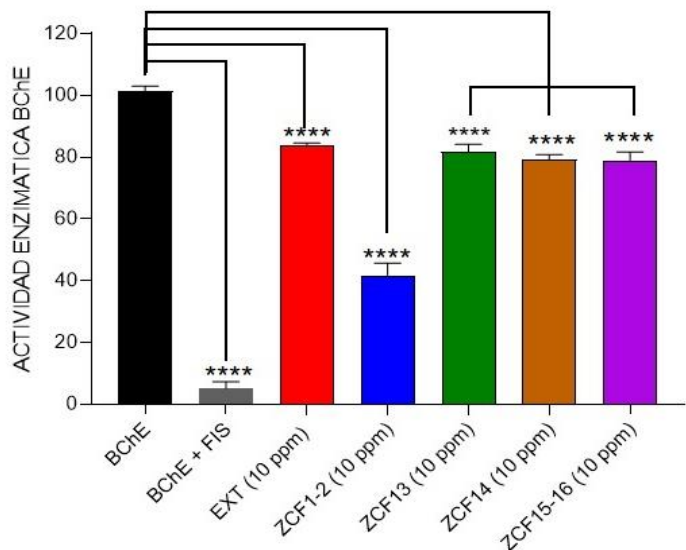
Las fracciones seleccionadas por su potencial multifuncional FZC1, 2, 13, 14, 15 y 16, se sometieron al ensayo colorimétrico de Ellman en busca de determinar el efecto inhibitorio de colinesterasas a dos concentraciones de trabajo. En la figura **2.3.4-2** y **2.3.4-3** se presentan los resultados de inhibición de colinesterasas ejercida por el extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* y las fracciones ensayadas.

Figura 2.3.4-2: Evaluación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasas a 100 ppm y 10 ppm



Nota: En el eje Y se observa el % de actividad enzimática mediada por la Acetilcolinesterasa, en el eje X se observa la actividad de la acetilcolinesterasa sin inhibidor (Negro), la actividad de la acetilcolinesterasa con el inhibidor fisostigmina (Gris), extracto (Rojo) y las fracciones evaluadas (Azul, verde, café y morado). Las barras coloreadas corresponden a las fracciones evaluadas previamente seleccionadas respecto a las fracciones activas del ensayo de actividad agonista de LXR. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3 por cada experimento). Las comparaciones contra la actividad enzimática se realizaron empleando una t de student * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Figura 2.3.4-3: Evaluación de la actividad inhibitoria de butirilcolinesterasa a 100 ppm y 10 ppm



Nota: En el eje Y se observa el % de actividad enzimática mediada por la Butirilcolinesterasa, en el eje X se observa la actividad de la butirilcolinesterasa sin inhibidor (Negro), la actividad de la butirilcolinesterasa con el inhibidor fisostigmina (Gris), extracto (Rojo) y las fracciones evaluadas (Azul, verde, café y morado). Las barras coloreadas corresponden a las fracciones evaluadas previamente seleccionadas respecto a las fracciones activas del ensayo de actividad agonista de LXR. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3 por cada experimento). Las comparaciones contra la actividad enzimática se realizaron empleando una t de student * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

Como control positivo en el ensayo se usó fisostigmina, el cual es un alcaloide de origen vegetal usado en el tratamiento de los síntomas en los primeros estadios de la EA, y que es reconocido como un efectivo inhibidor de colinesterasas. Después de analizar los resultados del ensayo colorimétrico de Ellman, se observa que únicamente la fracción FZC1-2 a una concentración de 100 ppm presenta una actividad inhibitoria similar frente a BChE comparada contra el control de fisostigmina, es importante anotar que las fracciones FZC 1-2, poseen mayor efecto inhibitorio de las colinesterasas comparado con el extracto crudo, lo cual implica que en el extracto existen compuestos que ejercen un efecto antagónico y disminuyen la actividad del mismo. A pesar de que en el análisis químico de coloración realizado en esta investigación se detectó de forma clara la presencia de compuestos de tipo alcaloidal, es importante tener en cuenta que en estudios previos reportados por nuestro grupo de investigación (Plazas *et al.*, 2019), el extracto de raíz de *Z.caribaeum* objeto de esta investigación posee una menor actividad comparada con otras especies del género, cuyo estudio químico ha permitido determinar la presencia de alcaloides de tipo berberinico, y benzofenetridínico, de los cuales se conoce, su efectiva acción inhibitoria de colinesterasas y el modo de unión en el sitio activo de la enzima (Plazas *et al.*, 2020), es probable que los compuestos alcaloidales presentes en las fracciones y el extracto objeto de este estudio sean estructuralmente distintos, o que existan efectos antagónicos.

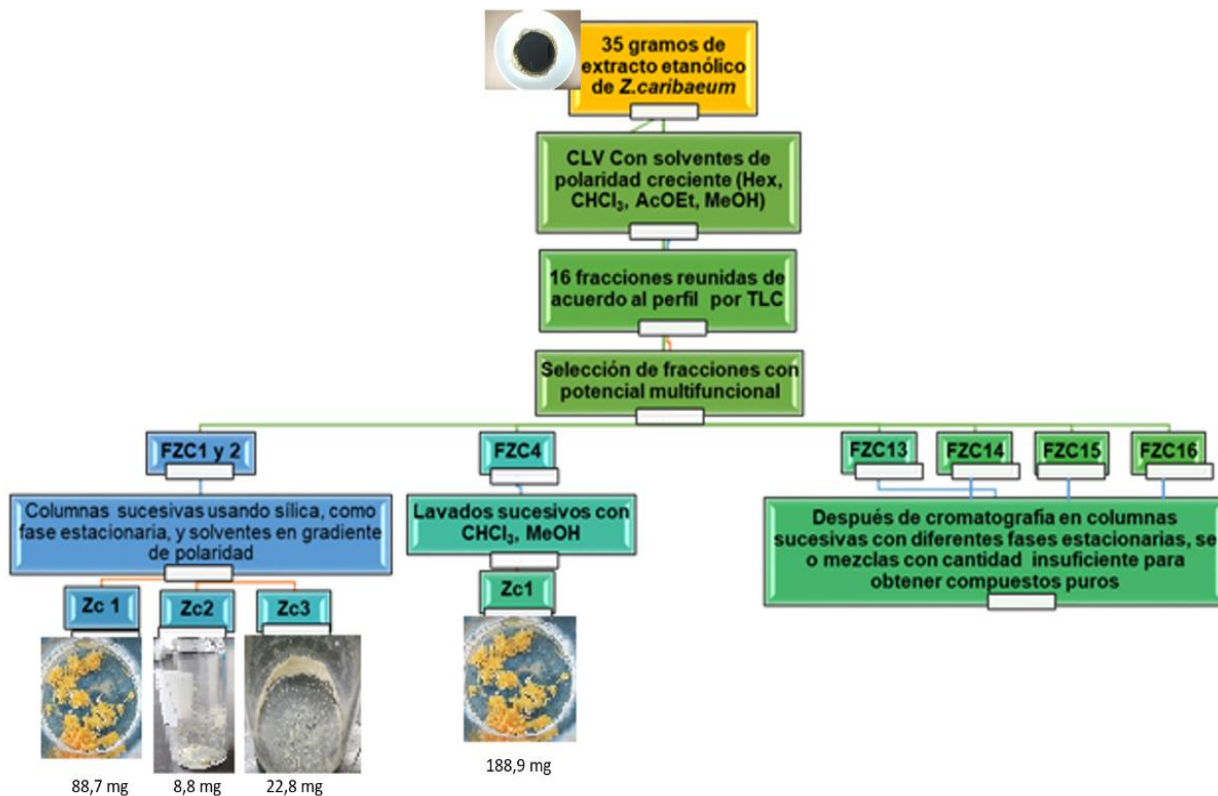
Es importante considerar que la enzima Acetilcolinesterasa (AChE), también llamada colinesterasa verdadera, cataliza la hidrólisis de sustratos pequeños (grupos acetilo) y la Butirilcolinesterasa (BChE) o pseudo-colinesterasa, cataliza la hidrolisis de diferentes grupos (acetilo, butilo, benzoilo); la actividad de BChE aumenta progresivamente a medida que avanza la demencia, mientras que la actividad de AChE disminuye. Por lo tanto, inhibir la BChE es un mejor blanco terapéutico que puede proporcionar beneficios en la cognición (Lane *et al.*, 2006). Según la anterior información, en la fracción FZC1-2 se puede evidenciar la presencia de metabolitos prometedores para la inhibición de colinesterasas, por lo cual, es una de las fracciones seleccionadas para continuar con el proceso de purificación.

2.3.5 Purificación de las fracciones seleccionadas por su potencial multifuncional

El análisis de los resultados de la actividad captadora de radicales libres, inhibidora de peroxidación lipídica, agonista de LXR, e inhibidora de colinesterasas, permitió concluir que efectivamente el extracto de raíz de *Z. caribaeum*, posee potencial efecto sobre diferentes dianas terapéuticas relacionadas con la EA, de esta forma en busca de determinar algunos de los compuestos presentes en las fracciones de interés, se realizó un proceso de purificación utilizando técnicas cromatográficas preparativas de purificación sucesivas, en busca de aislar los compuestos y realizar su posterior identificación estructural mediante el uso de técnicas espectroscópicas, y/o espectrométricas.

A continuación en la figura 2.3.5-1 se presenta el diagrama de obtención de los compuestos aislados:

Figura 2.3.5-1: Diagrama de obtención de los compuestos ZC1 a ZC3.



Durante la reunión de las fracciones FZC1 - FZC16, se detectó la presencia de sólido en la fracción FZC4, se procedió a realizar lavados del sólido, con cloroformo, seguido de metanol y secado por destilación a presión reducida en rotavapor, hasta obtener cristales de color amarillo claro (88,7 mg), el compuesto obtenido fue denominado ZC1, este compuesto fue aislado posteriormente mediante columnas sucesivas a partir del procedimiento de purificación de las fracciones FZC1 y 2.

La fracción FZC1 (2,50g) se reunió con la fracción FZC2 (2,36g) al observar una similitud entre ellas en el TLC y la actividad agonista de LXR para posteriormente ser sometida a un fraccionamiento por medio de cromatografía flash sucesivas, utilizando como fase móvil un sistema de solventes CHCl_3 :AcOEt en gradiente de polaridad y silica gel (230-400 mesh) como fase estacionaria obteniendo los compuestos ZC2 (8,8mg) y la mezcla ZC3 (22,8 mg).

Las fracciones FZC13, FZC14, FZC15, FZC16, se sometieron a columnas flash sucesivas, cromatografía en columna por gravedad, y cromatografía en columna usando sephadex, sin embargo la complejidad de las fracciones y las cantidades impidieron la obtención de compuestos puros.

▪ **Identificación estructural de los compuestos aislados**

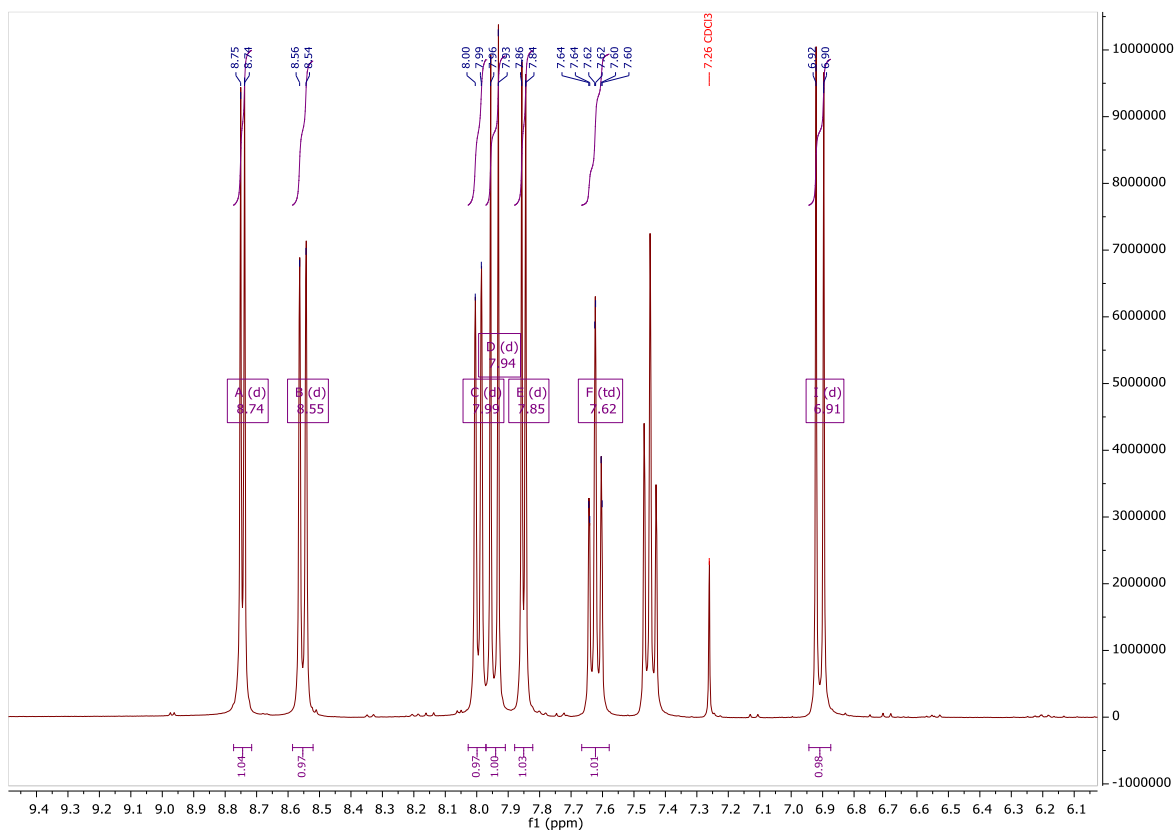
A partir del extracto etanólico de raíz de *Z. caribaeum* se aislaron dos compuestos y una mezcla, de los cuales uno de ellos posee un núcleo alcaloidal, una cromona, y una mezcla de esteroides. La estructura molecular de los compuestos aislados fue determinada mediante el método de Resonancia magnética nuclear (RMN) 1D Y 2D, así como se realizó adicionalmente la comparación de los datos espectroscópicos con los reportados en la literatura.

Compuesto ZC1

El compuesto ZC1 fue obtenido como un sólido cristalino amarillo con un punto de fusión de 146-148°C, que presenta reacción positiva inmediata con el reactivo de Dragendorff lo cual hace presumir que corresponde a un compuesto de naturaleza alcaloidal. El espectro

de RMN ^1H muestra de un compuesto aromático debido a los desplazamientos químicos observados a campo bajo, se evidencia la presencia de señales en δ_{H} 7,85 (1H, d, $J=5,02$ Hz) y 8,74 (1H, d, $J=5,01$ Hz), características por su desplazamiento, multiplicidad, y constante con hidrógenos de un anillo furánico, los cuales en el experimento 1H-1H COSY correlacionan entre ellos mismos y no poseen correlación con otros hidrógenos de la molécula. El análisis de las señales en δ_{H} 8.56 (1H, $J=8.2$ Hz, d); 7.99 (1H, $J=7.7$ Hz, d); 7.62 (1H, $J=7.9$ Hz- 1Hz, dt), 7.45 (1H, $J=7.6$ Hz- 1Hz, dt) en el espectros de RMN ^1H , y en el ^1H - ^1H COSY, indica la presencia de un sistema aromático ABCD (Crews, 1999). Finalmente las señales en δ_{H} 7.93 (1H, $J= 9.73$ Hz, d) y 6.9 (1H, $J=9.8$ Hz, d) corresponden a dos protones de anillo aromático en posición orto. En la figura 2.3.5-2 se presenta el espectro de RMN 1H del compuesto ZC1.

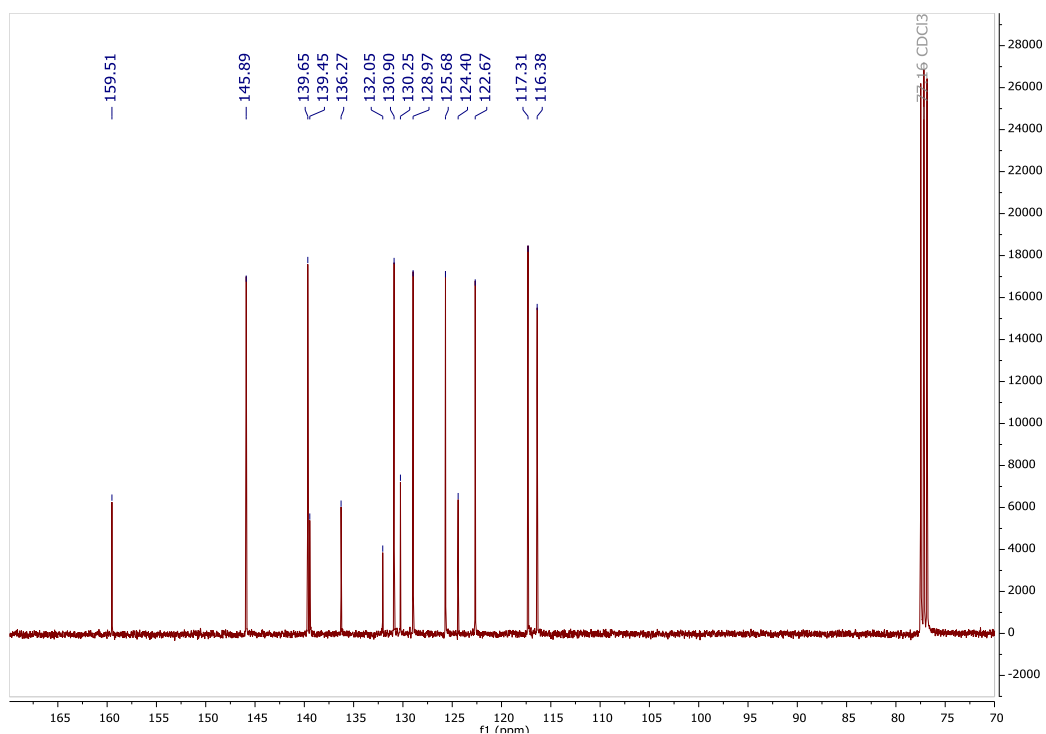
Figura 2.3.5-2: Espectro RMN ^1H del compuesto ZC1



El espectro de RMN ^{13}C , figura 2.3.5-3 muestra la presencia de 14 carbonos, de los cuales por su desplazamiento se determina la presencia de dos carbonos unidos a oxígeno de

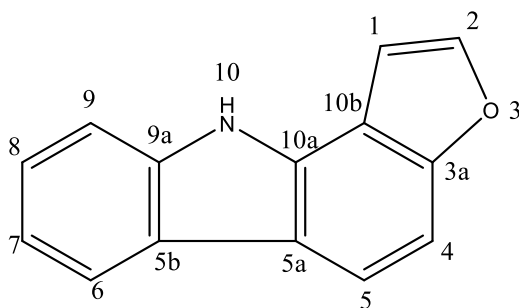
acuerdo a su desplazamiento (δ_c 159.5, y 145.9), dos carbonos unidos a nitrógeno (δ_c 139.6, y 136), lo que conduce a establecer la presencia de un nitrógeno heterocíclico.

Figura 2.3.5-3: Espectro RMN ^{13}C del compuesto ZC1



La comparación de los desplazamientos de carbono e hidrogeno con lo reportado en la literatura, junto a las correlaciones de los experimentos bidimensionales permitieron confirmar la identidad del compuesto ZC1 como 10*H*-furo[3,2-*a*]carbazol (Fig. 2.3.5-1), el cual ya había sido aislado de la corteza y la madera de la especie. (Macias, 2007). En la tabla 2.3.5-1 se presentan las asignaciones de RMN ^1H y ^{13}C del Compuesto ZC1.

Figura 2.3.5-4: Compuesto ZC1: 10H-furano [3,2-a] carbazol

Tabla 2.3.5-1: Datos de RMN ^1H y ^{13}C ZC1

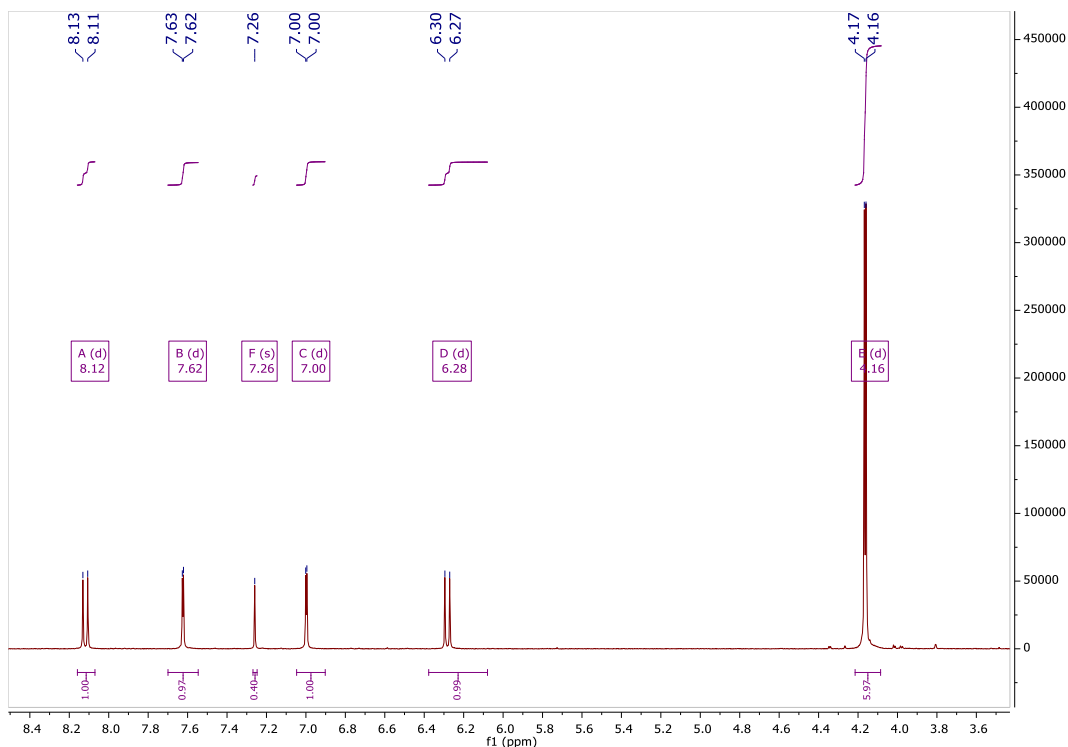
C	ppm ^{13}C	δ (ppm) ^1H	J Hz	Mult	APT
1	116.38	7.85	5.02	d	CH
2	145.9	8.74	5.01	d	CH
3a	159.5	-	-	-	C
4	139.4	7.93	9.73	d	CH
5	128.9	6.9	9.8	d	CH
5a	130.2	-	-	-	C
5b	124.4	-	-	-	C
6	117.3	8.56	8.2	d	CH
7	125.7	7.45	7.6-1	dt	CH
8	130.9	7.62	7.9-1	dt	CH
9	122.6	7.99	7.7	d	CH
9a	139.6	-	-	-	C
10a	136	-	-	-	C
10b	132.0	-	-	-	C

Compuesto ZC2

El compuesto ZC2 fue obtenido como un sólido cristalino blanco con un punto de fusión de 133-135°C. El espectro de RMN ^1H muestra en δ_{H} 8,12 (1H, $J=9,82$ Hz, d) y 6,28 (1H, $J=9,76$ Hz, d), estas señales son características por su desplazamiento, multiplicidad y

constante, a protones olefinicos en posición –*Cis*, las señales en δ_H 7,62 (1H, $J=2,34$ Hz, d) y 7,00 (1H, $J=2,31$ Hz, d), características de dos protones aromáticos en posición meta; finalmente se evidencian señales de dos grupos metoxi en δ_H 4,16(3H, s), 4,17 (3H, s). En la figura 2.3.5-5 se presenta el espectro de RMN 1H del compuesto ZC2.

Figura 2.3.5-5: Espectro RMN 1H del compuesto ZC2



El espectro de RMN ^{13}C muestra 11 señales de carbonos, de los cuales uno es carbono carbonílico que por su desplazamiento se asigna a un carbonilo de ester α,β -insaturado. En la figura 2.3.5-6 se presenta el espectro de RMN ^{13}C del compuesto ZC2. Las señales de hidrógeno, y carbono, comparadas con lo reportado en la literatura son características de un compuesto de tipo cromona. Los desplazamientos, acoplamientos, y el patrón de oxigenación de la estructura permiten sugerir al compuesto ZC2 como: 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona (Fig. 2.3.5-7). En la tabla 2.3.5-2 se presentan las asignaciones de RMN 1H y ^{13}C del Compuesto ZC2.

Figura 2.3.5-6: Espectro RMN 13C del compuesto ZC2

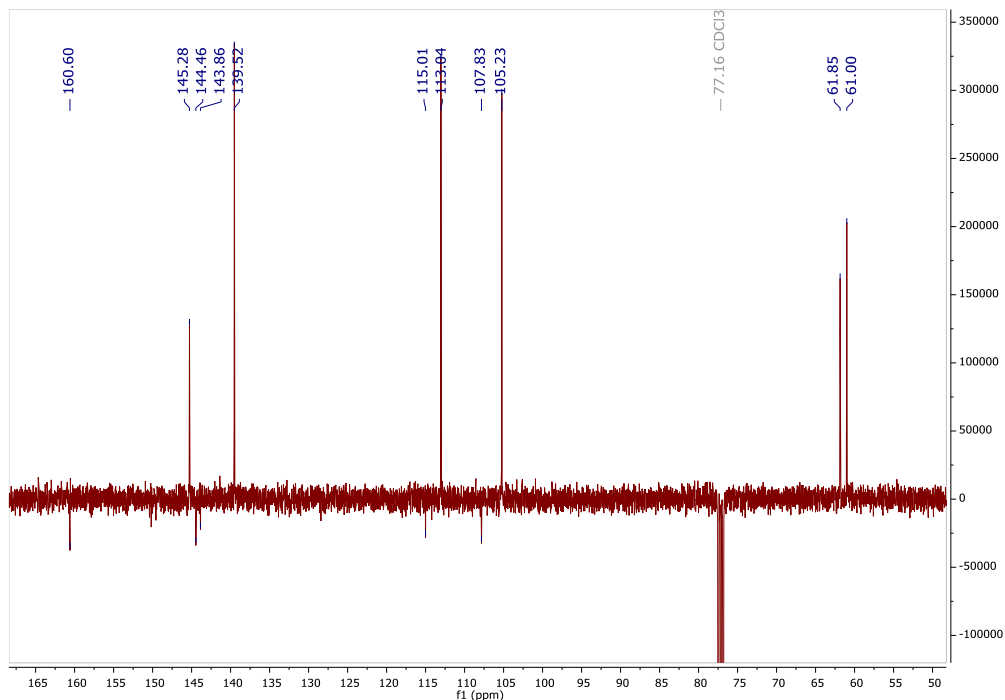


Figura 2.3.5-7: Compuesto ZC2: 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona

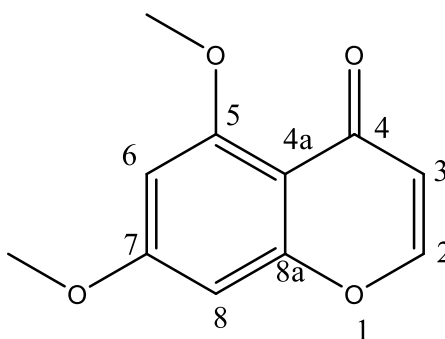


Tabla 2.3.5-2: Datos de RMN ^1H y ^{13}C ZC2

C	ppm ^{13}C	δ (ppm) ^1H	J Hz	Mult	APT
2	145,28	8,12	9,81	d	CH
3	113,04	6,28	9,78	d	CH
4	160,60	-	-	-	C
4a	115,01	-	-	-	C
5	144,46	-	-	-	C
6	107,83	7,62	2,33	d	CH
7	143,86	-	-	-	C
8	105,23	7,00	2,31	d	CH
8a	139,52	-	-	-	C
OCH ₃	61,85	4,16		s	CH ₃
OCH ₃	61,00	4,17		s	CH ₃

Compuesto ZC3

El compuesto ZC3 fue obtenido como un sólido cristalino color crema. El espectro de RMN ^1H muestra apariencia característica de compuestos tipo esteroles, por la presencia de señales en la región de δ_{H} 0,67 a δ_{H} 2,32 correspondiente a hidrógenos de metilos y metilenos del esqueleto de los esteroides. Además, se observa la señal septeto en δ_{H} 3,52 característica del hidrogeno en la posición 3 del esteroles (Macías, 2007; Muñoz, 2008). Se observan señales en δ_{H} 5,02, δ_{H} 5,14, δ_{H} 5,35 atribuidas a los protones olefinicos del esqueleto esteroidal. En la figura **2.3.5-8** se presenta el espectro de RMN ^1H y en la figura **2.3.5-9** el espectro de ^{13}C de ZC3

Figura 2.3.5-8: Especto RMN ¹H de ZC3

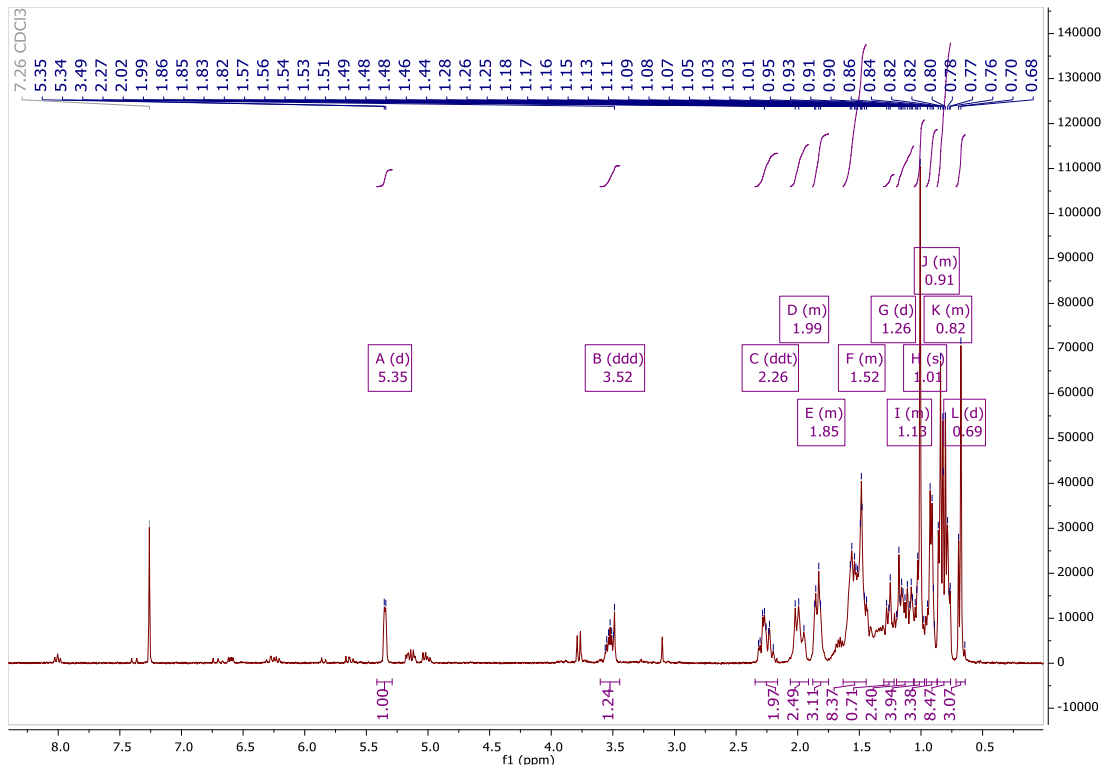
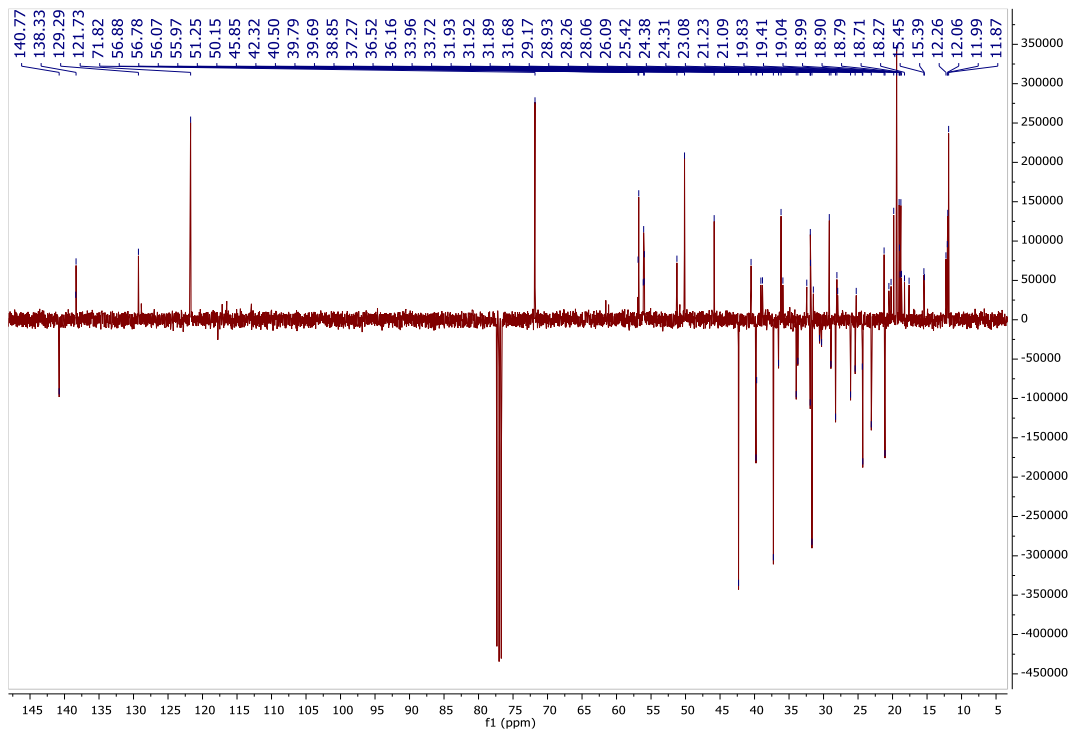
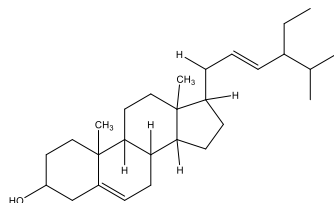
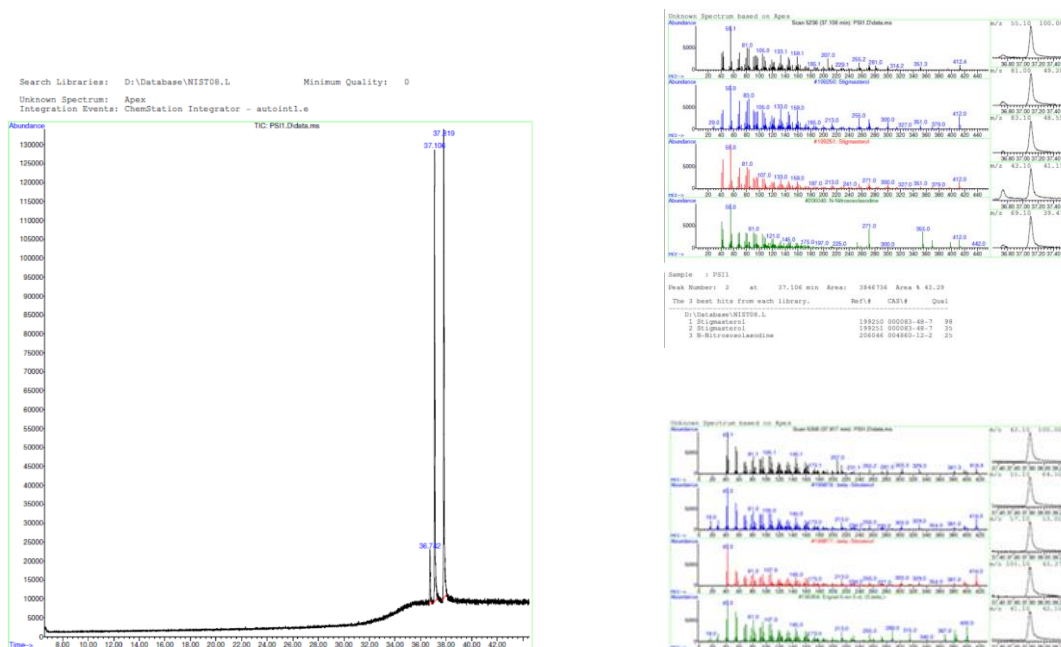


Figura 2.3.5-9: Especto RMN ¹³C de ZC3

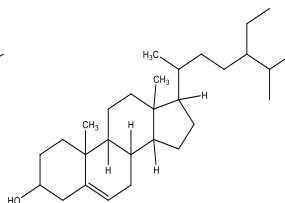


BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS CON POTENCIAL
NEUROPROTECTOR PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER A PARTIR DE UNA ESPECIE DEL GÉNERO *Zanthoxylum*
caribaeum (RUTACEAE)

El análisis de los espectros de RMN de ZC3, permitió inferir que no se trataba de un compuesto puro, por lo cual se decidió someter la muestra a un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de gases (CG-EM). El cromatograma obtenido se presenta a continuación, en el cual se ve claramente la existencia de una mezcla, la comparación del espectro de masas por impacto electrónico de los compuestos de la mezcla con la base de datos del equipo permitió determinar la presencia de Estigmasterol (43.3%) y Sitosterol (51.4%). La presencia de estos compuestos se había reportado previamente en la especie *Z. caribaeum* (Macias Villamizar *et al.*, 2007).



Estigmasterol

 β - Sitosterol

3. Capítulo 3 – Evaluación de la actividad biológica

Los mecanismos moleculares involucrados en la EA son múltiples, por lo cual la actividad biológica potencialmente terapéutica a ser evaluada depende en gran medida de la vía de interés. En este capítulo el interés se centró en la búsqueda de moléculas agonistas de LXR, antiagregantes de A β y neuroprotectores frente al Paraquat (PQ). Teniendo en cuenta que en trabajo paralelo se realizan otras evaluaciones incluyendo en modelos animales transgénicos.

Las células similares a neuroblastos SH-SY5Y son un subclon de la línea celular parental de neuroblastoma SK-N-SH. Las células SH-SY5Y tienen un cariotipo estable que consta de 47 cromosomas y se pueden diferenciar de un estado similar a un neuroblasto a neuronas humanas maduras a través de una variedad de mecanismos diferentes que incluyen el uso de ácido retinoico (RA), ésteres de forbol y neurotrofinas específicas como las derivadas del cerebro. La evidencia previa sugiere que el uso de diferentes métodos puede seleccionar subtipos de neuronas específicas, como las neuronas adrenérgicas, colinérgicas y dopaminérgica (Shiple *et al.*, 2016).

Cuando se diferencian, estas células extienden largos procesos ramificados, disminuyen en la proliferación y, en algunos casos, se polarizan. Se ha demostrado previamente que las células SH-SY5Y completamente diferenciadas expresan una variedad de diferentes marcadores de neuronas maduras (Kovalevich & Abstract, 2013; Shipley *et al.*, 2016).

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Ensayo de MTT

Al final de cada experimento, para medir la viabilidad celular o determinar concentraciones de trabajo para posteriores ensayos, se realizó ensayo de MTT. En resumen, se

adicionaron 10 μ l de solución stock MTT (5mg/ml in PBS) se adicionaron a cada pozo, seguido de incubación por 2-3h a 37°C en un ambiente húmedo con 5% CO₂, 95% (v/v) aire. Luego de la incubación, el medio se remueve, las células se lisan y el producto formazan azul se solubiliza mediante adición de 200 μ l de buffer de lisis de MTT (20% w/v SDS, 50% v/v dimetilformamida en agua destilada, pH 4.7). Los platos se calientan a 60°C por 20min, y luego se dejan a temperatura ambiente por 30min en la oscuridad antes de medir la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm en un lector de platos de espectrofotometría de múltiples pozos, contra un blanco de buffer de lisis. Células no tratadas se usan como un control positivo. La supervivencia celular se calcula como: % supervivencia = 100 (X / control), donde X es el promedio de la lectura del metabolismo de MTT en un grupo de tratamiento (Liu & Peterson, 1997; Stockert *et al.*, 2012; Supino, 1995).

3.1.2 Ensayo de actividad del gen reportero

La línea celular HEK293 fue cultivada en medio DMEM hasta una confluencia del 70%, se tripsinizó, y posteriormente se suspendieron las células a una densidad de 10.000 células/pozo, se sembraron las células en una caja de 96 pozos, se incubaron las cajas durante 24 horas, posteriormente se removió el medio de siembra y se reemplazó por el tratamiento en medio sin suplementar, se incubó durante 24h y posteriormente se adicionaron 10 μ L de solución 5mg/mL de MTT a cada pozo, se incubó durante 4h a 37°C, hasta obtener un precipitado morado visible, posteriormente se retiró el medio y se solubilizaron los cristales con 100 μ L de solución de Buffer de lisis para MTT, se agitaron las cajas en un agitador orbital a una velocidad de 60 – 90rpm, durante 15min y se registraron las absorbancias en un lector multiplaca a 550nm.

Se cultivó la línea celular HEK293 en medio DMEM hasta una confluencia del 70%, se tripsinizó, y posteriormente se sembraron las células a una densidad de 10.000 células/pozo, se en cajas de 96 pozos, se incubaron durante 24h, posteriormente se removió el medio de siembra y se reemplazó por una mezcla de transfección; la cual consiste en lipofectamina y los plásmidos (GFP 1,6 ng, LXR 6,6 ng, LUC 33,3 ng) disueltos en Optimem. Se incubó durante 24 horas y posteriormente se removió el medio de siembra y se reemplazó por el tratamiento en medio sin suplementar, se incubó durante 24 horas y

posteriormente se retiró el medio, se adicionó el Kit de Luciferasa (Pierce Firefly Luc One-Step Glow Assay Kit. Lot: UE283385) y finalmente se registró la absorbancia en un lector multiplaca Thermo Fisher Scientific Fluoroskan FL a λ 550 nm.

3.1.3 Ensayo de neuroprotección

Inicialmente se realizó un ensayo de MTT dosis respuesta con el extracto y las moléculas puras para determinar las concentraciones de trabajo para los ensayos de neuroprotección. Las concentraciones de trabajo se definieron como dosis subletales superiores al 80% de la viabilidad celular. Durante el ensayo se consideró neuroprotector los compuestos que presentaron diferencias estadísticamente significativas protegiendo la reducción de la viabilidad celular causada por PQ en la línea celular SHSY5Y. En detalle el procedimiento fue el siguiente:

Se cultivó la línea celular SH-SY5Y en medio DMEM F12 hasta una confluencia del 70%, se tripsinizó, y posteriormente se continuo con el procedimiento descrito para el ensayo de actividad del gen reportero descrito en el numeral 3.1.2.

3.1.4 Ensayo fluorométrico antiagregante de A β 42

Los resultados obtenidos por (Ruiz, 2021; Vega, 2021) respecto a la reducción de la carga amiloide se asociaron con un incremento de la inmunoreactividad para ApoE en animales 3xTg-AD, y por lo tanto con una mayor actividad LXR. Para determinar si los compuestos obtenidos de *Z. caribaeum* se asocian con la reducción de A β , se realizó el ensayo anti-agregante de A β usando Tioflavina T (ThT) como ayudante en la detección de los oligómeros de A β .

El ensayo fluorométrico antiagregante de A β 42 permite inferir la capacidad de una molécula de inhibir la agregación del péptido A β . Consiste en la evaluación de la cinética de la agregación mediante la medición de la intensidad de la fluorescencia a Ex/Em = 440nm/484nm emitida por la tioflavina T (ThT). La ThT es el marcador más comúnmente utilizado para la detección de fibrillas de amiloide; es un colorante fluorescente de la familia de los benzotiazoles que genera un incremento de la fluorescencia, al unirse a los agregados A β . Inicialmente se prepararon las soluciones de trabajo de acuerdo con la tabla

3.1.4-1:

Tabla 3.1.4-1: Reactivos de trabajo del ensayo antiagregante A β

Reactivo	Stock*	[M]	Solvente	Vol/pozo
Buffer fosfato (pH= 7.5)	10 mM pH 7,2/150mM NaCl		En agua MiliQ filtrada por membrana de 0,22 μ m	-
Tioflavina T (ThT)	20 mM	20 μ M	Agua MiliQ filtrada por membrana de 0,22 μ m	25 μ L
Beta-Amyloid A β ₄₂	22 μ M	5 μ M	Buffer fosfato 10 mM pH 7,2/150 mM NaCl	50 μ L
Control positivo: Ácido tánico	10 mM	10 μ M	DMSO	25 μ L

Posterior a la preparación de las soluciones de trabajo, se adicionaron 75 μ L de solución de trabajo de los compuestos a una concentración 4X en cada pozo, 7 μ L de solución de trabajo ThT (80 μ M), 150 μ L de solución de trabajo A β 42 (20 μ M). Inmediatamente se comenzó a medir la intensidad de la fluorescencia a 26°C con Ex/Em = 485nm/538nm y se agitó durante 10 segundos entre lecturas para facilitar la agregación. La adquisición de los datos se realizó cada 5 minutos durante 5 horas (Almeida & Brito, 2020).

3.1.5 Análisis estadístico

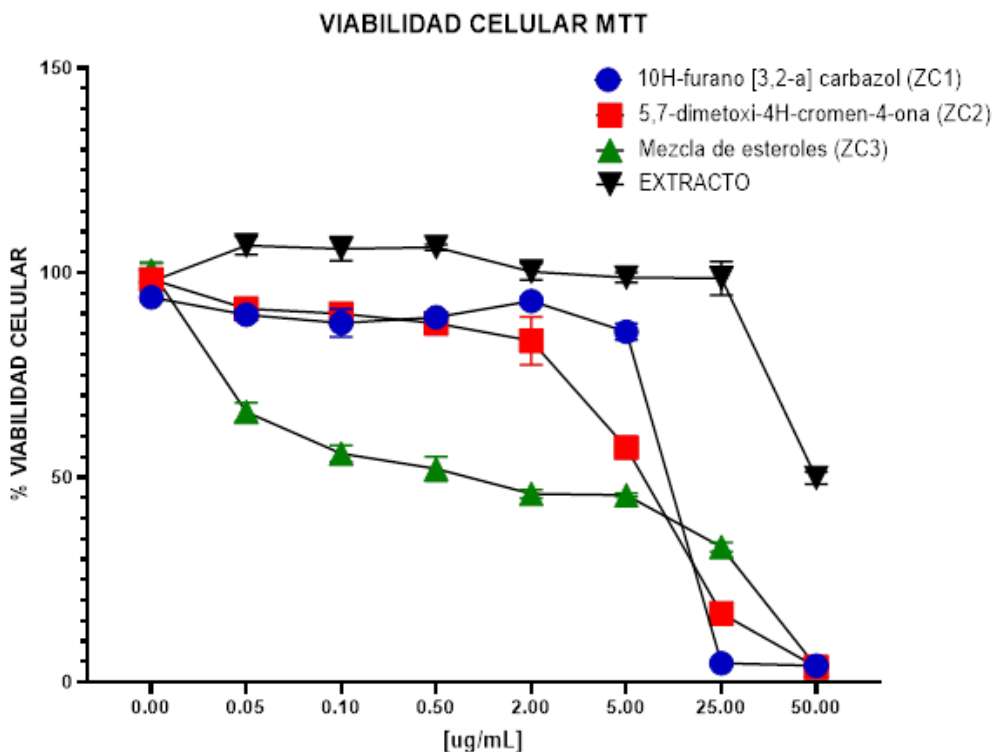
Cada experimento se realizó por triplicado, los resultados, se expresaron como el promedio \pm SEM. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas así: *: p<0.05; **: p<0.05 ***: p<0.001 ****: p<0.0001 ns: no significativo. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software Graph Pad Prism 8.

3.2 Resultados

3.2.1 Los metabolitos obtenidos del extracto de *Z. caribaeum* presentan actividad neuroprotectora

Los compuestos 10H-furano [3,2-a] carbazol (ZC1), 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona (ZC2) y la mezcla de esteroides (ZC3) aislados de *Z. caribaeum* y su extracto etanólico fueron evaluados en células SH-SY5Y frente al PQ. Inicialmente se determinaron las concentraciones de trabajo con una dosis subletal mayor al 80% (Fig 3.2.1-1), se seleccionaron tres concentraciones administradas como pretratamiento a la línea celular SH-SY5Y, las cuales se encuentran en la tabla 3.2.1-1.

Figura 3.2.1-1: Viabilidad celular por el método de MTT del extracto y compuestos aislados de *Z. caribaeum*



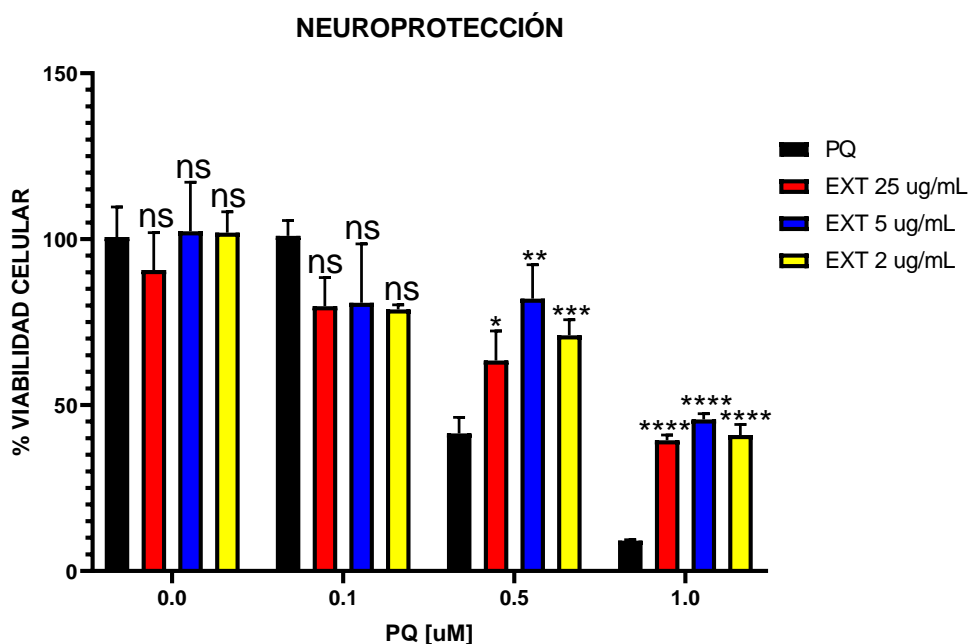
Nota: La viabilidad celular se evaluó por MTT, se graficó el % de viabilidad celular en función de la concentración del extracto (Negro), 10H-furano [3,2-a] carbazol (Azul), 5,7 - dimetoxi-4H-cromen-4-ona (Rojo), mezcla de esteroides (Verde). Los datos se representaron como la media \pm SEM de replicas por cada experimento.

Tabla 3.2.1-1: Concentraciones de trabajo obtenidas por MTT para el extracto y los compuestos aislados de *Z. caribaeum*

COMPUESTO	CONCENTRACIONES DE TRABAJO		
	[1]	[2]	[3]
10H-furano [3,2-a] carbazol (ZC1)	24,13mM 5µg/mL	4,83mM 1µg/mL	2,41mM 0,5µg/mL
5,7-dimetoxi-4H-cromen-2-ona (ZC2)	2,44mM 0,5µg/mL	0,48mM 0,1µg/mL	0,25mM 0,05µg/mL
Mezcla de esteroides (ZC3)	0,5µg/mL	0,1µg/mL	0,05µg/mL
EXTRACTO	25µg/mL	5 µg/mL	2µg/mL

El potencial neuroprotector del extracto (Fig 3.2.1-3) fue determinado frente a PQ (1µM, 0,5µM y 0,1µM); se observó inicialmente el efecto neurotóxico del PQ (Barras negras) con un efecto dosis respuesta, que a una concentración de 0,5µM produce una disminución en la viabilidad celular de aproximadamente el 50%, mientras que la dosis de 1µM produce una disminución en la viabilidad celular de aproximadamente el 90%. Por su parte, el extracto presenta efecto neuroprotector en las 3 concentraciones de estudio ante las concentraciones de 0,5 y 1µM de PQ mostrando una recuperación en la viabilidad celular estadísticamente significativa, lo que se observa en mayor medida en la mayor dosis de PQ (****: $P < 0.0001$).

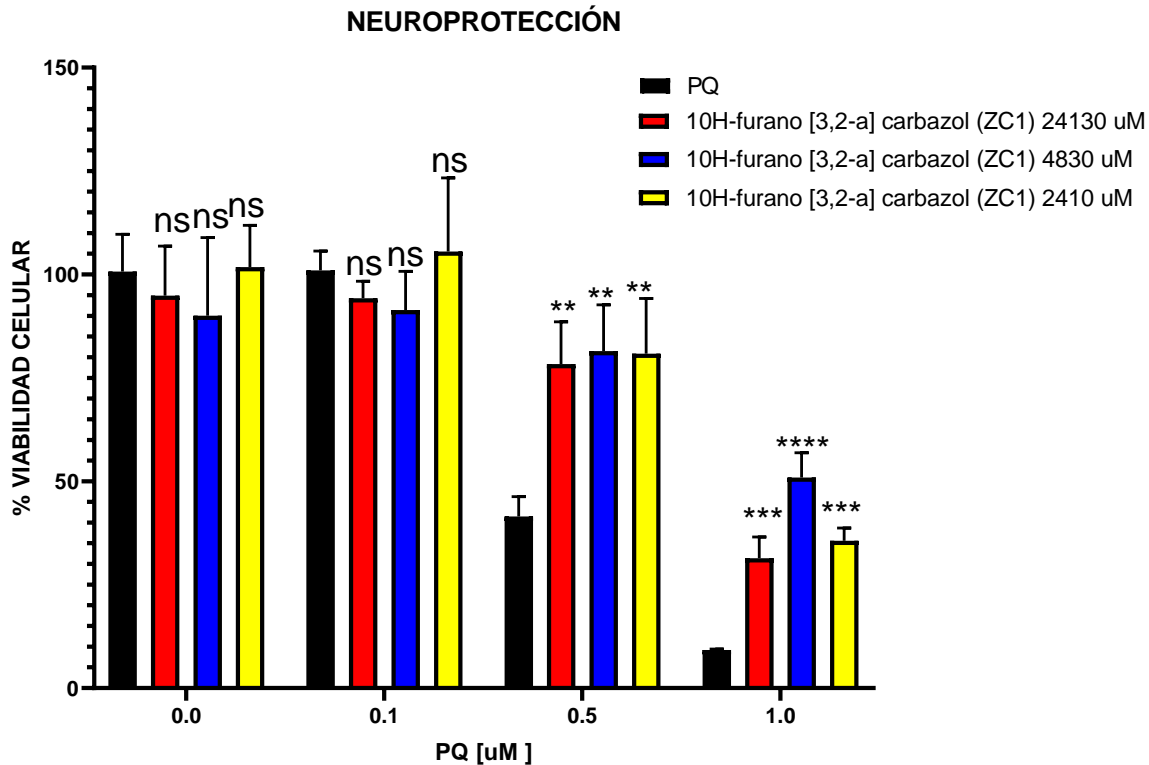
Figura 3.2.1-2: Efecto neuroprotector del extracto de *Z. caribaeum* en líneas celulares SHSY5Y.



Nota: La neuroprotección se evaluó mediante ensayo de viabilidad celular por MTT, se graficó el % de viabilidad celular en función de la concentración del paraquat (PQ), los colores de las barras indican las concentraciones de los pretratamientos con las diferentes concentraciones del extracto a 2 (amarillo), 5 (azul) y 25 (rojo) en µg/ml. Los datos representan la media \pm SEM de tres replicas por experimento. Las comparaciones contra la viabilidad celular por el PQ se realizaron empleando un ANOVA de una vía* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

El potencial neuroprotector del compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol (ZC1) (Fig 3.2.1-4), fue determinado frente a PQ (1µM, 0,5µM y 0,1µM); se observó inicialmente el efecto neurotóxico del PQ (Barras negras) con un efecto dosis respuesta, que a una concentración de 1 µM produce una disminución en la viabilidad celular del 90%. Por su parte, 10H-furano [3,2-a] carbazol presenta efecto neuroprotector en las 3 concentraciones de estudio ante las concentraciones de 0,5 y 1µM de PQ mostrando una recuperación en la viabilidad celular estadísticamente significativa a la concentración de 1µM PQ y 4,83mM del compuesto ($P < 0.0001$) y a la concentración de 0,5µM PQ y las 3 concentraciones del compuesto ($P < 0.05$)

Figura 3.2.1-3: Efecto neuroprotector de 10H-furano [3,2-a] carbazol en líneas celulares SHSY5Y.

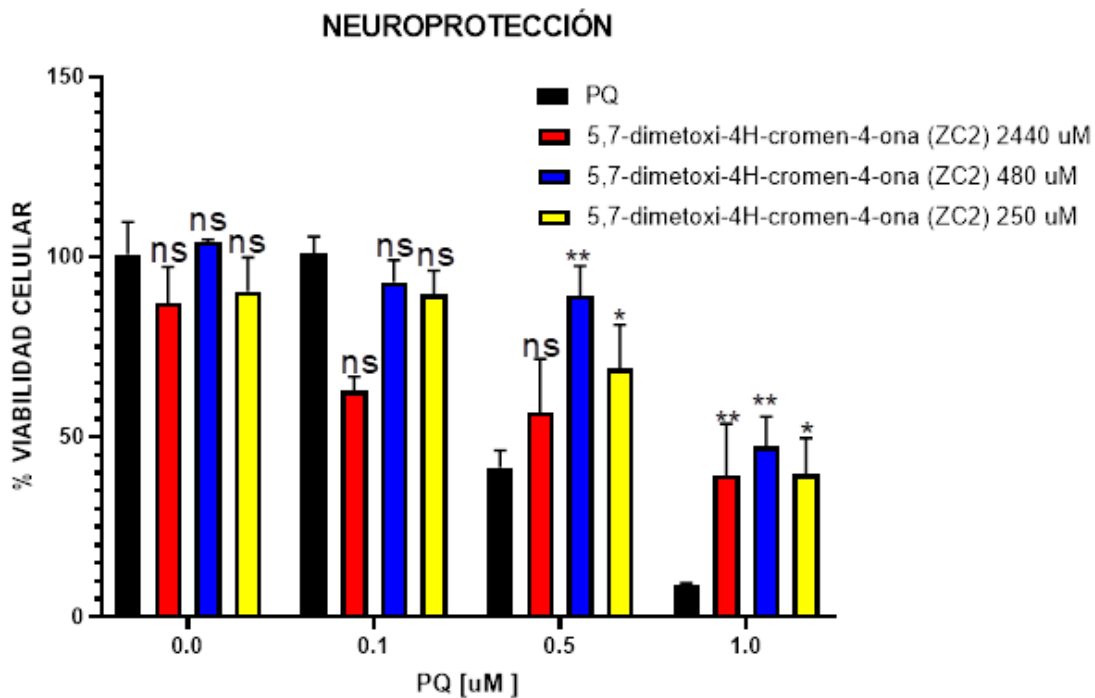


Nota: La neuroprotección se evaluó mediante ensayo de viabilidad celular por MTT, se graficó el % de viabilidad celular en función de la concentración del paraquat (PQ), los colores de las barras indican las concentraciones de los pretratamientos con las diferentes concentraciones del compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol a 2410 (amarillo), 4830 (azul) y 24130 (rojo) en μM . Los datos representan la media \pm SEM de tres replicas por experimento. Las comparaciones contra la viabilidad celular por el PQ se realizaron empleando un ANOVA de una vía* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

El potencial neuroprotector del compuesto 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona (ZC2) (Fig 3.2.1-5), fue determinado frente a PQ (1 μM , 0,5 μM y 0,1 μM); al igual que en el anterior resultado se observó inicialmente el efecto neurotóxico del PQ (Barras negras). Por su parte, 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona presenta efecto neuroprotector en las 3 concentraciones de

estudio ante las concentraciones de 0,5 y 1µM de PQ mostrando una recuperación en la viabilidad celular estadísticamente significativa a la concentración de 0,48mM del compuesto (**: P<0.05). Lo anterior sugiere que no hay efecto dosis respuesta y que esta dosis es suficiente para lograr el efecto neuroprotector ante el neurotóxico PQ.

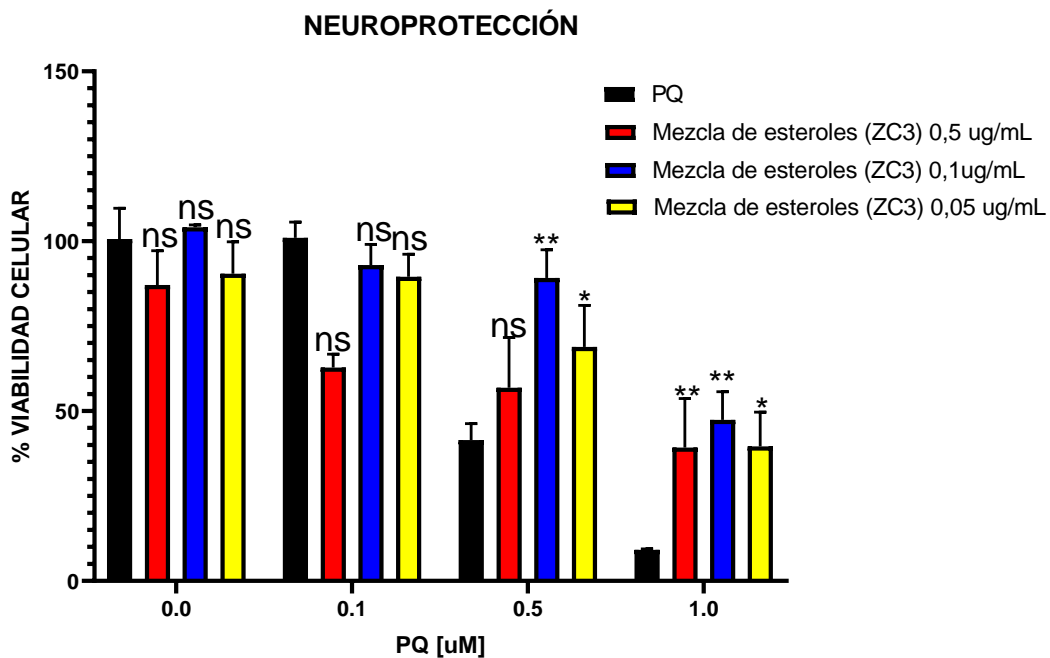
Figura 3.2.1-4: Efecto neuroprotector de 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona en líneas celulares SHSY5Y.



Nota: La neuroprotección se evaluó mediante ensayo de viabilidad celular por MTT, se graficó el % de viabilidad celular en función de la concentración del paraquat (PQ), los colores de las barras indican las concentraciones de los pretratamientos con las diferentes concentraciones del compuesto 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona a 250 (amarillo), 480 (azul) y 2440 (rojo) en µM. Los datos representan la media ± SEM de tres replicas por experimento. Las comparaciones contra la viabilidad celular por el PQ se realizaron empleando un ANOVA de una vía* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

El potencial neuroprotector del compuesto la mezcla de esteroides (ZC3) (Fig 3.2.1-6), observando que presenta efecto neuroprotector en las 3 concentraciones de estudio ante las concentraciones de 0,5 y 1 μ M de PQ mostrando una recuperación en la viabilidad celular estadísticamente significativa a la concentración de 0,1 μ g/mL del compuesto (**: P<0.05). Lo anterior sugiere que no hay efecto dosis respuesta y que esta dosis es suficiente para lograr el efecto neuroprotector ante el neurotóxico PQ.

Figura 3.2.1-5: Efecto neuroprotector de la mezcla de esteroides en líneas celulares SHSY5Y



Nota: La neuroprotección se evaluó mediante ensayo de viabilidad celular por MTT, se graficó el % de viabilidad celular en función de la concentración del paraquat (PQ), los colores de las barras indican las concentraciones de los pretratamientos con las diferentes concentraciones de la mezcla de esteroides a 0,05 (amarillo), 0,1 (azul) y 0,5 (rojo) en μ g/mL. Los datos representan la media \pm SEM de tres replicas por experimento. Las

comparaciones contra la viabilidad celular por el PQ se realizaron empleando un ANOVA de una vía* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.2.2 Los metabolitos obtenidos del extracto de *Z. caribaeum* activan el receptor LXR

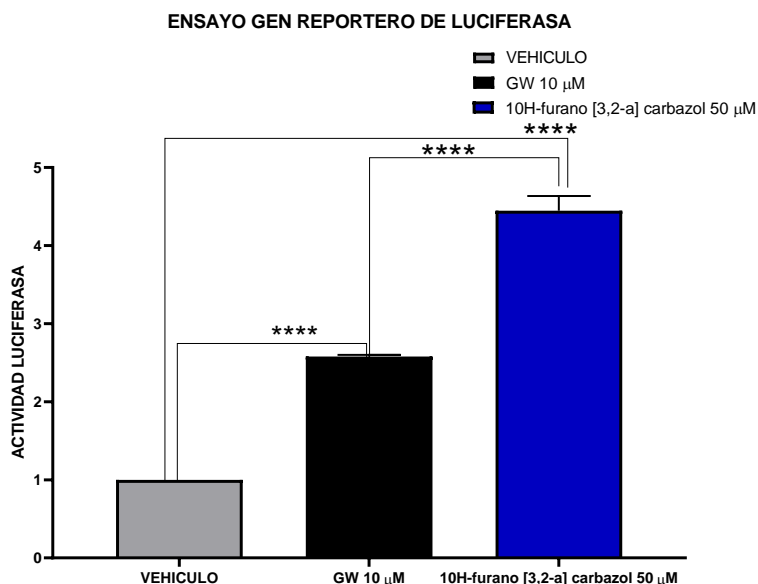
Inicialmente se obtuvieron las concentraciones de trabajo en la línea celular HEK293 de los metabolitos aislados de la raíz de *Z. caribaeum* mediante ensayo de MMT. Los resultados se encuentran en la tabla 3.2.2-1:

Tabla 3.2.2-1: Concentraciones de trabajo obtenidas por MTT para los compuestos aislados de *Z. caribaeum*.

COMPUESTO	CONCENTRACION DE TRABAJO
10H-furano [3,2-a] carbazol (ZC1)	0,05mM
5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona (ZC2)	0,05mM
Mezcla de esteroides (ZC3)	0,5µg/mL

La actividad agonista de LXR se evaluó por medio del ensayo de gen reportero, utilizando como reportero el gen de la Luciferasa de acuerdo con lo mencionado en la metodología. Para el análisis del compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol (ZC1) (Figura 3.2.2-1), se observa en gris (vehículo) el resultado de la actividad luciferasa basal, obtenida en células transfectadas con los plásmidos sin presencia del agonista sintético GW3965 (GW). Cuando las células transfectadas fueron tratadas con el agonista sintético GW se observó un incremento de la actividad del reportero de aproximadamente 2,6 veces ($P < 0.0001$). Cuando las células transfectadas fueron tratadas con el compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol, se observó un incremento estadísticamente significativo en la actividad del reportero de aproximadamente 3,45 veces (****: $P < 0.0001$) respecto al vehículo y de 1,61 veces respecto al agonista GW.

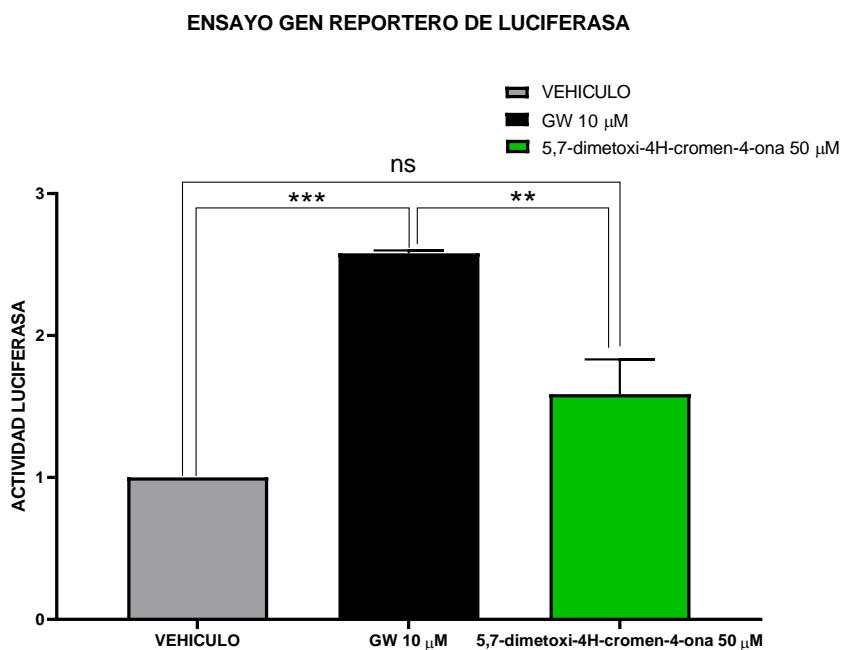
Figura 3.2.2-1: Efecto agonista del gen reportero de luciferasa de 10H-furano [3,2-a] carbazol en líneas celulares HEK293



Nota: Ensayo de gen reportero de Luciferasa en línea celular HEK293. Se grafico la tasa de cambio en % de la actividad Luciferasa para el compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol (Azul) normalizado respecto al vehículo (Gris). El control positivo fue el agonista sintético GW3965 (GW; negro). Los datos se representan como la media \pm SEM realizado por triplicado, seguido de una prueba de comparaciones multiples por t-student, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

En cuanto al compuesto 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona (ZC2) (Figura 3.2.2-2), se observa en gris el resultado de la actividad Luciferasa basal, obtenida en células transfectadas con los plásmidos sin presencia del agonista GW. Cuando las células transfectadas fueron tratadas con el agonista sintético GW se observó un incremento de la actividad del reportero de aproximadamente 2,6 veces ($P < 0.0001$). Cuando las células transfectadas fueron tratadas con el compuesto 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona, no se observaron cambios en la actividad respecto al vehículo.

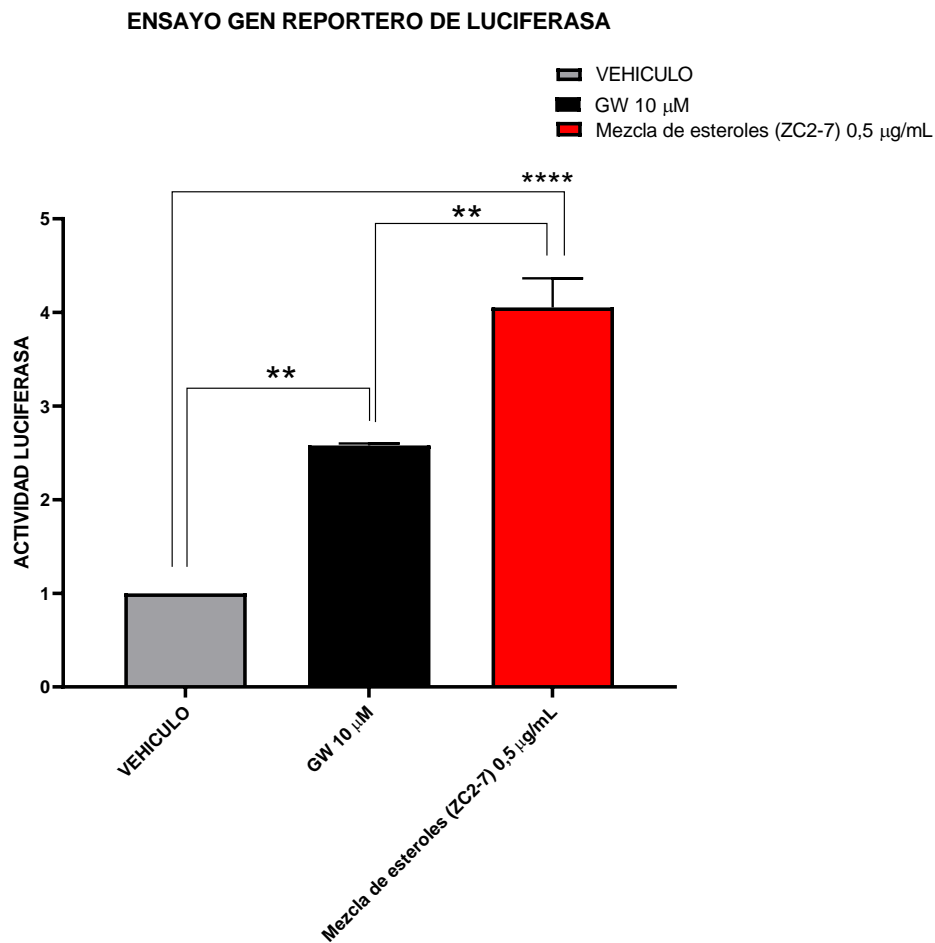
Figura 3.2.2-2: Efecto agonista del gen reportero de luciferasa de 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona en líneas celulares HEK293



Nota: Ensayo de gen reportero de Luciferasa en línea celular HEK293. Se grafico la tasa de cambio en % de la actividad Luciferasa para el compuesto 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona (Verde) normalizado respecto al vehículo (Gris). El control positivo fue el agonista sintético GW3965 (GW; negro). Los datos se representan como la media \pm SEM realizado por triplicado, seguido de una prueba de comparaciones multiples por t-student, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

En cuanto a la mezcla de esteroides (ZC3) (Figuras **3.2.2-3**), se observó un incremento estadísticamente significativo en la actividad del reportero de aproximadamente 3,45 veces ($P < 0.0001$) respecto al vehículo y de 1,57 veces respecto al agonista GW.

Figura 3.2.2-3: Efecto agonista del gen reportero de luciferasa de la mezcla de esteroides en líneas celulares HEK293



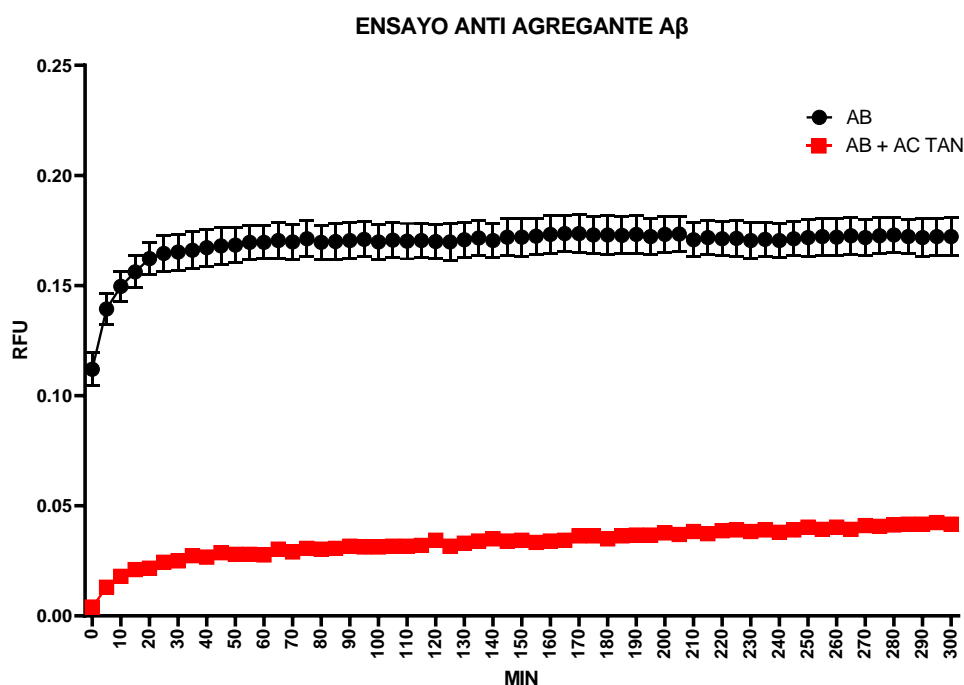
Nota: Ensayo de gen reportero de Luciferasa en línea celular HEK293. Se grafico la tasa de cambio en % de la actividad Luciferasa para la mezcla de esteroides (Rojo) normalizado respecto al vehículo (Gris). El control positivo fue el agonista sintético GW3965 (GW; negro). Los datos se representan como la media \pm SEM realizado por triplicado, seguido de una prueba de comparaciones múltiples por t-student, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.2.3 Los metabolitos obtenidos del extracto de raíz de *Z. caribaeum* presentan actividad antiagregante de A β

Capacidad antiagregante de A β 42

Los compuestos 10H-furano [3,2-a] carbazol (ZC1), 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona (ZC2) y la mezcla de esteroides (ZC3), aislados de *Z. caribaeum*, fueron evaluados a una concentración de 100 μ M, obteniendo los siguientes resultados. Se observa inicialmente, la estandarización del modelo la cinética de agregación del A β (Fig 3.2.3-1), donde se observó un incremento de la fluorescencia para el péptido en presencia de ThT en el tiempo. Por otro lado, cuando se realiza el ensayo en presencia de un inhibidor de la agregación de A β utilizado como control de antiagregación, se observa que se inhibió de manera eficaz la agregación del péptido reduciendo la fluorescencia del complejo A β -ThT.

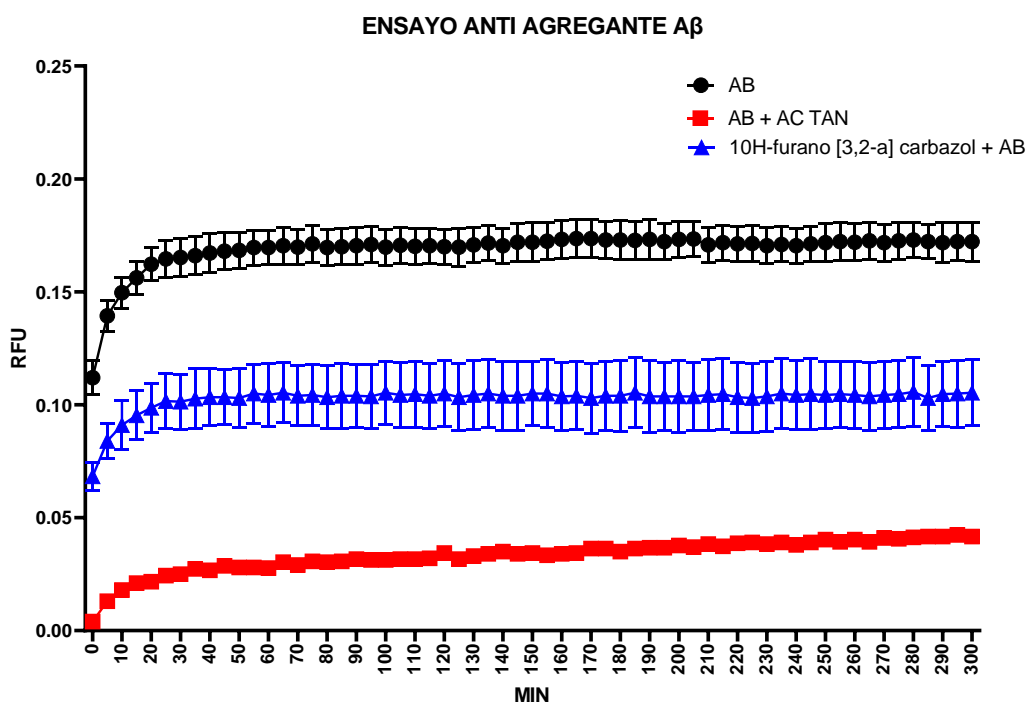
Figura 3.2.3-1: Cinética de agregación del péptido A β



Nota: La cinética de agregación del péptido A β se evaluó mediante la RFU (Unidad de fluorescencia relativa), se graficó la RFU en función del tiempo de agregación sin antiagregante (Negro) y la agregación del péptido A β con el antiagregante ácido tánico (Rojo). Los datos se representaron como la media \pm SEM de replicas por cada experimento.

Respecto al compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol (ZC1) (Figura 3.2.3-2), se observa en azul el resultado de la actividad antiagregante del compuesto. Se evidencia una disminución de aproximadamente 0,6 veces la agregación del péptido A β respecto al control de agregación de A β (círculos negros) a lo largo del tiempo de ensayo.

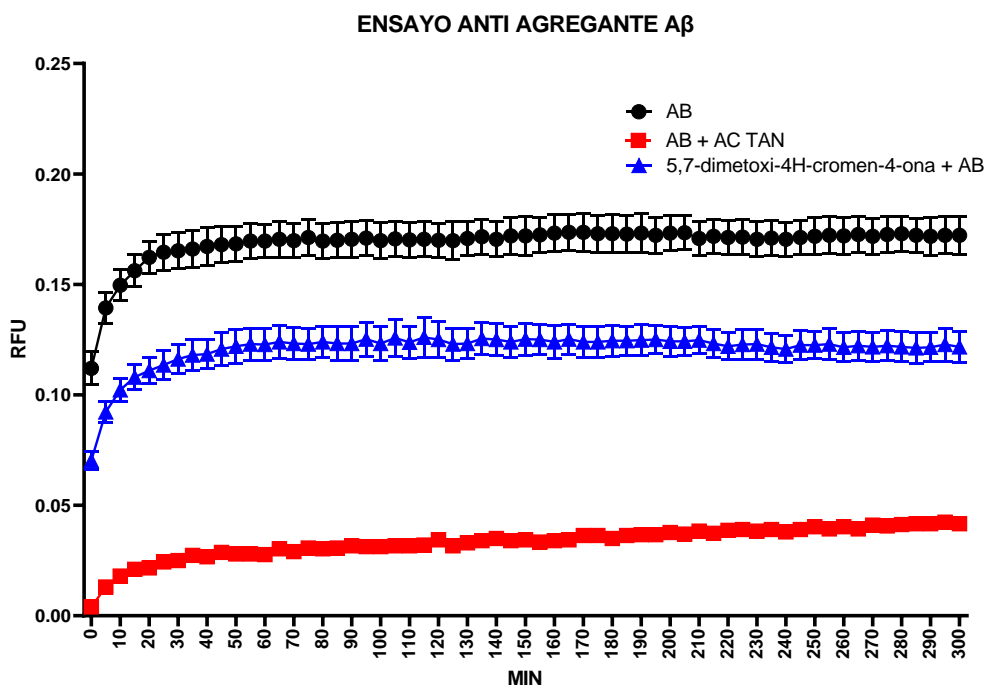
Figura 3.2.3-2: Actividad antiagregante del compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol, analizado mediante el ensayo de detección por ThT.



Nota: La cinética de agregación del péptido A β se evaluó mediante la RFU (Unidad de fluorescencia relativa), se graficó la RFU en función del tiempo de agregación sin antiagregante (Negro), la agregación del péptido A β con el antiagregante ácido tánico (Rojo) y la agregación del péptido A β con compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol (Azul). Los datos se representaron como la media \pm SEM de replicas por cada experimento.

Para el análisis del compuesto 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona (ZC2) (Figura 3.2.3-3), se observa en azul el resultado de la actividad antiagregante del compuesto. Se evidencia una disminución de aproximadamente 0,73 veces la agregación del péptido A β respecto al control de agregación de A β (círculos negros) a lo largo del tiempo de estudio.

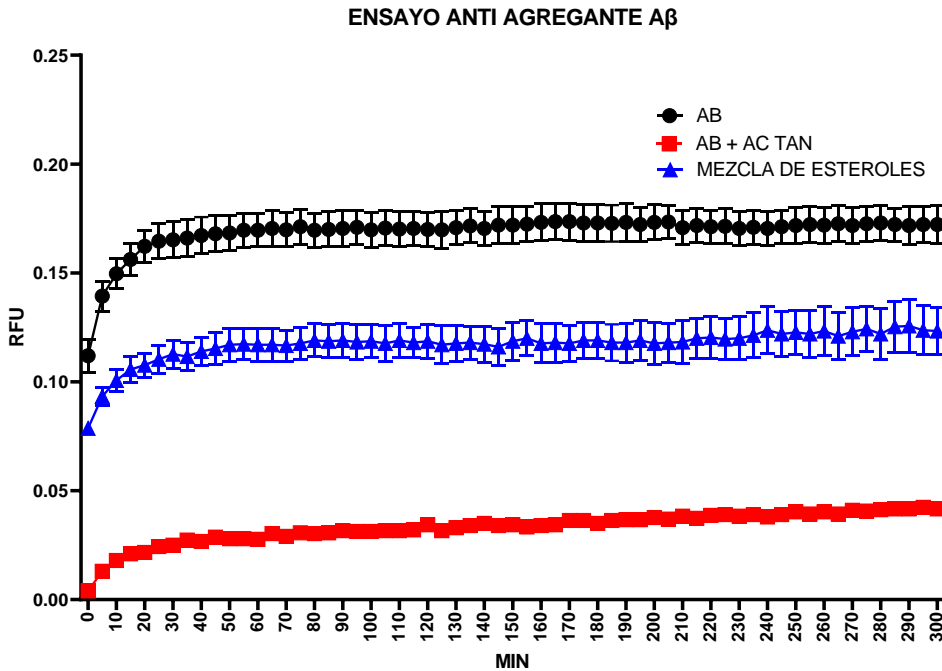
Figura 3.2.3-3: Actividad antiagregante del compuesto 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona, analizado mediante el ensayo de detección por ThT.



Nota: La cinética de agregación del péptido A β se evaluó mediante la RFU (Unidad de fluorescencia relativa), se graficó la RFU en función del tiempo de agregación sin antiagregante (Negro), la agregación del péptido A β con el antiagregante ácido tánico (Rojo) y la agregación del péptido A β con compuesto 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona (Azul). Los datos se representaron como la media \pm SEM de replicas por cada experimento.

Respecto a los resultados con la mezcla de esteroides (ZC3) (Figura 3.2.3-4), se observa en azul el resultado de la actividad antiagregante del compuesto. Se evidencia una disminución de aproximadamente 0,68 veces la agregación del péptido A β respecto al control de agregación de A β (círculos negros) a lo largo del tiempo de estudio.

Figura 3.2.3-4: Actividad antiagregante de la mezcla de esteroides, analizado mediante el ensayo de detección por ThT.



Nota: La cinética de agregación del péptido A β se evaluó mediante la RFU (Unidad de fluorescencia relativa), se graficó la RFU en función del tiempo de agregación sin antiagregante (Negro), la agregación del péptido A β con el antiagregante ácido tánico (Rojo) y la agregación del péptido A β con la mezcla de esteroides (Azul). Los datos se representaron como la media \pm SEM de replicas por cada experimento.

3.3 Análisis de resultados

En el presente capítulo se realizó un estudio de actividad biológica de los compuestos buscando sus potenciales efectos terapéuticos. Durante el desarrollo de este trabajo, también se realizaron otros trabajos en paralelo, donde se demostró que el extracto etanólico de la raíz del *Zanthoxylum caribaeum* a 50mg/kg/día por vía oral durante tres meses de tratamiento en animales 3xTg-AD produce mejoría cognitiva y cambios patológicos y moleculares que corroboran el potencial terapéutico de la raíz de la especie *Zanthoxylum caribaeum* (Ruiz, 2021; Vega, 2021). Los efectos recientemente reportados

previamente en el modelo 3xtg-AD, incluyen la reducción de la carga amiloide, reducción del marcaje de ovillos neurofibrilares, reducción de la astrogliosis y microglía reactiva. Es por ello la evaluación de actividad biológica de estas las moléculas aisladas del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* ha tomado más relevancia.

Evaluamos el potencial efecto neuroprotector en la línea celular SH-SY5Y frente al PQ. Como se mencionó previamente, el modelo de citotoxicidad inducida por el PQ, involucra un mecanismo de muerte celular por inhibición del complejo-I de la cadena transportadora de electrones, lo cual conlleva al incremento del estrés oxidativo, y a la disfunción mitocondrial, estos cambios moleculares se han observado de manera transversal a la mayoría de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA (Keil *et al.*, 2004; Misrani *et al.*, 2021; Moreira *et al.*, 2010; Perez Ortiz & Swerdlow, 2019; Picone *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020). Es por ello, que el modelo de citotoxicidad inducida por PQ es apropiado en la búsqueda de potenciales agentes neuroprotectores, de hecho, la exposición al PQ se ha relacionado con el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EA y el Parkinson (Rappold *et al.*, 2011).

Respecto al compuesto **5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona**, observamos un efecto neuroprotector frente al PQ a dosis altas, las cuales reducen la viabilidad celular al 90% observando que el cromeno la mantiene en un 47%, así mismo observamos que presenta actividad inhibidora de la oligomerización de A β . Este compuesto pertenece al grupo de las crómonas que son moléculas policíclicas de la fusión del benceno y un anillo policíclico pirano, derivados de las cumarinas (Edwards, 2014). Los crómenos se han reportado como componentes de una amplia variedad de especies vegetales (Khatana & Gupta, 2020). Se ha demostrado que varios crómenos producen efectos benéficos debido a una amplia variedad de actividades biológicas, por lo cual se han incluido dentro de los nutraceuticos (Sánchez-Gloria *et al.*, 2020). A las crómonas se les ha demostrado actividad biológica anticancerígena (Patil *et al.*, 2013; Pontes *et al.*, 2018; Shestopalov *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2012), antiviral (Conti *et al.*, 2017; Ilyina *et al.*, 2021), antimicrobiana (Bingi *et al.*, 2015), antiparasitaria (Batista *et al.*, 2008), antioxidante (Subbareddy *et al.*, 2017), anti-ACh, antituberculoso, antidiabético (Raj & Lee, 2020) entre otros.

Adicionalmente, a la amplia variedad de actividades biológicas reportadas para los crómenos, nosotros estamos reportando la actividad neuroprotectora frente al PQ para el **5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona**, en donde sugerimos, que el mecanismo protector de la viabilidad celular se puede entender a partir de dos potenciales mecanismos de acción. EL primero es un mecanismo dependiente de la actividad antioxidante ampliamente investigada para los crómenos, debido a la presencia en su estructura de grupos oxidables como los fenoles o los éteres de fenilo, y el grupo carbonilo del anillo de pirona, lo que los hace incrementar su potencial como captadores de radicales libres, como es el caso de nuestro compuesto **5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona**, aislado de la raíz de *Zanthoxylum caribaeum*, haciendo de este compuesto un candidato potencial para el tratamiento de patologías asociadas al incremento del estrés oxidativo (Chian Ng *et al.*, 2018; Jalili-Baleh *et al.*, 2021; Ross *et al.*, 2008; Semwal *et al.*, 2020; Songsiang *et al.*, 2012). En este sentido, sugerimos que el pretratamiento con **5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona** reduce los radicales libres de oxígeno producidas por como consecuencia de la alteración en la cadena transportadora de electrones; sin embargo, esto deberá ser estudiado, usando metodologías que cuantifiquen la reducción directa de especies oxidantes en el citoplasma celular como la marcación de dihidroetidio (DHE) y citometría de flujo.

El segundo mecanismo de acción que explicaría el efecto neuroprotector del **5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona**, es el potencial regulador de vías de señalización celular, sobre las cuales se han reportado varias investigaciones, las vías son reguladas de manera directa o indirecta por crómenos específicos de manera selectiva. Es precisamente esos efectos reguladores sobre vías de señalización las que le confieren sus propiedades farmacológicas como agentes anticancerígenos y antidiabéticos, entre otros. Un ejemplo reportado recientemente es el isocromeno no-racémico conjugado denominado JE133, el cual presenta una potente actividad neuroprotectora frente al H₂O₂ la cual fue atribuida no solo a su actividad reductora de radicales libres, la cual fue limitada sino principalmente a mecanismos de regulación de vías de señalización de supervivencia neuronal, incrementando la activación de AKT e inhibiendo la fosforilación de las MAPK (ERK y p38) produciendo efectos inhibitorios de la apoptosis en la línea celular SH-SH5Y (Tao *et al.*, 2021). Por su parte, el compuesto 2-(4-morfolinil)-8-fenil-cromona denominado LY294002,

fue reportado por presentar actividad inhibidora del crecimiento de células transformadas e inducir la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon regulando la actividad de AKT (Semba, 2002), por otra parte el epóxido 2-(2-fenetil)-cromona denominado GYF-21 regula la fosforilación de NF- κ B p65 y MAPK p38, e inhibe la fosforilación de Erk1/2 y AKT (Guo *et al.*, 2019). EN conjunto estos resultados sugieren que se deberá estudiar los potenciales mecanismos neuroprotectores asociados a la regulación de vías de señalización mediados por la **5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona**.

Respecto a la actividad antiagregante de **5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona**, se observó a 50 μ M actividad antiagregante, la cual es considerada menor en relación al control ácido tánico usado a 10 μ M, la actividad antiagregante de derivados de flavonoides ha sido previamente estudiada in silico demostrando el potencial desestabilizando los oligómeros de A β (Kumar *et al.*, 2015). Así mismo considerando las concentraciones usadas en el ensayo de actividad antiagregantes sugerimos que los mecanismos terapéutico potenciales de esta crómona son principalmente las mencionadas anteriormente ya que no es un compuesto específico por la antiagregación.

Adicionalmente, se han reportado crómenos con actividades biológicas relacionadas a la terapéutica de la EA. Por ejemplo el 4-oxo4H-cromeno, el cual adicional a la actividad captadora de radicales libres, es un buen inhibidor de β -secretasa 1 (BACE-1), la 3-cianocromona (CyC) y la 7-amino-3-metilcromona (AMC) fueron moléculas reportadas como inhibidores de AChE (Bachiller *et al.*, 2012). En conclusión, considerando la actividad reportada para los crómenos, el compuesto **5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona**, aislado del *Z. caribaeum* es una molécula que cuenta con un elevado potencial farmacológico y que en conjunto con otras moléculas explicarían la mejoría observada con el tratamiento con el extracto en modelos animales de EA, por lo que sugerimos que debe ser sometido a estudios más avanzados.

Respecto al compuesto **10H-furano [3,2-a] carbazol**, se observó que redujo la toxicidad inducida por PQ, presentó actividad antiagregante y agonista de LXR. Este es uno de los compuestos mayoritarios de extracto, el cual se cristalizó durante los pasos de fraccionamiento, al ser uno de los compuestos mayoritarios su actividad biológica es relevante dentro desde el punto de vista farmacológico. El **10H-furano [3,2-a] carbazol** es un ejemplo de una molécula con actividad multidiana, particularmente promisorio para la

EA, tiene actividad neuroprotectora la cual podría asociarse a varios mecanismos de acción, siendo el más evidente y menos específico, su actividad antioxidante.

El compuesto **10H-furano [3,2-a] carbazol**, corresponde a un alcaloide de tipo carbazólico, derivado biosintéticamente del triptófano, pertenece al grupo de la triptaminas simples, cuya distribución es restringida. Se han encontrado presentes en especies de la familia Rutáceas, en los géneros *Murraya* y *Rutaceae*. Está formado por un esqueleto tricíclico consistente de un anillo de pirrol fusionado con dos anillos de benceno, lo que le otorga la característica de ser un sistema conjugado capaz de estabilizar radicales libres por resonancia, razón por la cual en muchos estudios ha mostrado una marcada actividad captadora de radicales libres por varios métodos (Hieda *et al.*, 2014; Tachibana *et al.*, 2003).

Por otra parte, los alcaloides carbazólicos han sido descritos por tener actividad biológica promisorias para el tratamiento de la EA, como la Clausine Z que presentó actividad inhibitoria de CDK5 (Potterat *et al.*, 2005), y la Claulansine F descrito como neuroprotector *in vitro* y regulador de la neurogénesis a partir de mecanismos dependientes de la activación de la vía de señalización de ERK, incrementa la expresión de MAP2 asociada con las funciones axónicas (J. W. Li *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013), estos son mecanismos de largo termino que involucran la expresión de génica no se han descrito con exactitud. Los mecanismos de largo termino producidos por los alcaloides carbazólicos podrían asociados a la actividad agonista de LXR que describimos en este trabajo.

Los agonistas de LXR son fármacos promisorios para distintas enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EA, regulan la expresión génica, incrementando la expresión de proteínas asociada con la reducción de la carga amiloide, acá describimos por primera vez la actividad agonista LXR de un alcaloide carbazólico como es el **10H-furano [3,2-a] carbazol** obtenido de la raíz del *Z. caribaeum*, este mecanismo agonista de LXR explicaría adicionalmente los resultados observados por (Ruiz, 2021; Vega, 2021) donde el extracto incremento la expresión de ApoE asociada a la reducción de la carga amiloide (Ruiz, 2021). Esta molécula se sumaría al grupo de moléculas descritas en las

Rutaceas con actividad agonista LXR y con alto potencial terapéutico incluyendo a los alcaloides isoquinolínicos como la Berberina (Lee *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2017).

Adicionalmente, este sería el primer reporte de actividad antiagregantes para un alcaloide carbazólico. Sin embargo, la concentración usada del **10H-furano [3,2-a] carbazol**, fue de $50\mu\text{M}$, cinco 5 veces más elevada que la usada para el ácido tánico $10\mu\text{M}$, por lo cual el efecto antiagregante es menos específico. A pesar de no encontrarse reportes de antiagregación de $\text{A}\beta$, si se han reportado para otras moléculas de estructuras relacionadas. Se sabe que el núcleo carbazólico, las cumarinas y los flavonoles, presentan propiedades antiagregantes (Pagano *et al.*, 2020). El fluoróforo de cianina a base de carbazol denominado SLOH ejerce efectos inhibidores de la fibrilación de $\text{A}\beta_{40}$, asociados y actividad neuroprotectora frente al $\text{A}\beta$. Adicionalmente, este tipo de núcleos atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica, convirtiéndolos en potenciales agentes neuroprotectores y terapéuticos para la EA (Yang *et al.*, 2012).

Respecto a la mezcla de esteroides, se aisló una mezcla cercana a la equimolaridad de los compuestos **estigmasterol y β -sitosterol**. Estas moléculas presentaron actividad neuroprotectora frente al PQ a dosis altas, agonista de LXR y actividad antiagregante de $\text{A}\beta$. Tanto el **estigmasterol** como el **β -sitosterol** son derivados biosintéticos de la vía del mevalonato, hacen parte del grupo biosintético llamado Nor triterpenoides en consideración al número de carbonos de su estructura (C27-C29), cuyo núcleo básico es el estigmastano.

Son conocidos como fitoesteroides, ampliamente distribuidos en plantas, hongos y animales, junto con el colesterol son los principales componentes de las membranas celulares eucariotas por lo que están involucradas en la señalización celular (Wright *et al.*, 1993), su consumo se ha relacionado con la reducción de los niveles de colesterol sérico (Katan *et al.*, 2003; Lees *et al.*, 1977), por lo cual se ha recomendado para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular (FDA, 2002). Es bien sabido que la enfermedad cardiovascular produce un elevado riesgo de padecer EA (de Bruijn & Ikram, 2014).

Dentro de los efectos conocidos para los fitoesteroides, se ha demostrado que el **β -sitosterol** entra al cerebro y se acumula en la membrana plasmática, aunque los efectos de esta acumulación no son completamente conocidos, se ha demostrado que tienen efectos protectores sobre la peroxidación lipídica, y regula vías de señalización incluyendo

la vía PI3K/p-GSK3 β (Shi *et al.*, 2013). Así mismo, el tratamiento con el **β -sitosterol** en modelos animales doble transgénicos de la EA (APP/PS1) previene la acumulación de placas amiloides y el déficit cognitivo, protege la densidad de espinas dendríticas y su funcionalidad (Ye *et al.*, 2020). Por su parte el **estigmasterol** también se ha reportado como un neuroprotector frente a agentes oxidantes como el H₂O₂ incrementando la expresión de proteínas antioxidantes como la catalasa, y proteínas anti-apopticas como Bcl2 e incrementando la expresión y la activación de la sirtuina 1 (SIRT1) (Braidly *et al.*, 2012; Donmez, 2012; Pratiwi *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2021).

Por su parte, se ha demostrado que el estigmasterol está implicado en la neuroprotección a través de un enfoque multiobjetivo. mostró actividad inhibitora de AChE in vitro, también se informó que reduce las placas de amiloide al disminuir la escisión de APP por la β -secretasa reduce los niveles de expresión de las γ -secretasa, reduce la distribución del colesterol y la presenilina en las balsas lipídicas implicadas en la escisión de la APP amiloidogénica, y disminuye la internalización de BACE1 en los compartimentos endosómicos, implicados en la escisión de APP – secretasa por glutamato mediante la inhibición de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de Ca₂⁺ en estudios in vitro (Lee *et al.*, 2014).

Adicionalmente, los fitoesteroles son reconocidos agentes con actividad antiinflamatoria (Aldini *et al.*, 2014; Hassanein *et al.*, 2012), esta actividad también está asociada con la activación de LXR y explicaría los efectos antiinflamatorios en los modelos de EA (Kim *et al.*, 2008; Mouzat *et al.*, 2011; Komati *et al.*, 2017).

Respecto a la actividad antiagregante, encontramos que las moléculas purificadas en este trabajo presentan actividad antiagregante, incluyendo los esteroides. Al contener varias moléculas anti-agregantes con baja especificidad este mecanismo se torna relevante en el extracto. Los compuestos naturales pueden afectar las vías de agregación de amiloide, centrándose en diferentes pasos de la cascada de agregación de amiloide (Ahmed y Melacini, 2018; Wiglenda *et al.*, 2020). La acción de los inhibidores se ha atribuido a: **(a)** la inhibición de la asociación de monómeros que da lugar a pequeños agregados; **(b)** remodelación de oligómeros de A β que producen especies incompetentes de siembra

fuera de la ruta; **(c)** inhibición de la nucleación secundaria (Ahmed y Melacini, 2018). Aunque se ha informado que muchos compuestos naturales logran su acción a través de múltiples mecanismos moleculares (Fan *et al.*, 2020), el mecanismo impulsor depende de las afinidades relativas de los inhibidores por las especies A β (Pagano *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2020).

Previamente se ha demostrado que otro tipo de esteroides como el Ácido uncarínico C, interactúa con el monómero A β_{42} o los oligómeros (dímeros, trímeros, etc.) (Murakami *et al.*, 2018; Pagano *et al.*, 2020). Por su estructura hidrofóbica planar, se ha propuesto que el grupo ácido carboxílico tiene un papel importante en la actividad inhibitoria, ya que puede establecer un puente salino con las cadenas laterales K16 y K28 (Bittner, 2006; Murakami *et al.* 2018), lo que dificulta una mayor elongación. La diversidad de metabolitos que se han investigado destaca la importancia de considerar a los PN como una fuente de compuestos bioactivos reguladores de la amiloidogénesis.

4. Conclusiones

La raíz seca y molida de *Z. caribaeum* fue extraída por el método de maceración etanólica a temperatura ambiente. El proceso de fraccionamiento del *Z. caribaeum* permitió establecer la composición química básica de la especie entre la que se encuentran metabolitos de tipo fenólicos y alcaloidales, siendo esto coherente con lo reportado en estudios previos.

La determinación *in vitro* de la actividad captadora de radicales libres tanto del extracto como de las fracciones obtenidas a partir del mismo, se realizó por dos métodos, un método químico (DPPH) que permite identificar compuestos promisorios con esta actividad y un modelo de aproximación biológica (β – caroteno) que está estrechamente relacionado con la actividad en seres vivos. Esta determinación permitió determinar que tanto el extracto como las fracciones presentan actividad antioxidante, lo que se puede explicar principalmente por la presencia de grupos fenólicos y algunos tipos de alcaloides en las muestras evaluadas.

La evaluación cuali – cuantitativa de la actividad inhibitoria de colinesterasas tanto del extracto como de las fracciones obtenidas permitió observar que algunas de las fracciones, presentan actividad inhibitoria de colinesterasas, siendo la de mayor actividad la FZC1-2; esta actividad se puede explicar probablemente por la presencia de grupos alcaloidales presentes en las muestras evaluadas; previamente, se ha reportado que los alcaloides son responsables de realizar esta actividad inhibitoria según lo descrito por Carpinella (2010).

La determinación de la actividad agonista de LXR tanto del extracto como de las fracciones obtenidas permitió observar que las fracciones promisorias para encontrar los metabolitos responsables de esta actividad son las FZC1, FZC2, FZC14 y FZC15, permitiendo mediante este resultado y los resultados previos, realizar un aislamiento bioguiado con el enfoque en la búsqueda de los metabolitos responsables de esta actividad. Con los resultados obtenidos en el *screening* del extracto y las fracciones, se logró identificar que

el *Z. caribaeum* es una especie que contiene metabolitos promisorios para el tratamiento de la EA.

El estudio fitoquímico de las fracciones condujo al aislamiento y elucidación estructural de 3 compuestos derivados de cumarinas, esteroides y alcaloides. El compuesto ZC1 fue identificado como un alcaloide carbazólico de nombre 10H-furano [3,2-a] carbazol, el cual previamente había sido reportado en esta especie. La elucidación estructural del compuesto ZC2 permitió establecer que se trata de una cromona de nombre 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona, un compuesto reportado por primera vez en la literatura para el género *Zanthoxylum*, el compuesto ZC3 corresponde a una mezcla esteroideal compuesta por β -sitosterol y estigmasterol que previamente había sido reportada en esta especie.

En el análisis de la actividad agonista de LXR en metabolitos puros, el resultado obtenido del compuesto 10H-furano [3,2-a] carbazol, y la mezcla de esteroides, demostró que estos compuestos son comparables en actividad con el GW 3965, lo que los convierte en potenciales agonista LXR, característica observada en este tipo de metabolitos.

Se determinó el efecto neuroprotector de todos los compuestos aislados frente a células de neuroblastoma diferenciadas con ácido retinoico en células neuronales, encontrando que todos los compuestos evaluados a concentraciones específicas poseen propiedades neuroprotectoras frente al citotóxico PQ, efecto que se debe principalmente por la capacidad antioxidante de los compuestos obtenidos. Los 2 compuestos aislados y la mezcla de esteroides, presentan un muy buen efecto neuroprotector frente a células SHSY5Y, el cual gracias a sus estructuras presentan una gran capacidad antioxidante, lo que explica en gran medida su efecto.

Se determinó la capacidad antiagregante $A\beta$ del extracto y de todos los compuestos aislados por el método de Th-T, encontrando que los 3 metabolitos obtenidos presentan la capacidad de evitar la agregación del péptido. El compuesto que mejor actividad antiagregante presenta es el 5,7-dimetoxi-4H-cromen-4-ona.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron dilucidar nuevos metabolitos presentes en la especie, los cuales se pueden considerar como excelentes candidatos en

la búsqueda de nuevos agentes para el tratamiento de la EA, ya que presentan un efecto multi-target, actuando sobre diferentes vías implicadas en el desarrollo de la patología.

5.Recomendaciones

En primer lugar, se recomienda continuar con el fraccionamiento y purificación de las fracciones complejas para contribuir a la caracterización química de la especie y determinar de este modo las actividades biológicas de los metabolitos presentes.

Se recomienda realizar estudios computacionales de estructura – actividad que permitan evaluar la interacción de los compuestos con sus diferentes dianas farmacológicas y de esta manera poder entender mejor el mecanismo por el cual estos compuestos interactúan para ejercer su efecto.

Por otro lado, se recomienda realizar estudios biológicos adicionales que permitan determinar completamente el mecanismo neuroprotector de los compuestos obtenidos, para de esta forma entender mejor su actividad multi-*target*. Entre los estudios biológicos se sugiere, citometría de flujo, neuroprotección frente a otros agentes neurotóxicos.

Adicionalmente se recomienda el uso de modelos animales como el 3XTg-AD, para determinar los metabolitos aislados logran atravesar la barrera hematoencefálica y tener efectos benéficos a nivel patológico enfocados a un efecto multi-*target*.

Bibliografía

- Addae-Mensah, I., Munenge, R., & Guantai, A. N. (1989). Comparative examination of two Zanthoxylum benzophenanthridine alkaloids for effects in rabbits. *Phytotherapy Research*, 3(5), 165–169. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650030502>
- Ahmed, & Gilani, A. (2009). Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 91(4), 554–559. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.09.010>
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., & Ahuja, S. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid- β (1–42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol*, 17(5), 561–567. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1799.Structural>
- Aldini, R., Tremblay, E., Vannasing, P., Roy, M. S., Lefebvre, F., Kombate, D., Lassonde, M., Lepore, F., McKerral, M., & Gallagher, A. (2014). Delayed early primary visual pathway development in premature infants: High density electrophysiological evidence. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108112>
- Allinson, T. M. J., Parkin, E. T., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2003). *ADAMs Family Members As Amyloid Precursor Protein \square -Secretases*. 352(May), 342–352.
- Almeida, Z. L., & Brito, R. M. M. (2020). Structure and aggregation mechanisms in amyloids. *Molecules*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/molecules25051195>
- Alvarez Caballero, J. M. (2017). *Estudio Químico Comparativo de Metabolitos Fijos y Aceite Esencial De Persea caerulea (Ruiz & Pav) Mez y Evaluación de su Actividad Biológica*. <http://www.bdigital.unal.edu.co/57118/>
- Alzheimers Disease International. (2018). World Alzheimer's report 2018. *Alzheimer's Disease Internations: World Alzheimer Report 2018*, 1–48. https://doi.org/10.1111/j.0033-0124.1950.24_14.x
- Amaro-Luis, J. M., Fronczek, F. R., Massanet, G. M., Pando, E., Rodríguez-Luis, F., Watkins, S. F., & Zubía, E. (1988). Meridinol, a lignan from Zanthoxylum fagara. *Phytochemistry*, 27(12), 3933–3935. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)83048-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)83048-6)
- Ansari, N., & Khodagholi, F. (2013). *Natural Products as Promising Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer ' s Disease : Molecular Mechanism Aspect*. 414–429.
- Ardura-Fabregat, A., Boddeke, E. W. G. M., Boza-Serrano, A., Brioschi, S., Castro-Gomez, S., Ceyzériat, K., Dansokho, C., Dierkes, T., Gelders, G., Heneka, M. T., Hoeijmakers, L., Hoffmann, A., Iaccarino, L., Jahnert, S., Kuhbandner, K., Landreth,

- G., Lonnemann, N., Löschmann, P. A., McManus, R. M., ... Yang, Y. (2017). Targeting Neuroinflammation to Treat Alzheimer's Disease. *CNS Drugs*, 31(12), 1057–1082. <https://doi.org/10.1007/s40263-017-0483-3>
- Asiimwe, N., Yeo, S. G., Kim, M. S., Jung, J., & Jeong, N. Y. (2016). Nitric oxide: Exploring the contextual link with Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7205747>
- Bachiller, M. I. F., ConcepciónPérez, Monjas, L., Rademann, J., & Franco, M. I. R. (2012). *New Tacrine – 4-Oxo-4 H -chromene Hybrids as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer ' s Disease, with Cholinergic, Antioxidant, and β -Amyloid-Reducing Properties †.*
- Bafi-Yebo, N. F. A., Arnason, J. T., Baker, J., & Smith, M. L. (2005). Antifungal constituents of Northern prickly ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. *Phytomedicine*, 12(5), 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.005>
- Batista, J. M., Lopes, A. A., Ambrósio, D. L., Regasini, L. O., Kato, M. J., Bolzani, V. D. S., Cicarelli, R. M. B., & Furlan, M. (2008). Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(3), 538–540. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.538>
- Beyer, K. (2002). *CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER : ESTUDIO POBLACIONAL.*
- Bingi, C., Narender Reddy, E., Chennapuram, M., Poornachandra, Y., Kumar, C. G., Jagadeesh Babu, N., & Atmakur, K. (2015). One-pot catalyst free synthesis of novel kojic acid tagged 2-aryl/alkyl substituted-4H-chromenes and evaluation of their antimicrobial and anti-biofilm activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(9), 1915–1919. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.03.034>
- Blanco-Ayala, T., Andérica-Romero, A. C., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radical Research*, 48(6), 623–640. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.899694>
- Boehme, A. K., Noletto, J. A., Haber, W. A., & Setzer, W. N. (2008). Bioactivity and chemical composition of the leaf essential oils of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum setulosum* from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Research*, 22(1), 31–36. <https://doi.org/10.1080/14786410601130224>
- Bourin, M., & Dailly, E. (2003). *Nicotinic receptors and Alzheimer ' s disease.* 19(3), 169–177. <https://doi.org/10.1185/030079903125001631>
- Braidy, N., Jayasena, T., Poljak, A., & Sachdev, P. S. (2012). Sirtuins in cognitive ageing and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Psychiatry*, 25(3), 226–230. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32835112c1>
- Bustos, A. (2021). *Búsqueda de agonistas LXR en plantas colombianas con potencial terapéutico para la enfermedad de Alzheimer.*
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M., & Drake, J. (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 655–664.

- [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00340-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00340-2)
- Cai, Z., Wang, C., & Yang, W. (2016). Role of berberine in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 12, 2509–2520. <https://doi.org/10.2147/NDT.S114846>
- Calsolaro, V., & Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's & Dementia*, 12(6), 719–732. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>
- Cardoso, R., Ong, T. P., Jacob-filho, W., Jaluul, O., & A, M. I. (2010). *Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients*. 103, 803–806. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992832>
- Carvajal, F. J., & Inestrosa, N. C. (2011). *Interactions of AChE with A β aggregates in Alzheimer's brain: therapeutic relevance of IDN 5706*. 4(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00019>
- Castellani, R. J., Perry, G., & Tabaton, M. (2019). Tau biology, tauopathy, traumatic brain injury, and diagnostic challenges. *Journal of Alzheimer's Disease*, 67(2), 447–467. <https://doi.org/10.3233/JAD-180721>
- Castellanos-Castillo, F. A. (2014). *Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura - actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano*. <http://www.bdigital.unal.edu.co/39404/>
- Castello, P. R., Drechsel, D. A., & Patel, M. (2007). Mitochondria Are a Major Source of Paraquat-induced Reactive Oxygen Species Production in the Brain. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700827200.Mitochondria>
- Chávez, L. I. H. (2011). *Estudio de la corteza de Cupania denfafa D.C. para la obtención de metabolitos bioactivos contra Giardia lamblia*.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14, 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Chen, & Glabe, C. (2006). Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid- β peptides A β 40 and A β 42: Stable trimer or tetramer formation by A β 42. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24414–24422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602363200>
- Chen, L., Yoo, S. E., Na, R., Liu, Y., & Ran, Q. (2012). Cognitive impairment and increased A β levels induced by paraquat exposure are attenuated by enhanced removal of mitochondrial H₂O₂. *Neurobiology of Aging*, 33(2), 432.e15-432.e26. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.01.008>
- Chen, W., & Wang, Y. (2015). *β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. 6(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00221>
- Chian Ng, R., Kassim, N. K., Yeap, Y. S. Y., Lian Ee, G. C., Yazan, S. L., & Musa, K. H.

- (2018). Isolation of carbazole alkaloids and coumarins from *Aegle marmelos* and *Murraya koenigii* and their antioxidant properties. *Sains Malaysiana*, 47(8), 1749–1756. <https://doi.org/10.17576/jsm-2018-4708-14>
- Christen, Y. (2018). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*, 71(February).
- Cohen, S. I. A., Linse, S., Luheshi, L. M., Hellstrand, E., White, D. A., Rajah, L., Otzen, D. E., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., & Knowles, T. P. J. (2013). Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24), 9758–9763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218402110>
- Conti, C., Proietti Monaco, L., & Desideri, N. (2017). 3-Phenylalkyl-2H-chromenes and -chromans as novel rhinovirus infection inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(7), 2074–2083. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.012>
- Crews, P. (1999). Organic structure analysis. In *Choice Reviews Online* (Vol. 36, Issue 11). <https://doi.org/10.5860/choice.36-6288>
- Crunkhorn, S. (2012). *RXR agonist reverses Alzheimer ' s disease*. 11(April). <https://doi.org/10.1126/science.1217697>
- Cuca S, L., & Taborda M, M. (2007). METABOLITOS AISLADOS DE *Zanthoxylum rhoifolium*. *Rev. Colomb. Quím. (Bogotá)*, 36(1), 5–11.
- Cummings, J. L. (2002). *Alzheimer Disease*. 287(18), 2335–2338.
- Das, S., & Basu, S. (2018). *Strategies for Multi-Target Directed Ligands : Application in Alzheimer ' s Disease (AD) Therapeutics*. <https://doi.org/10.1007/7653>
- Dasuri, K., Zhang, L., & Keller, J. N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 170–185. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.016>
- De-Almada, B. V. P., De-Almeida, L. D., Camporez, D., De-Moraes, M. V. D., Morelato, R. L., Perrone, A. M. S., Belcavello, L., Louro, I. D., & De-Paula, F. (2012). Protective effect of the APOE - e3 allele in Alzheimer ' s disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45, 8–12. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500151>
- de Bruijn, R. F. A. G., & Ikram, M. A. (2014). Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Medicine*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0130-5>
- Donald, J. M. M., O'Malley, T. T., Liu, W., Mably, A. J., Brinkmalm, G., Portelius, E., Wittbold, W. M., Frosch, M. P., & Walsh, D. M. (2016). The aqueous phase of Alzheimer's disease brain contains assemblies built from ~4 and ~7 kDa A β species. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.01.005>
- Donmez, G. (2012). The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(9), 494–501.

- <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.05.007>
- Drechsel, D. A., & Patel, M. (2008). Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(11), 1873–1886. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.008>
- Du, X., Wang, X., & Geng, M. (2018). *Alzheimer ' s disease hypothesis and related therapies*. 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40035-018-0107-y>
- Dumont, M., & Beal, M. F. (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.026>
- Edwards, A. M. (2014). Chromones. *Chemical Immunology and Allergy*, 100, 317–322. <https://doi.org/10.1159/000359986>
- Ekert, J. O., Gould, R. L., Reynolds, G., & Howard, R. J. (2018). *TNF alpha inhibitors in Alzheimer ' s disease : A systematic review*. September 2017, 688–694. <https://doi.org/10.1002/gps.4871>
- Espino, E. M. (2018). *Evaluación fitoquímica y perfil cromatográfico de las hojas de la Shapilloja (Zanthoxylum fagara)*. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.76.032109>
- Fatima, M., Graq, D. A. S., Fernandes, A. S., Silva, D. A., & Gottlieb, O. R. (1988). *Chemosystematics of the Rutaceae : suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family*. 161(1978), 97–134.
- FDA. (2002). Food labeling: health claims; soluble fiber from certain foods and risk of coronary heart disease. Final rule. *Federal Register*, 73(159), 47828–47829.
- Fernández-viadero, C., Rodríguez, E., & Combarros, O. (2013). Genética y enfermedad de Alzheimer : población en riesgo. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 48(1), 39–44.
- Garro, A., Wilson, C., Benjamin, R., M, R. S., & Fernando, A. (2015). Actividad antioxidante y citotóxica de extractos de *Pilea dauciodora* Wedd (Urticaceae) Antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Pilea*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 88–97.
- Garzon-Rodriguez, W., Vega, A., Sepulveda-Becerra, M., Milton, S., Johnson, D. A., Yatsimirsky, A. K., & Glabe, C. G. (2000). A conformation change in the carboxyl terminus of Alzheimer's A β (1-40) accompanies the transition from dimer to fibril as revealed by fluorescence quenching analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 22645–22649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000756200>
- Geldenhuys, W. J., & Schyf, C. J. Van Der. (2013). *Designing drugs with multi-target activity : the next step in the treatment of neurodegenerative disorders*. 115–129.
- Giacobini, E., & Gold, G. (2013). Alzheimer disease therapy - Moving from amyloid- β to tau. *Nature Reviews Neurology*, 9(12), 677–686. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.223>

- Goodman & Gilman. (2006). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (M. G. Hill (ed.)).
- Goozee, K. G., Shah, T. M., Sohrabi, H. R., Brown, B., Verdile, G., & Martins, R. N. (2016). *Examining the potential clinical value of curcumin in the prevention and diagnosis of Alzheimer ' s disease*. 1, 449–465. <https://doi.org/10.1017/S0007114515004687>
- Goure, W. F., Krafft, G. A., Jerecic, J., & Hefti, F. (2014). Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: A path forward for Alzheimer's disease immunotherapeutics. *Alzheimer's Research and Therapy*, 6(4), 1–15. <https://doi.org/10.1186/alzrt272>
- Gray, I., & Waterman, P. G. (1978). *Review coumarins in the rutaceae**. 17(1976), 845–864.
- Greig, N. H., Utsuki, T., Ingram, D. K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., Yu, Q. S., Mamczarz, J., Holloway, H. W., Giordano, T., Chen, D., Furukawa, K., Sambamurti, K., Brossi, A., & Lahiri, D. K. (2005). Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 17213–17218. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508575102>
- Guleria, S., Tiku, A. K., Koul, A., Gupta, S., Singh, G., & Razdan, V. K. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil and extracts of zanthoxylum alatum grown in North-Western Himalaya. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/790580>
- Guo, R., Li, J., Gu, Y., Li, Y., Li, S., Gao, X., Zhu, Z., & Tu, P. (2019). GYF-21, an epoxide 2-(2-phenethyl)-chromone derivative, suppresses dysfunction of B cells mainly via inhibiting BAFF activated signaling pathways. *International Immunopharmacology*, 67(11), 473–482. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.048>
- Hamouda, A. K., Kimm, T., & Cohen, J. B. (2013). Physostigmine and galanthamine bind in the presence of agonist at the canonical and noncanonical subunit interfaces of a nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Neuroscience*, 33(2), 485–494. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3483-12.2013>
- Hampel, H., Caraci, F., Cuello, A. C., Caruso, G., Nisticò, R., Corbo, M., Baldacci, F., Toschi, N., Garaci, F., Chiesa, P. A., Verdooner, S. R., Akman-Anderson, L., Hernández, F., Ávila, J., Emanuele, E., Valenzuela, P. L., Lucía, A., Watling, M., Imbimbo, B. P., ... Lista, S. (2020). A Path Toward Precision Medicine for Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Immunology*, 11(March). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00456>
- Haque, M. M., Murale, D. P., Kim, Y. K., & Lee, J. S. (2019). Crosstalk between oxidative stress and tauopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081959>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). *The Amyloid Hypothesis of Alzheimer ' s Disease : Progress and Problems on the Road to Therapeutics*. 297(July).
- Hassanein, R. A., Hashem, H. A., & Khalil, R. R. (2012). Stigmasterol treatment increases salt stress tolerance of faba bean plants by enhancing antioxidant systems. *Plant OMICS*, 5(5), 476–485.

- Hee, D., Gim, J., Hyeon, S., & Kim, H. (2017). Integrated late onset Alzheimer ' s disease (LOAD) susceptibility genes : Cholesterol metabolism and traf fi cking perspectives. *Gene*, 597, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.022>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Hepler, R. W., Grimm, K. M., Nahas, D. D., Breese, R., Dodson, E. C., Acton, P., Keller, P. M., Yeager, M., Wang, H., Shughrue, P., Kinney, G., & Joyce, J. G. (2006). Solution state characterization of amyloid β -derived diffusible ligands. *Biochemistry*, 45(51), 15157–15167. <https://doi.org/10.1021/bi061850f>
- Hieda, Y., Anraku, M., Choshi, T., Tomida, H., Fujioka, H., Hatae, N., Hori, O., Hirose, J., & Hibino, S. (2014). Antioxidant effects of the highly-substituted carbazole alkaloids and their related carbazoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24(15), 3530–3533. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.050>
- Hozoji, M., Munehira, Y., Ikeda, Y., Makishima, M., Matsuo, M., Kioka, N., & Ueda, K. (2008). Direct Interaction of Nuclear Liver X Receptor-B with ABCA1 Modulates Cholesterol Efflux. 283(44), 30057–30063. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804599200>
- Hughes, R. E., Nikolic, K., Ramsay, R. R., & Ramsay, R. R. (2016). One for All ? Hitting Multiple Alzheimer ' s Disease Targets with One Drug. 10(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00177>
- Ikeda, K., Yamaguchi, T., Fukunaga, S., Hoshino, M., & Matsuzaki, K. (2011). Mechanism of amyloid β -protein aggregation mediated by GM1 ganglioside clusters. *Biochemistry*, 50(29), 6433–6440. <https://doi.org/10.1021/bi200771m>
- Ilyina, I. V., Patrusheva, O. S., Zarubaev, V. V., Misiurina, M. A., Slita, A. V., Esaulkova, I. L., Korchagina, D. V., Gatilov, Y. V., Borisevich, S. S., Volcho, K. P., & Salakhutdinov, N. F. (2021). Influenza antiviral activity of F- and OH-containing isopulegol-derived octahydro-2H-chromenes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 31(November), 127677. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127677>
- Imbimbo, B. P., Lombard, J., & Pomara, N. (2005). Pathophysiology of Alzheimer ' s Disease Pathophysiology of Alzheimer ' s Disease. December. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2005.09.009>
- Invitrogen. (2006). Transfecting Plasmid DNA into PC12 Cells Using. *Invitrogen Corporation, November*, 9–10.
- Iqbal, K., Del C. Alonso, A., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C. X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., & Grundke-Iqbal, I. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.09.008>

- Jalili-Baleh, L., Nadri, H., Forootanfar, H., Küçükkılınç, T. T., Ayazgök, B., Sharifzadeh, M., Rahimifard, M., Baeri, M., Abdollahi, M., Foroumadi, A., & Khoobi, M. (2021). Chromone–lipoic acid conjugate: Neuroprotective agent having acceptable butyrylcholinesterase inhibition, antioxidant and copper-chelation activities. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(1), 23–38. <https://doi.org/10.1007/s40199-020-00378-1>
- Ji, H. F., & Shen, L. (2011). Berberine: A potential multipotent natural product to combat Alzheimer's disease. *Molecules*, 16(8), 6732–6740. <https://doi.org/10.3390/molecules16086732>
- Johnson, G. V. W., & Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science*, 117, 5271–5279. <https://doi.org/10.1242/jcs.01558>
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). *Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer ' s Disease*. 12(January). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
- Kang, & Rivest. (2012). *Lipid Metabolism and Neuroinflammation in Alzheimer ' s Disease : A Role for Liver X Receptors*. 33(October), 715–746. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1049>
- Kang, S., Ha, S., Park, H., Nam, E., Suh, W. H., Suh, Y. H., & Chang, K. A. (2018). Effects of a dehydroevodiamine-derivative on synaptic destabilization and memory impairment in the 5xFAD, Alzheimer's disease mouse model. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(November 2018), 2–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00273>
- Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Review Alzheimer ' s Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.05.006>
- Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., & Paoletti, R. (2003). Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(8), 965–978. <https://doi.org/10.4065/78.8.965>
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., & Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300(5618), 486–489. <https://doi.org/10.1126/science.1079469>
- Keil, U., Bonert, A., Marques, C. A., Scherping, I., Weyermann, J., Strosznajder, J. B., Müller-Spahn, F., Haass, C., Czech, C., Pradier, L., Müller, W. E., & Eckert, A. (2004). Amyloid β -induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50310–50320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405600200>
- Kepp, K. P. (2012). *Bioinorganic Chemistry of Alzheimer ' s Disease*.
- Khatana, K., & Gupta, A. (2020). An Update on Natural Occurrence and Biological Activity of Benzofurans. *Acta Scientific Medical Sciences*, 4(10), 114–123. <https://doi.org/10.31080/asms.2020.04.0748>

- Kim, H. J., Fan, X., Gabbi, C., Yakimchuk, K., Parini, P., Warner, M., & Gustafsson, J. Å. (2008). Liver X receptor β (LXR β): A link between β -sitosterol and amyotrophic lateral sclerosis-Parkinson's dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2094–2099. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711599105>
- Kim, Kim, Rhie, & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*, 27(3), 325–340. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>
- Kim, Li, H., Ruberu, K., Chan, S., Elliott, D. A., Low, J. K., Cheng, D., Karl, T., & Garner, B. (2013). Deletion of *Abca7* Increases Cerebral Amyloid- β Accumulation in the J20 Mouse Model of Alzheimer's Disease. 33(10), 4387–4394. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4165-12.2013>
- Kocahan, S., & Do, Z. (2017). *Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors*. 15(1), 1–8.
- Komati, R., Spadoni, D., Zheng, S., Sridhar, J., Riley, K. E., & Wang, G. (2017). Ligands of therapeutic utility for the liver X Receptors. *Molecules*, 22(1), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules22010088>
- Konrath, E. L., Passos, C. D. S., Klein-Júnior, L. C., & Henriques, A. T. (2013). Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(12), 1701–1725. <https://doi.org/10.1111/jphp.12090>
- Kovalevich, J., & Abstract, D. L. (2013). Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*, 1078, 35–44. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5>
- Krane, B. D., Fagbule, M. O., & Shamm, M. (1985). Benzophenanthridine Alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 26(C), 185–240. [https://doi.org/10.1016/S0099-9598\(08\)60195-9](https://doi.org/10.1016/S0099-9598(08)60195-9)
- Kumar, A., Srivastava, S., Tripathi, S., Singh, S. K., Srikrishna, S., & Sharma, A. (2015). Molecular insight into amyloid oligomer destabilizing mechanism of flavonoid derivative 2-(4' benzyloxyphenyl)-3-hydroxy-chromen-4- one through docking and molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 34(6), 1252–1263. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1074943>
- Kumar, Sandhir, R., & Ojha, S. (2014). Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of Lantana camara leaves. *BMC Research Notes*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-560>
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., FREED, R., LIOSATOS, M., MORGAN, T. E., ROZOVSKY, I., TROMMER, B., K.L.VIOLA, WALS, P., ZHANG, C., FINCH, C. E., G.A.KRAFFT, & KLEIN, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins.pdf. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(1), 6448–6453. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18024->

4

- Lane, R. M., Potkin, S. G., & Enz, A. (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9(1), 101–124. <https://doi.org/10.1017/S1461145705005833>
- Lara, D. S. J. G. de, Silva, P. F. G. da, Gorlin, T. A., Angeli, A. L. F., & Alves, D. S. (2020). Biological activities and phytochemical screening of leaf extracts from *zanthoxylum caribaeum* l. (rutaceae). *Bioscience Journal*, 36(1), 223–234. <https://doi.org/10.14393/BJ-v36n1a2020-48051>
- Laske, C., Stransky, E., Hoffmann, N., Maetzler, W., Straten, G., Eschweiler, G. W., & Leyhe, T. (2010). Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) in Plasma and CSF of Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research*, 7(5), 409–414. <https://doi.org/10.2174/156720510791383813>
- Lee, J., Weon, J. B., & Ma, C. J. (2014). Neuroprotective activity of phytosterols isolated from *Artemisia apiacea*. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 45(3), 214–219.
- Lee, Pan, C. C., Peng, C. C., Kou, Y. R., Chen, C. Y., Ching, L. C., Tsai, T. H., Chen, S. F., Lyu, P. C., & Shyue, S. K. (2010). Anti-atherogenic effect of berberine on LXR α -ABCA1-dependent cholesterol efflux in macrophages. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(1), 104–110. <https://doi.org/10.1002/jcb.22667>
- Lees, A. M., Mok, H. Y. I., Lees, R. S., McCluskey, M. A., & Grundy, S. M. (1977). Plant sterols as cholesterol-lowering agents: Clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis*, 28(3), 325–338. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(77\)90180-0](https://doi.org/10.1016/0021-9150(77)90180-0)
- Leon, C., & Reyes, P. (2017). *Estandarización De La Técnica Blanqueamiento Del Betacaroteno Para La Evaluación De La Actividad Antioxidante De Extractos Lipofílicos: Plantas Medicinales, Frutos Y Microalgas*.
- Lesné, S., Ming, T. K., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., & Ashe, K. H. (2006). A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440(7082), 352–357. <https://doi.org/10.1038/nature04533>
- Li, C., & Wang, M.-H. (2014). Potential Biological Activities of Magnoflorine: A Compound from *Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc. *Korean Journal of Plant Resources*, 27(3), 223–228. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2014.27.3.223>
- Li, J. W., Ning, N., Ma, Y. Z., Zhang, R., Tan, F., & Chen, N. H. (2013). Claulansine F suppresses apoptosis induced by sodium nitroprusside in PC12 cells. *Free Radical Research*, 47(6–7), 488–497. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.770150>
- Liao, J. F., Chiou, W. F., Shen, Y. C., Wang, G. J., & Chen, C. F. (2011). Anti-inflammatory and anti-infectious effects of *Evodia rutaecarpa* (Wuzhuyu) and its major bioactive components. *Chinese Medicine*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-6-6>
- Lichtenthaler, S. F., & Haass, C. (2004). *Amyloid at the cutting edge : activation of α -secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model*. 10, 11–

14. <https://doi.org/10.1172/JCI200420208.3>.
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, *443*(7113), 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Linse, S. (2019). Mechanism of amyloid protein aggregation and the role of inhibitors. *Pure and Applied Chemistry*, *91*(2), 211–229. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-1017>
- Liu, C., Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease : risk , mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>
- Liu, P., Reed, M. N., Kotilinek, L. A., Grant, M. K. O., Colleen, L., Qiang, W., Shapiro, S. L., Reichl, J. H., Chiang, A. C. A., Jankowsky, J. L., Wilmot, C. M., Cleary, J. P., Zahs, K. R., & Ashe, K. H. (2016). *Quaternary structure defines a large class of amyloid-β oligomers neutralized by sequestration* *Peng*. *11*(11), 1760–1771. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.021>. Quaternary
- Liu, & Peterson, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of ...*, *69*(2), 581–593. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9231715> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x/full>
- Liu, Z., Li, T., Li, P., Wei, N., Zhao, Z., Liang, H., Ji, X., Chen, W., Xue, M., & Wei, J. (2015). *The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress , Tau Hyperphosphorylation , and Autophagy Dysfunction in Alzheimer ' s Disease*. 2015.
- Lladó, A., Rey, M. J., Mercadal, P., Almenar, C., Fortea, J., & Molinuevo, J. L. (2010). Nueva mutación en el gen PSEN1 (E120G) asociada a enfermedad de Alzheimer de inicio precoz. *Neurología*, *25*(1), 13–16. [https://doi.org/10.1016/S0213-4853\(10\)70017-7](https://doi.org/10.1016/S0213-4853(10)70017-7)
- Lue, L. F., Rydel, R., Brigham, E. F., Yang, L. B., Hampel, H., Murphy, G. M., Brachova, L., Yan, S. Du, Walker, D. G., Shen, Y., & Rogers, J. (2001). Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia*, *35*(1), 72–79. <https://doi.org/10.1002/glia.1072>
- Ma, Y. Z., Ning, N., He, W. Bin, Li, J. W., Hu, J. F., Chu, S. F., & Chen, N. H. (2013). Claulansine F promotes neuritogenesis in PC12 cells via the ERK signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(12), 1499–1507. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.95>
- Macías, N. P. (2016). *Ligandos multidiana, una estrategia alternativa para el tratamiento de la enfermedad de alzheimer*.
- Macias Villamizar, V., Cuca Suárez, L., & Jiménez, K. (2007). Usos en medicina folclórica, actividad biológica y fitoquímica de metabolitos secundarios de algunas especies del género *Zanthoxylum*. *Duazary*, *4*(2), 140–159. <https://doi.org/10.21676/2389783X.655>

- Mandelkow, E., & Mandelkow, E. (2012). *Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration*. 1–26.
- Manoharan, S., Guillemin, G. J., Abiramasundari, R. S., Essa, M. M., Akbar, M., & Akbar, M. D. (2016). The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/8590578>
- Marston, A., Kissling, J., & Hostettmann, K. (2002). A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *PHYTOCHEMICAL ANALYSIS*, 54(July 2001), 51–54.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases : Involvement in Alzheimer ' s disease. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 289–309. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.003>
- Mata, R., Macías, M. L., Rojas, I. S., Lotina-Hennsen, B., Toscano, R. A., & Anaya, A. L. (1998). Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. *Phytochemistry*, 49(2), 441–449. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00110-1)
- Menendez-Gonzalez, M., Capetillo-Zarate, E., Alvarez, G., Costa, A., Padilla-Zambrano, H. S., & Tomas-Zapico, C. (2018). Targeting Beta-Amyloid at the CSF: A New Therapeutic Strategy in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(April), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00100>
- MinSalud, M. de S. (2017). *Boletín de salud mental Demencia*.
- Misrani, A., Tabassum, S., & Yang, L. (2021). Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13(February), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.617588>
- Mojica, J. (2021). *Estudio fitoquímico del extracto etanólico de raíz de Zanthoxylum caribaeum (Rutaceae) y obtención de metabolitos secundarios con posible actividad neuroprotectora aplicable en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer*.
- Moreira, P. I., Carvalho, C., Zhu, X., Smith, M. A., & Perry, G. (2010). Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(1), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.10.006>
- Moriyasu, M., Ichimaru, M., Nishiyama, Y., Kato, A., Wang, J., Zhang, H., & Lu, G. B. (1997). (R)-(+)-isotembetarine, a quaternary alkaloid from *Zanthoxylum nitidium*. *Journal of Natural Products*, 60(3), 299–301. <https://doi.org/10.1021/np960420v>
- Mouzat, K., Lobaccaro, J.-M., Baron, S., Dufour, J., Morel, L., & Viennois, E. (2011). Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 351(2), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.036>
- Negi, J. S., Bisht, V. K., Bhandari, A. K., Singh, P., & Sundriyal, R. C. (2011). Chemical constituents and biological activities of the genus *Zanthoxylum*: A review. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 5(12), 412–416.

- <http://www.academicjournals.org/AJPAC>
- O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci.*, 1987, 185–204.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>.Amyloid
- O'Nuallain, B., Freir, D. B., Nicoll, A. J., Risse, E., Ferguson, N., Herron, C. E., Collinge, J., & Walsh, D. M. (2010). Amyloid β -protein dimers rapidly form stable synaptotoxic protofibrils. *Journal of Neuroscience*, 30(43), 14411–14419.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3537-10.2010>
- Ortega Domínguez, B., Herrera-ramírez, M., Tecalco-cruz, A. C., Prgxodu, S., Suhvlyq, O. D. H., Vxv, G. H., Eodqfr, J., Od, H., Ghvgh, V., Fohr, H. O. Q., & Gh, D. F. (2015). *RECEPTORES NUCLEARES: DEL NÚCLEO AL CITOPLASMA Bibiana Ortega-Domínguez, Marlene Herrera-Ramírez y Angeles C. Tecalco-Cruz*. 18(2), 131–143.* <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.005>
- Pagano, K., Tomaselli, S., Molinari, H., & Ragona, L. (2020). Natural Compounds as Inhibitors of A β Peptide Aggregation: Chemical Requirements and Molecular Mechanisms. *Frontiers in Neuroscience*, 14(December), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.619667>
- Patel, N. S., Paris, D., Mathura, V., Quadros, A. N., Crawford, F. C., & Mullan, M. J. (2005). Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 2, 1–10.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-9>
- Patil, S. A., Patil, R., Pfeffer, L. M., & Miller, D. D. (2013). Chromenes: Potential new chemotherapeutic agents for cancer. *Future Medicinal Chemistry*, 5(14), 1647–1660.
<https://doi.org/10.4155/fmc.13.126>
- Patiño Ladino, O. J., & Cuca Suárez, L. E. (2010). Isoquinoline alkaloids of *Zanthoxylum quinduense* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4), 853–856.
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.07.016>
- Patiño, O. J. (2010). *AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ALCALOIDES PRESENTES EN DOS ESPECIES DEL GÉNERO ZANTHOXYLUM (RUTACEAE), SÍNTESIS DE ANÁLOGOS BENZOFENANTRIDÍNICOS Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFUNGICA Y ANTIBACTERIAL.*
- Patiño, O. J., & Cuca, L. E. (2004). *ALCALOIDES BENZOFENANTRIDINICOS DE Zanthoxylum quinduensis BENZOPHENANTHRIDINE ALKALOIDS FROM Zanthoxylum quinduensis. 1, 13–20.*
- Patiño, O. J., Rodríguez, J. A. P., Moreno, J. M. L., Sarmiento, L. L., & Suárez, L. E. C. (2011). Propiedades antibacterianas in vitro de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae). *Revista Cubana de Farmacia*, 45(3), 431–438.
- Patten, D. A., Germain, M., Kelly, M. A., & Slack, R. S. (2010). Reactive oxygen species: Stuck in the middle of neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*,

20(SUPPL.2). <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100498>

- Paulini, H., Eilert, U., & Schimmer, O. (1987). Mutagenic compounds in an extract from *Rutae Herba* (*Ruta graveolens* L.). I. Mutagenicity is partially caused by furoquinoline alkaloids. *Mutagenesis*, 2(4), 271–273. <https://doi.org/10.1093/mutage/2.4.271>
- Perez Ortiz, J. M., & Swerdlow, R. H. (2019). Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Role in pathogenesis and novel therapeutic opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 176(18), 3489–3507. <https://doi.org/10.1111/bph.14585>
- Piazzzi, L., Cavalli, A., Colizzi, F., Belluti, F., Bartolini, M., Mancini, F., Recanatini, M., Andrisano, V., & Rampa, A. (2008). Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(1), 423–426. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.09.100>
- Picone, P., Nuzzo, D., Caruana, L., Scafidi, V., & Di Carlo, M. D. (2014). Mitochondrial dysfunction: Different routes to Alzheimer's disease therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/780179>
- Plazas, E., Ávila, M., Delgado, W., Patiño, O., & Cuca, L. E. (2018). In vitro Antioxidant and Anticholinesterase Activities of Colombian Plants as Potential Neuroprotective Agents. *Journal of Medicinal Plants*, 12(1), 9–18. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2018.9.18>
- Plazas, E., Casoti R, R., Murillo, M. A., Da Costa, F. B., & Cuca, L. E. (2019). Metabolomic profiling of *Zanthoxylum* species: Identification of anti-cholinesterase alkaloids candidates. *Phytochemistry*, 168(April). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112128>
- Plazas, E., Hagenow, S., Murillo, M. A., Stark, H., & Suarez, L. C. (2020). Isoquinoline alkaloids from the roots of *Zanthoxylum rigidum* as multi-target inhibitors of cholinesterase, monoamine oxidase A and A β 1-42 aggregation. *Bioorganic Chemistry*, 98(January), 103722. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103722>
- Pontes, O., Costa, M., Santos, F., Sampaio-Marques, B., Dias, T., Ludovico, P., Baltazar, F., & Proença, F. (2018). Exploitation of new chalcones and 4H-chromenes as agents for cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 157, 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.058>
- Porat, Y., Abramowitz, A., & Gazit, E. (2006). Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical Biology and Drug Design*, 67(1), 27–37. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2005.00318.x>
- Prashant, T., Dwivedi, S., Singh, M. P., Mishra, R., & Chandy, A. (2013). *Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review*. 3(5), 413–420. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60094-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60094-8)
- Pratiwi, R., Nantasenamat, C., Ruankham, W., Suwanjang, W., Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., & Phopin, K. (2021). Mechanisms and Neuroprotective Activities of Stigmasterol Against Oxidative Stress-Induced Neuronal Cell Death via Sirtuin Family. *Frontiers in Nutrition*, 8(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.648995>

- Queiroz, E. F., Hay, A. E., Chaaib, F., Van Diemen, D., Diallo, D., & Hostettmann, K. (2006). New and bioactive aromatic compounds from *Zanthoxylum zanthoxyloides*. *Planta Medica*, *72*(8), 746–750. <https://doi.org/10.1055/s-2006-941504>
- Raj, V., & Lee, J. (2020). 2H/4H-Chromenes—A Versatile Biologically Attractive Scaffold. *Frontiers in Chemistry*, *8*(August), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00623>
- Rappold, P. M., Cui, M., Chesser, A. S., Tibbett, J., Grima, J. C., Duan, L., Sen, N., Javitch, J. A., & Tieua, K. (2011). Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(51), 20766–20771. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115141108>
- Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Publishing Group*, *7*(3), 137–152. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.2>
- Rienzo, A., Proft, M., Pascual, A., & Giner, A. (2009). *Estudio de la regulación dinámica de la expresión génica en respuesta a estrés osmótico en levadura. TESIS DOCTORAL.*
- Robinson-rechavi, M. (2003). *The nuclear receptor superfamily*. 585–586. <https://doi.org/10.1242/jcs.00247>
- Rodríguez, J. A. P. (2012). *Estudio fitoquímico de Componeura capitellata (Myristicaceae), Zanthoxylum (Lauraceae) y evaluación de su posible rigidum (Rutaceae) y Ocotea longifolia aplicación como biocontroladores de Sitophilus sp.*
- Romero, S. J., Vargas González, J. C., Pardo Turriago, R., Eslava- Schmalbach, J. H., & Moreno Angarita, M. (2021). El Sistema de Salud Colombiano y el reconocimiento de la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Salud Pública*, *23*(2), 1–9. <https://doi.org/10.15446/rsap.v23n2.88369>
- Ross, S. A., Krishnaven, K., Radwan, M. M., Takamatsu, S., & Burandt, C. L. (2008). Constituents of *Zanthoxylum flavum* and their antioxidant and antimalarial activities. *Natural Product Communications*, *3*(5), 791–794. <https://doi.org/10.1177/1934578x0800300521>
- Ruan, H., Zhan, Y. Y., Hou, J., Xu, B., Chen, B., Tian, Y., Wu, D., Zhao, Y., Zhang, Y., Chen, X., Mi, P., Zhang, L., Zhang, S., Wang, X., Cao, H., Zhang, W., Wang, H., Li, H., Su, Y., ... Hu, T. (2017). Berberine binds RXR α to suppress β -catenin signaling in colon cancer cells. *Oncogene*, *36*(50), 6906–6918. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.296>
- Ruiz, J. C. G. (2021). *Evaluación del potencial terapéutico de un extracto de raíz de Zanthoxylum caribaeum en un modelo triple transgénico de Enfermedad de Alzheimer.*
- Sabbagh, J. J., & Dickey, C. A. (2016). *The Metamorphic Nature of the Tau Protein : Dynamic Flexibility Comes at a Cost.* *10*(January), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00003>

- Sakono, M., & Zako, T. (2010). *Amyloid oligomers : formation and toxicity of A β oligomers*. 277, 1348–1358. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x>
- Sanabria-Castro, A., & Monge-Bonilla, I. A.-E. C. (2017). *Molecular Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease : An Update*. 10103, 46–54. <https://doi.org/10.1159/000464422>
- Sánchez-Gloria, J. L., Osorio-Alonso, H., Arellano-Buendía, A. S., Carbó, R., Hernández-Díazcouder, A., Guzmán-Martín, C. A., Rubio-Gayosso, I., & Sánchez-Muñoz, F. (2020). Nutraceuticals in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–35. <https://doi.org/10.3390/ijms21144827>
- Sandoval, A. G., Buitrago, L., & Moreno, H. (2015). Role of Liver X Receptor in AD Pathophysiology. *PLOS ONE*, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145467>
- Sandoval Hernández, A. G., Hernández, H. G., Restrepo, A., Arboleda, H., & Arboled, G. H. (2015). *Liver X Receptor Agonist Modifies the DNA Methylation Profile of Synapse and Neurogenesis-Related Genes in the Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer ' s Disease*. *Jones 2012*. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0665-8>
- Sayre, L. M., Smith, M. A., & Perry, G. (2001). *Chemistry and Biochemistry of Oxidative Stress in Neurodegenerative Disease*. 721–738.
- Schliebs, R., & Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>
- Selkoe, D. J., Hardy, J., Selkoe, D., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer ' s disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608.
- Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S., & Viljoen, A. (2020). Health benefits of chromones: common ingredients of our daily diet. *Phytochemistry Reviews*, 19(4), 761–785. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09681-w>
- Sengupta, U., Nilson, A. N., & Kayed, R. (2016). The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine*, 6, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.035>
- Serrano, M. P. (2010). *Mecanismos bioquímicos de la Enfermedad de Alzheimer: Aproximaciones terapéuticas*.
- Sever, R., & Glass, C. K. (2013). *Signaling by Nuclear Receptors ER ER OFF ON*. 1–4.
- Sharma, N., Tan, M. A., & An, S. S. A. (2021). Phytosterols: Potential metabolic modulators in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212255>
- Shaw, Kenneth R., Zhang, M. (2015). *Benzo[c]fenantridinas pseudobásicas con eficacia, estabilidad y seguridad mejoradas*.
- Sheen, W. S., Tsai, I. L., Teng, C. M., Ko, F. N., & Chen, I. S. (1996). Indolopyridoquinazoline alkaloids with antiplatelet aggregation activity from *Zanthoxylum integrifolium*. *Planta Medica*, 62(2), 175–176. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957846>

- Sheng, M., Sabatini, B. L., & Su, T. C. (2015). *Synapses and Alzheimer ' s Disease*.
- Shestopalov, A. M., Litvinov, Y. M., Rodinovskaya, L. A., Malyshev, O. R., Semenova, M. N., & Semenov, V. V. (2012). Polyalkoxy substituted 4H-chromenes: Synthesis by domino reaction and anticancer activity. *ACS Combinatorial Science*, 14(8), 484–490. <https://doi.org/10.1021/co300062e>
- Shi, C., Wu, F., Zhu, X., & Xu, J. (2013). Incorporation of β -sitosterol into the membrane increases resistance to oxidative stress and lipid peroxidation via estrogen receptor-mediated PI3K/GSK3 β signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(3), 2538–2544. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.012>
- Shiple, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(108), 1–11. <https://doi.org/10.3791/53193>
- Smale, S. T. (2010). Luciferase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 5(5), 2010–2013. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5421>
- Sodhi, R. K., & Singh, N. (2013). Liver X receptors: Emerging therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.03.008>
- Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J., & Whitmer, R. A. (2009). Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 28(1), 75–80. <https://doi.org/10.1159/000231980>
- Sonboli, A., Mojarrad, M., Ebrahimi, S. N., & Enayat, S. (2010). Free radical scavenging activity and total phenolic content of methanolic extracts from male inflorescence of *Salix aegyptiaca* grown in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9(3), 293–296. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.869>
- Songsiang, U., Thongthoom, T., Zeekpudsa, P., Kukongviriyapan, V., Boonyarat, C., Wangboonskul, J., & Yenjai, C. (2012). Antioxidant activity and cytotoxicity against cholangiocarcinoma of carbazoles and coumarins from *Clausena harmandiana*. *ScienceAsia*, 38(1), 75–81. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2012.38.075>
- Sonkusare, S. K., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2005). *Dementia of Alzheimer ' s disease and other neurodegenerative disorders — memantine , a new hope*. 51, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.05.005>
- Steffensen, K. R., Jakobsson, T., & Treuter, E. (2012). *Liver X receptor biology and pharmacology : new pathways , challenges and opportunities*. 33(7). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.013>
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>

- Stoothoff, W. H., & Johnson, G. V. W. (2005). Tau phosphorylation : physiological and pathological consequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1739, 280–297. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.06.017>
- Suárez, L. E. C., Barrera, C. A. C., Barrera, E. D. C., & Moreno, J. M. L. (2011). Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(2), 275–282.
- Subbareddy, C. V., Subashini, R., & Sumathi, S. (2017). Synthesis of substituted 2H-chromenes by a three-component reaction as potential antioxidants. *Molecular Diversity*, 21(4), 841–848. <https://doi.org/10.1007/s11030-017-9758-3>
- Sugino, H., Watanabe, A., Yamamoto, M., Kostic, D., Ohgi, Y., Amada, N., & Sanchez, R. (2015). Global Trends in Alzheimer Disease Clinical Development: Increasing the Probability of Success. *Clinical Therapeutics*, 37(8), 1632–1642. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.07.006>
- Supino, R. (1995). MTT assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 43, 137–149. <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:137>
- Swerdlow, R. H. (2007). *Pathogenesis of Alzheimer ' s disease*. 2(3), 347–359.
- Tachibana, Y., Kikuzaki, H., Lajis, N. H., & Nakatani, N. (2003). Comparison of Antioxidative Properties of Carbazole Alkaloids from *Murraya koenigii* Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6461–6467. <https://doi.org/10.1021/jf034700+>
- Tamagno, E., Bardini, P., Obbili, A., Vitali, A., Borghi, R., Zaccheo, D., Pronzato, M. A., Danni, O., Smith, M. A., Perry, G., & Tabaton, M. (2002). Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiology of Disease*, 10(3), 279–288. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0515>
- Tao, L. xue, Ji, S. sha, Szalóki, D., Kovács, T., Mándi, A., Antus, S., Ding, X., Kurtán, T., & Zhang, H. yan. (2021). An optically active isochroman-2H-chromene conjugate potently suppresses neuronal oxidative injuries associated with the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(1), 36–44. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0391-9>
- Tarkowski, E., Andreasen, N., Tarkowski, A., & Blennow, K. (2003). Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 74(9), 1200–1205. <https://doi.org/10.1136/jnnp.74.9.1200>
- Tchinda, A. T., Fuendjiep, V., Sajjad, A., Matchawe, C., Wafo, P., Khan, S., Tane, P., & Choudhary, M. I. (2009). Bioactive compounds from the fruits of *Zanthoxylum Leprieurii*. *Pharmacologyonline*, 1(January), 406–415.
- Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3 SPEC. ISS.), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>
- Tian, K. ming, Li, J. jie, & Xu, S. wen. (2019). Rutaecarpine: A promising cardiovascular protective alkaloid from *Evodia rutaecarpa* (Wu Zhu Yu). *Pharmacological Research*,

- 141(November 2018), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.12.019>
- Tsukamoto, K. (2015). Development of Novel Pharmaceutical Agents for Alzheimer's Disease: The Impact of Regulatory Initiatives in Japan and the United States. *Clinical Therapeutics*, 37(8), 1652–1660. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.02.024>
- Valencia Rincón, E. (2017). *Generación de un modelo in vitro para evaluar la actividad agonista de extractos naturales, obtenidos de plantas de las familias de Lauráceas y Miristicáceas, sobre los receptores X del hígado (LXRs) Generación de un modelo in vitro para evaluar la ac.*
- Veal, E., & Day, A. (2011). Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(1), 147–151. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3968>
- Vega, G. P. G. (2021). *EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTERAPÉUTICO DE DOS EXTRATOS DE Zanthoxylum EN EL MODELO MURINO TRIPLE TRANSGÉNICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (3xTg-AD).*
- Viola, K. L., & Klein, W. L. (2015). *Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis.* <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1386-3>
- Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). A β oligomers - A decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), 1172–1184. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x>
- Wang, & Michaelis, E. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2(MAR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>
- Wang, W., Zhao, F., Ma, X., Perry, G., & Zhu, X. (2020). Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: Recent advances. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00376-6>
- Warren, M. (2008). Memory Loss, Dementia, and Stroke: Implications for Rehabilitation of Older Adults with Age-Related Macular Degeneration. *Journal of Visual Impairment & Blindness*, October, 611–615.
- Waterman, P. G. (1993). PHYTOCHEMICAL DIVERSITY IN THE ORDER RUTALES. In *Phytochemical Potential of Tropical Plants* (Issue Table 1).
- Whitehouse, P. J., & Au, K. I. N. S. (1986). *CHOLINERGIC RECEPTORS IN AGING AND ALZHEIMER'S DISEASE and Kin Sin Au In AD, treatments.* 10, 665–676.
- Williams, P., & Howes, M. R. (2011). *Natural products as a source of Alzheimer's drug leads.* 28, 48–77. <https://doi.org/10.1039/c0np00027b>
- Wolfender, J. L., Marti, G., Thomas, A., & Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1382, 136–164. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.091>
- Woo, H. G., Lee, C. H., Noh, M., Lee, J. J., Jung, Y., & Baik, E. J. (2001). Rutaecarpine, a

- Quinazolinocarboline Alkaloid, Inhibits prostaglandin production in RAW264.7. *Planta Med*, 67, 505–509.
- Wright, C. W., ANDERSON, M. M., ALLEN, D., PHILLIPSON, J. D., KIRBY, G. C., WARHURST, D. C., & CHANG, H. R. (1993). Quassinoids Exhibit Greater Selectivity Against Plasmodium Falciparum Than Against Entamoeba Histolytica, Giardia Intestinalis Or Toxoplasma Gondii In Vitro. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(3), 244–246. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04910.x>
- Xiao, G. Q., Liang, B. X., Chen, S. H., Ou, T. M., Bu, X. Z., & Yan, M. (2012). 3-nitro-2H-chromenes as a new class of inhibitors against thioredoxin reductase and proliferation of cancer cells. *Archiv Der Pharmazie*, 345(10), 767–770. <https://doi.org/10.1002/ardp.201200121>
- Xing, S. H., Zhu, C. X., Zhang, R., & An, L. (2014). Huperzine A in the treatment of alzheimer's disease and vascular dementia: A meta-analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/363985>
- Xu, B. J., & Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>
- Yang, W., Wong, Y., Ng, O. T. W., Bai, L. P., Kwong, D. W. J., Ke, Y., Jiang, Z. H., Li, H. W., Yung, K. K. L., & Wong, M. S. (2012). Inhibition of beta-amyloid peptide aggregation by multifunctional carbazole-based fluorophores. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(8), 1804–1810. <https://doi.org/10.1002/anie.201104150>
- Yao, E. C., & Xue, L. (2014). *Therapeutic Effects of Curcumin on Alzheimer ' s Disease*. December, 145–159.
- Ye, J. Y., Li, L., Hao, Q. M., Qin, Y., & Ma, C. S. (2020). β -Sitosterol treatment attenuates cognitive deficits and prevents amyloid plaque deposition in amyloid protein precursor/presenilin 1 mice. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 24(1), 39–46. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2020.24.1.39>
- Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2004). Flavonoids and the brain: Interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(11), 1683–1693. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.002>
- Zelcer, N. (2012). *LXR Regulates Cholesterol Uptake Through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor Noam*. 100(2009), 100–104. <https://doi.org/10.1126/science.1168974>
- Zhang, Chen, H., & Wang, Z. (2011). *Comparative studies on antioxidant activities of extracts and fractions from the leaves and stem of Epimedium koreanum Nakai*. 2010. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0447-4>
- Zhang, H. Y. (2012). New insights into huperzine A for the treatment of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(9), 1170–1175. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.128>