

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

**Tratamiento del Alzheimer y el Parkinson,
limitaciones. Búsqueda de nuevas dianas
terapéuticas y fármacos.**

Autor/a: Danet Mazorra Ruiz

Tutor/a: Raúl Porcar García

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIO-ORGÁNICA
Junio 2022**

Índice General

1. Índice de abreviaturas	2
2. Introducción.....	3
2.1 Enfermedad de Alzheimer y su impacto social	3
2.2 Bases moleculares del Alzheimer	4
2.2.1 Factores e investigaciones novedosas sobre los mecanismos moleculares involucrados en la manifestación del Alzheimer.....	6
2.3 Tratamiento actual del Alzheimer, problemas y limitaciones	12
2.4 Enfermedad de Parkinson y su impacto social	14
2.5 Bases moleculares del Parkinson	15
2.5.1 Factores e investigaciones novedosas sobre los mecanismos moleculares involucrados en la manifestación del Parkinson.....	18
2.6 Tratamiento actual del Parkinson, problemas y limitaciones	26
3. Objetivos.....	28
4. La rivastigmina: fármaco para tratar el Alzheimer y el Parkinson	28
4.1 Rivastigmina: tipo de medicamento, familia, mecanismo de acción en Alzheimer y Parkinson	28
4.1.1 Rivastigmina: familia de los carbamatos.....	32
4.1.2 Rivastigmina: mecanismo de acción en Alzheimer y Parkinson.....	35
4.2 Mecanismos de síntesis de la rivastigmina. Derivados y mecanismo de acción.....	42
4.2.1 Síntesis de la rivastigmina.....	42
4.2.2 Derivados de la rivastigmina, mecanismo de acción y análisis de las interacciones con los residuos de las cavidades enzimáticas de la AChE y la BChE	44
4.2.3 Síntesis asimétrica sostenible de la rivastigmina	50
4.3 Optimización de las formulaciones de rivastigmina: híbridos, combinación con moléculas y nanovehículos	52
4.3.1 Híbridos de rivastigmina	52
4.3.2 Nanovehículos, estudio de nuevas formulaciones de la rivastigmina y vía de administración alternativa: nasal.....	55
4.4 Estrategias recientes de investigación y nuevas dianas terapéuticas para Alzheimer y Parkinson	58
4.4.1 Alzheimer: estrategias recientes y nuevas dianas terapéuticas	58
4.4.2 Parkinson: estrategias recientes y nuevas dianas terapéuticas	61
5. Conclusiones	63
6. Bibliografía	64

1. Índice de abreviaturas

APP: Proteína precursora amiloide

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

BHE: Barrera hematoencefálica

BChE: Butirilcolinesterasa

ChE: Colinesterasas

DARA: Aminación Reductiva Asimétrica Directa

DKR: Resolución cinética dinámica

EA: Enfermedad de Alzheimer

EP: Enfermedad de Parkinson

FCN: Factor de crecimiento nervioso

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MIPs: Polímeros de impresión molecular

NMDA: N-metil D-aspartato

NMDAR: Receptor del N-metil D-aspartato

NPs: Nanopartículas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PSEN1: Presenilina 1

PSEN2: Presenilina 2

PSs: Placas seniles

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SN: Sustancia negra

SNC: Sistema Nervioso Central

SPCD: Síntomas psicológicos y conductuales de la demencia

TFAM: Factor A de transcripción mitocondrial

TH: Tirosina hidroxilasa

2. Introducción

2.1 Enfermedad de Alzheimer y su impacto social

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es uno de los mayores retos y desafíos médicos del siglo XXI, de hecho, es la principal causa de demencia. Se estima que afecta a 46 millones de personas en el mundo, cantidad que se prevé será duplicada en los próximos 20 años.¹ Si la tendencia de envejecimiento y las cifras de incidencia permanecen estables, la proyección para 2050 es de 131 millones de pacientes; de los cuales 2/3 residirán en países en vías de desarrollo. La OMS incita a los gobiernos a tomar medidas que reduzcan el impacto socio-sanitario de esta enfermedad, incrementando los recursos destinados a la misma, potenciando además el desarrollo de planes nacionales de Alzheimer.²

La patología es un proceso crónico neurodegenerativo progresivo, los síntomas psicológicos y conductuales de la demencia (SPCD) generan gran sufrimiento en el paciente y en el cuidador, ambos inmersos habitualmente en un entorno físico y social frágiles que agravan el deterioro cognitivo y funcional, precipitando a su vez la institucionalización. Entre los síntomas psicológicos pueden citarse: depresión, ansiedad, psicosis; para el caso de los conductuales: agresividad, hiperactividad motora, desinhibición.³ Puede ocasionar además la muerte del paciente en un promedio de 5 a 12 años después del comienzo de los primeros síntomas.⁴

El Alzheimer es un claro exponente del concepto de enfermedad socio-sanitaria, incluye no solo al enfermo y al entorno cuidador/familia, sino también a las instituciones sanitarias y sociales, públicas o privadas involucradas en el proceso de atención al paciente. De acuerdo con estimaciones del año 2010, el coste (directos e indirectos) de la EA en España, sobrepasó los 16.000 millones de euros (aproximadamente el 15% del gasto sanitario total público y privado), el cual en 2010 fue de 99.899 millones de euros. Cifra que la ubicó a la cabeza de las enfermedades neurológicas en el gasto global.²

En general, la información o el número de publicaciones que abordan el costo del Alzheimer en España es escasa, por tanto, la Tabla 1 refleja estimaciones de dicho costo por paciente durante diferentes años, en base a evidencias económicas y epidemiológicas extraídas de diversas publicaciones científicas. Para los cálculos se extrapolaron valores de media europeos, ajustando los mismos al número de habitantes en España según el censo poblacional de 2010 (unos 46 millones de habitantes).⁵

Tabla 1. Publicaciones y cálculos estimados del costo del Alzheimer en España por paciente, según datos extraídos de los artículos citados.⁵

Publicación	Año	Moneda	Costo directo de asistencia sanitaria y médica (cuidados hospitalarios y no hospitalarios, medicamentos, procedimientos médicos)	Costo directo de asistencia no médica (asistencia social, transportes, gastos de adaptación)	Costo indirecto (abandono temporal o permanente del puesto de trabajo y retiro anticipado)	Costo total
Lopez-Bastida et al. (2006)	2001	Euro	3.289	24.281	628	28.198
Oliva et al. (2007)	2002	Euro		11.110		11.110
Sicras et al. (2005)	2003	Euro	5.706	15.444		21.150
Wimo et al. (2007)	2005	Dólar- USA	6.219	14.989		21.208
Coduras et al. (2010)	2006	Euro	4.272	12.708		16.980
Gustavsson et al. (2011)	2007	Libra esterlina	4.189	18.504		22.693

En Europa las patologías del cerebro consumen alrededor de la cuarta parte del gasto del presupuesto social destinado a las enfermedades, una proporción mucho más alta que en otras regiones del planeta. Dichas patologías en España generan un costo social (que se estimó en 84 billones de euros en 2010), 10 veces superior a las enfermedades cardiovasculares (estimadas en 7 billones de euros en 2003) o la diabetes (estimada en 8 billones de euros en 2009). Aunque se debe ser cauto con estas comparaciones debido a las diferencias en las metodologías para el cálculo; aun así, los desórdenes del cerebro exceden la carga económica de estos dos tipos de afecciones, líderes del gasto social en España.⁵

2.2 Bases moleculares del Alzheimer

Las bases fisiológicas y neuropatológicas de la EA en investigaciones recientes sugieren que las primeras lesiones histopatológicas las constituyen las placas amiloides extracelulares o placas seniles (PSs), también los agregados neurofibrilares e intracelulares de la proteína tau. Las PSs están constituidas por el depósito de los péptidos β -amiloides producidos durante el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) mediante las secretasas β y γ . Estos péptidos β -amiloides ($A\beta$) son insolubles, resistentes a la proteólisis y forman oligómeros,¹ se acumulan en placas cuyo diámetro oscila desde 10 hasta varios cientos de micrómetros y se distribuyen por amplias regiones del encéfalo que abarcan la corteza cerebral, el hipocampo, los ganglios basales, el tálamo y el cerebelo.⁶

De acuerdo con la hipótesis amiloide, la producción de los péptidos $A\beta$ en el cerebro inicia una cascada de eventos fisiológicos-patológicos que originan el síndrome clínico de la EA, provocando inflamación local, oxidación, toxicidad por exceso de glutamato e hiperfosforilación de tau. Dicha proteína se asocia a los microtúbulos facilitando el sistema de transporte neuronal; orgánulos celulares que además, estabilizan el necesario crecimiento del

axón para el desarrollo y la función correcta de la neurona. La proteína tau hiperfosforilada adopta una conformación insoluble, incapaz de asociarse a los microtúbulos, dejando de ser funcional, de modo que inhibe el transporte dentro de la neurona ocurriendo incluso el desacoplamiento de los microtúbulos en el citoesqueleto celular. Todo ello conlleva a la destrucción progresiva de las células neuronales, asimismo a la disminución y/o desbalance de varios neurotransmisores: acetilcolina, dopamina y serotonina. Estas alteraciones son las responsables de los síntomas cognitivos, conductuales y neurológicos de la EA.¹

En la Figura 1 se observa un modelo estructural de las fibras amiloides formadas por 40 péptidos β -amiloides ($A\beta_{1-40}$), basado en resultados experimentales obtenidos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Incluye además, un dominio estructural β -transversal (*cross- β unit*) común a todas las fibras que satisface las conclusiones de estudios de rayos X y de microscopía electrónica. El dominio es una estructura en doble capa; con hojas β paralelas entre sí, formadas por los residuos de la posición 12 a 24 (coloreados en naranja) y del 30 a 40 (coloreados en azul). Presenta un núcleo y una cara hidrofóbicos. Las hojas β se extienden perpendiculares al eje longitudinal de la fibra, mientras que los enlaces de hidrógeno intermoleculares lo hacen paralelos a dicho eje. Las fibras con una relación mínima de masa por longitud y diámetro están constituidas por dos dominios estructurales β -transversal con sus caras hidrofóbicas yuxtapuestas.⁷ En general, estas tienen naturaleza polimórfica debido a la variabilidad del empaquetado de los péptidos amiloides en su estructura.⁸

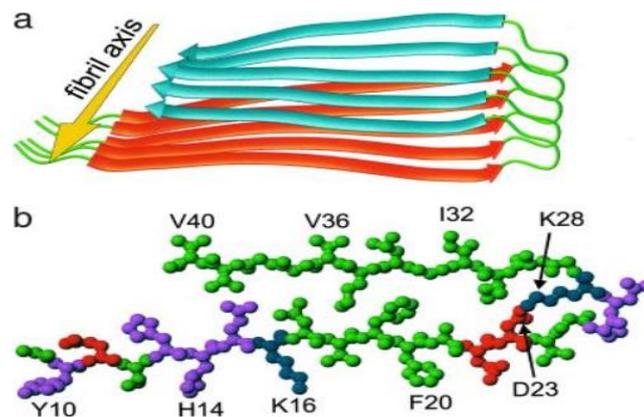


Figura 1. Modelo estructural de las fibras amiloides formadas por 40 péptidos β -amiloides ($A\beta_{1-40}$) según RMN. (a) Representación esquemática del dominio estructural β -transversal (*cross- β unit*). (b) Núcleo central de la molécula $A\beta_{1-40}$ visto desde abajo a lo largo del eje longitudinal de la fibra. Los residuos de color verde son hidrofóbicos.^{7,8}

La evidencia acumulada demuestra que los oligómeros de los péptidos β -amiloides son especies mucho más tóxicas que las fibras. Adoptan una estructura de β -barril cilíndrico, forman agregados anulares que se organizan en forma de anillos con moléculas de agua

atrapadas en su interior. La Figura 2 muestra el mecanismo de formación de las fibras A β -amiloides.

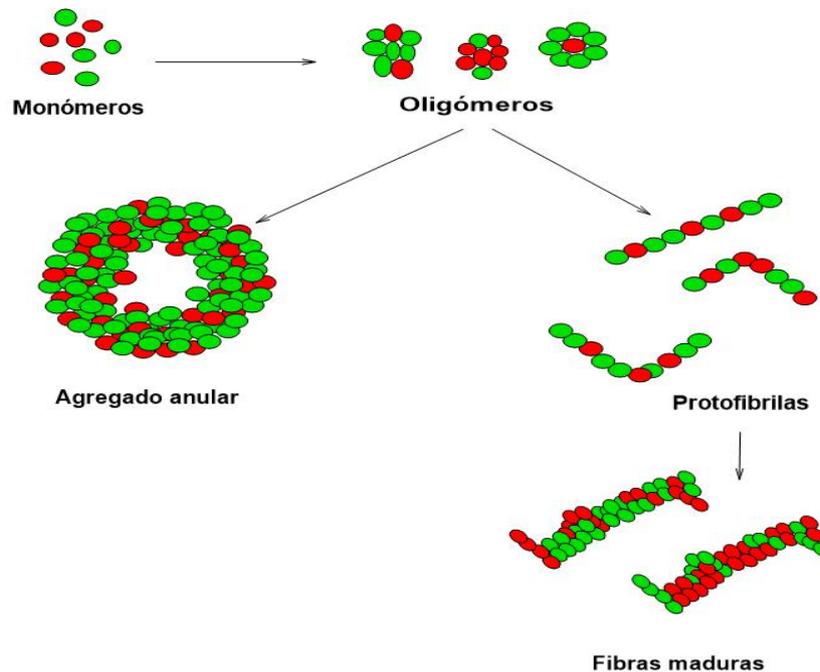


Figura 2. Mecanismo de formación de las fibras A β -amiloides.⁸

La patogenicidad de los oligómeros se asocia a diversos procesos:

- Aumento de la conductancia y permeabilidad de la membrana neuronal.
- Formación de canales iónicos discretos o poros de membrana que alteran la homeostasis de los iones e inducen procesos degenerativos como la formación de radicales libres y la fosforilación de tau.
- Se unen a receptores celulares de la superficie como el receptor del N-metil D-aspartato (NMDAR), causando disfunción sináptica y neurodegeneración, en este caso específico, inhiben los sistemas de señales asociados a dicho receptor.
- Activan el dominio de muerte en los receptores del factor de crecimiento nervioso (FCN), implicados en el mecanismo de la apoptosis.
- Perjudican la actividad de los proteasomas vía el sistema ubiquitina, con la consecuente acumulación de los propios oligómeros A β .⁸

2.2.1 Factores e investigaciones novedosas sobre los mecanismos moleculares involucrados en la manifestación del Alzheimer

- Mutaciones genéticas

Mutaciones en los genes de la proteína precursora amiloide (APP), de la presenilina 1 (PSEN1) y la presenilina 2 (PSEN2) constituyen la causa patogénica del Alzheimer

autosómico dominante. Mutaciones poco frecuentes en APP (A673V y E693Δ), originan la demencia a edades tempranas. Variantes comunes y raras en APP, PSEN1 y PSEN2 pueden constituir factores de riesgo, factores de protección o polimorfismo no patogénico. En la actualidad más de 90 variantes de importancia desconocida están incluidas en la base genética de la EA,⁹ y más de 200 mutaciones patogénicas han sido identificadas en APP, PSEN1 y PSEN2; estos últimos codifican partes del dominio catalítico del complejo enzimático de la γ -secretasa, enzima que realiza la escisión secuencial de la APP con la consecuente formación de los péptidos β -amiloides ($A\beta$).¹⁰

- Mecanismos epigenéticos

Hoy en día se acepta que el SNC adulto exhibe una enorme flexibilidad morfofuncional, realiza procesos de remodelación estructural incluso tras haber alcanzado su desarrollo y maduración. Los mecanismos epigenéticos tienen un papel crucial en la modificación sináptica, formación y desarrollo de la memoria. Alteraciones de los mismos, generan déficit cognitivo y de memoria en la enfermedad de Alzheimer; esencialmente la acetilación de histonas y la metilación del ADN.

Durante el procesamiento de la APP, además del fragmento extracelular β -amiloide, se produce también otro fragmento intracelular llamado dominio intracelular APP (AICD). Este interactúa *in vitro* con la HAT-TIP60 (histona acetiltransferasa) y coactúa como un activador transcripcional, lo cual sugiere que la EA está asociada a la acetilación de histonas. En cultivos celulares la hipometilación de la región promotora del gen PSEN1 (gen presenilina1 que codifica para un miembro del complejo γ -secretasa), incrementó la expresión de presenilina y potenció la formación de las placas β -amiloides. Por lo cual pueden resultar agentes terapéuticos potenciales, donadores de metilo y/o los fármacos que actúan sobre el metabolismo de los metilos.¹¹

- Epistasia

Para la patología Tau y β -amiloide se identificaron 2803 y 464 candidatos de interacciones SNP-SNP respectivamente. Estas interacciones entre genes incentivan la búsqueda de nuevos medicamentos, por ejemplo, diversas interacciones que incluyen MAPK9-CAMKK1 y GRIN2A-EPHA4, están involucradas en sistemas de señales dependientes de Ca^{2+} , lo cual aporta nuevas evidencias sobre la disrupción del calcio celular.¹²

Se han descrito SNPs localizados en genes mitocondriales y nucleares involucrados en la regulación de las rutas metabólicas en la mitocondria, los cuales se asocian con el riesgo de padecer EA. Entre estas rutas que regulan destacan: la respuesta al estrés oxidativo, el transporte mitocondrial y la fosforilación oxidativa.¹³

- Alteraciones del ADN mitocondrial (mtADN), estrés oxidativo y mitofagia

El cerebro se corresponde con el 2% del peso total del organismo, pero consume el 20% del oxígeno total en el mismo. Numerosos estudios evidencian una fuerte correlación entre la alteración secuencial del mtADN (daño oxidativo, mutación, metilación de bases) y el inicio, la progresión de diferentes enfermedades neurodegenerativas, entre ellas el Alzheimer.¹⁴ El órgano cerebral es particularmente sensible al estrés oxidativo debido a su alta demanda de oxígeno, elevados niveles de ácidos grasos poliinsaturados, bajas concentraciones de antioxidantes, y relativamente altas de iones de metales de transición.¹⁵

Las mutaciones muy probablemente estén originadas por las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las neuronas, estas oxidan la guanosina formando 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, con los consecuentes desapareamientos de bases, mutaciones puntuales aleatorias y deleciones. Las abundantes mutaciones en el mtADN provocan una cadena respiratoria afuncional, que afecta la síntesis proteica, el potencial de membrana, la generación de los propios ROS aumenta, y se inhibe la síntesis del trifosfato de adenosina o ATP. Así, la disrupción de la cadena respiratoria genera mutaciones en el mtADN y viceversa. Elevados niveles de ROS también desregulan el control epigenético, induciendo la desmetilación del mtADN.

Los efectos patogénicos de los péptidos β -amiloides ($A\beta$) son estimulados por ROS. Los péptidos pueden modular el comportamiento de orgánulos, como es el caso de la asociación de las membranas de la mitocondria y del retículo endoplasmático.

Otro mecanismo patológico observado es la represión de la mitofagia, de manera que se acumulan las mitocondrias defectuosas y las mutaciones patológicas del mtADN.

Las metilaciones del mtADN y transiciones, por ejemplo: posición 5633 T→C; posición 7476T: C→T; y posición 15812A: G→A; juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad sobre los 65 años. El haplogrupo HV y B5a se asocian con el riesgo de padecer la EA, mientras que el haplogrupo JT protege.

Agentes terapéuticos como las: vitaminas, flavonoides y ácidos grasos omega 3, capaces de suprimir el estrés oxidativo y por tanto las perturbaciones del mtADN, podrían ser útiles en la prevención de la EA. Pacientes con déficit de folato desarrollan perturbaciones del mtADN asociadas con un alto riesgo de padecer Alzheimer.¹⁴

- Metales

En el cerebro de pacientes enfermos con la EA se ha observado acumulación y altas concentraciones de los iones: cobre (Cu), hierro (Fe) y zinc (Zn), incluso un elevado estrés

oxidativo; ambos factores están involucrados en eventos patológicos y la muerte neuronal. Así, el Alzheimer es estudiado también como una enfermedad de desequilibrio o ruptura de la homeostasis de los metales, lo cual induce daño oxidativo en las neuronas. La presencia de Cu, Fe y Zn en las placas seniles es proporcional a la de los péptidos β -amiloides ($A\beta$) en el órgano cerebral.

Alrededor de la mitad de las proteínas del organismo requieren unirse a metales formando metaloproteínas, con una actividad más eficiente. El cerebro precisa concentraciones relativamente altas de Cu, Fe y Zn para el mantenimiento de la estructura celular, la actividad enzimática, la actividad neuronal y la regulación de la expresión génica; no obstante, existen evidencias de que los iones de estos metales se unen a los péptidos β -amiloides ($A\beta$) potenciando la formación de los agregados $A\beta$ con el daño neuronal consecuente.

El cobre, hierro y el zinc en exceso, se acumulan en las PSs de los pacientes con Alzheimer en una proporción 5,7; 2,9 y 2,8 veces respectivamente, en comparación con cerebros normales. Diversos estudios han expuesto el uso de agentes quelantes como opciones terapéuticas para regular la neurodegeneración inducida por metales, aquí la evaluación de la afinidad de las interacciones entre los metales y las proteínas del cerebro es vital para identificar nuevos agentes realmente útiles.¹⁶

- Priones

Se ha demostrado que los péptidos β -amiloides ($A\beta$) y la proteína tau pueden autorreplicarse de manera similar al mecanismo de la proteína prion (PrP). Además, son capaces de diseminarse célula a célula y ser considerados, por tanto, proteínas infecciosas en un único organismo. Los datos estructurales muestran disposiciones similares en las proteínas mal plegadas (tanto en los priones que originan las Encefalopatías espongiformes transmisibles como en los péptidos β -amiloides ($A\beta$)), lo cual hace plausible que estas proteínas compartan un código semiótico-biológico común (transmite su información a través de las conformaciones tridimensionales proteicas). Debido a estas similitudes, y al estar asociado el Alzheimer al plegamiento erróneo de proteínas, se ha considerado la EA en términos de enfermedad priónica; este enfoque ayudaría a profundizar en la patología desde una perspectiva biosocial.¹⁷

- Activación de la microglía y neuroinflamación

Las células de la microglía son macrófagos especializados del SNC, realizan la fagocitosis y la presentación del antígeno. Son esenciales para el normal funcionamiento y mantenimiento de la integridad del tejido, el reciclaje de las neuronas muertas, la organización

de la sinapsis, el control de la excitabilidad de la neurona, la eliminación de los patógenos, la remodelación de los circuitos neuronales y el mantenimiento de la homeostasis del sistema nervioso central.

Las células de la microglía constituyen un tipo de células gliales, únicas células del sistema inmune innato en el SNC e incluso, están restringidas a este. Componen alrededor del 10-15% del total de las células gliales del cerebro. Durante la activación cambian su morfología y expresan receptores de MHC II.¹⁸

La neuroinflamación regulada por la microglía es un factor determinante en el Alzheimer. Tanto los péptidos β -amiloides como la proteína tau hiperfosforilada activan la microglía con la subsecuente inflamación, pérdida de neuronas y de sinapsis neuronal.

La activación de la microglía exhibe dos fenotipos denominados M1 y M2, aunque existen diversas opiniones sobre la existencia de disímiles fenotipos. A través de las citoquinas proinflamatorias, M1 contribuye al desarrollo de la inflamación y la neurodegeneración; mientras que M2 tiene efectos antiinflamatorios, contribuyendo así a la reparación del tejido y la neuroprotección. Los fenotipos M1 y M2 son interconvertibles (Figura 3).¹⁹

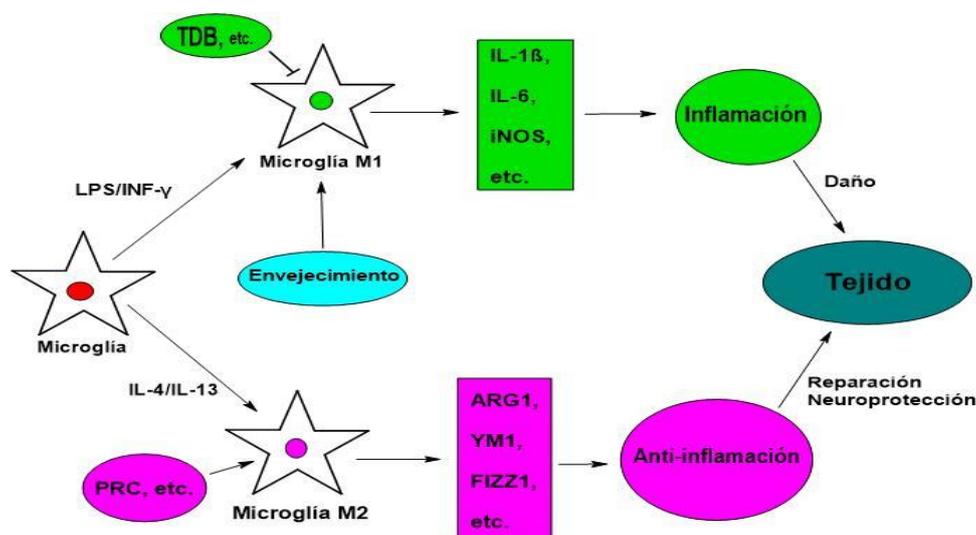


Figura 3. Fenotipos M1 y M2 de las células de la microglía activada. M1 puede ser inducido por el lipopolisacárido y el interferón- γ (LPS/IFN- γ), lo cual conlleva al incremento de factores proinflamatorios. M2 se induce con IL-4/IL-13, como resultado aumentan los niveles de factores antiinflamatorios. De modo que la microglía M1 contribuye a la respuesta inflamatoria, mientras que M2 contribuye a la neuroprotección y reparación del tejido.¹⁹

M1 puede ser inducido por el lipopolisacárido (LPS) y el interferón- γ (IFN- γ). La interleuquina-4 y la interleuquina-13 (IL-4/IL-13) inducen el fenotipo M2. Se han utilizado como marcadores de la microglía M1, factores asociados a la inflamación: IL-1 β , IL-6 y la inducción

de la óxido nítrico sintasa (iNOS). Respecto a M2, como marcadores se han empleado arginasa 1 (ARG1), la quitinasa (YM1, también conocida como CHI3L3) y la proteína encontrada en zonas de inflamación (FIZZ1).

La polarización de la microglía (entre M1 y M2) puede ser regulada. Por ejemplo, la sobreexpresión del cofactor transcripcional (PRC, *PGC-1-related coactivator*) aumenta los niveles de los mRNA de los marcadores M2. Sin embargo, la (TDB, *Trehalose-6,6'-dibehenate*) inhibe la expresión de los marcadores M1.

Los agregados A β inducen el fenotipo M1, el cual libera citoquinas que activan a los astrocitos, potenciando la pérdida de neuronas. Inicialmente la microglía fagocita los péptidos A β y los degrada, pero la activación crónica de M1 dificulta la degradación de los agregados A β , acelerando el progreso de la EA.¹⁹

Cada vez es mayor la evidencia de que tau también activa el fenotipo M1. Por otro lado, las citoquinas proinflamatorias regulan la fosforilación de tau facilitando la formación de los agregados de tau hiperfosforilada (la IL-1 β secretada por la microglía dispara la fosforilación).¹⁹ Está bien establecido que tau posee un comportamiento de propagación similar a la proteína prion, contaminando a otras neuronas secundarias. En dicha transmisión el papel de la microglía aún está sujeto a debate, no obstante, las vesículas celulares juegan un papel importante en la expansión de tau neurona a neurona mediado por la microglía.²⁰

El balance entre M1 y M2, o bien inducir el cambio fenotípico de M1 hacia M2, puede ofrecer un gran potencial terapéutico para la EA.¹⁹

- Factores ambientales

Diferentes factores ambientales contribuyen al riesgo de padecer Alzheimer. Algunos influyen en los primeros años de vida y otros interactúan con factores genéticos. La mayoría de los casos se atribuyen a la acción e interacción de los condicionantes genéticos endógenos y el medioambiente; ambos como desencadenantes al unísono. La Tabla 2 expone diversos factores asociados a un alto o bajo riesgo de desarrollar la EA.²¹

Tabla 2. Factores asociados a un alto/bajo riesgo de desarrollar Alzheimer.²¹

ALZHEIMER	FACTORES
ALTO RIESGO, EVIDENCIA SÓLIDA	Pesticidas, hipertensión, colesterol, hiperhomocisteinemia, tabaco, trauma severo en la cabeza, depresión.
ALTO RIESGO, EVIDENCIA DÉBIL	Consumo de aluminio (agua), alcohol en exceso, obesidad, anemia crónica, hiperinsulinemia, diabetes mellitus, campos electromagnéticos desde redes eléctricas.
BAJO RIESGO, EVIDENCIA SÓLIDA	Consumo moderado de alcohol, ejercicio físico, tratamiento hormonal alrededor de la menopausia.
BAJO RIESGO, EVIDENCIA DÉBIL	Dieta mediterránea, café, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID).

2.3 Tratamiento actual del Alzheimer, problemas y limitaciones

El tratamiento del Alzheimer requiere un enfoque multidimensional. Sin embargo, el tratamiento farmacológico actual basado en anticolinesterásicos y/o memantina, no revierte los síntomas cognitivos, simplemente enlentece la progresión de la patología, pues su acción se enfoca a compensar el desbalance de los neurotransmisores. Actualmente no existe una prevención eficaz, ni una terapia etiopatogénica que cure o revierta la enfermedad; son tratamientos sintomáticos, modestamente efectivos para mejorar la cognición y las alteraciones conductuales. A todo ello se suma que presentan contraindicaciones, interacciones medicamentosas y efectos adversos.²²

Los anticolinesterásicos (inhibidores de la acetilcolinesterasa) aprobados hoy son el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina (Tabla 3), estos aumentan la disponibilidad de acetilcolina durante la sinapsis y se ha demostrado clínicamente que retrasan los síntomas cognitivos. La memantina es un antagonista no competitivo del receptor NMDA (N-metil D-aspartato), disminuyendo los efectos tóxicos de una elevada concentración de glutamato y la disfunción neuronal asociada.¹

Tabla 3. Aspectos farmacológicos de los medicamentos para la EA.¹⁹

	Donepezilo	Rivastigmina	Galantamina	Memantina
Clase química	Piperidina	Carbamato	Alcaloide fenantreno	Clorhidrato
Selectividad	Acetilcolinesterasa	Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa	Acetilcolinesterasa Receptor nicotínico	Glutamato
Mecanismo de inhibición	Inhibidor selectivo y reversible.	Inhibidor pseudo-irreversible de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, competitivo, con acción selectiva en hipocampo y cortex. Inhibe la colinesterasa 4 veces más en el SNC que en los tejidos periféricos, actuando fundamentalmente sobre la forma G1, predominante en los cerebros de pacientes con EA.	Inhibe la acetilcolinesterasa de forma selectiva, competitiva y reversible. También realiza una modulación alostérica de los receptores nicotínicos, aumentando la actividad de la acetilcolina sobre los mismos, a partir de ciertas concentraciones. Aumenta la densidad de unión de la nicotina a los receptores nicotínicos de corteza a hipocampo.	Bloqueo no competitivo del receptor NMDA. Actúa sobre la vía del glutamato implicada en los procesos de aprendizaje y memoria (neurotransmisión glutamatérgica en hipocampo). También disminuye la neurodegeneración; ya que una actividad glutamatérgica excesiva tiene efectos neurotóxicos: disfunción neuronal.
Metabolismo	Hepático. Se une a proteínas plasmáticas en un 95%, se metaboliza por vía renal y hepática.	Hepático y metabolismo mínimo en el intestino. Débil unión a las proteínas plasmáticas (40%) por lo que presenta escasa interacción con fármacos de gran afinidad proteica.	Hepático 75% y renal 25%. Se une débilmente a las proteínas plasmáticas (18%).	Renal
Vida media	70 horas. Alcanza el estado de equilibrio 3 semanas tras el	1-2 horas por vía oral y 3-4 horas por administración transdérmica. Aunque la	6 a 8 horas.	60 a 100 horas.

	inicio del tratamiento.	duración de su acción es mayor: bloquea 8.5 horas a la acetilcolinesterasa y 3.5 horas a la butirilcolinesterasa.		
Dosis diaria	1	2	1 o 2	1 o 2
Presentación	Comprimidos. Solución.	Cápsulas. Parches transdérmicos.	Tabletas. Cápsulas de liberación lenta.	Comprimidos. Tabletas.
Citocromo e inductores enzimáticos	Inhibidores de la CYP2D6 y CYP3A4, inhiben su metabolismo aumentando su concentración: ketoconazol y quinidina, itraconazol, eritromicina, fluoxetina, paroxetina. Contrariamente la disminuye, la interacción con inductores enzimáticos: rifampicina, fenitoína, carbamacepina y alcohol.	Mínima	Inhibidores de los sistemas citocromos P450 (CYP2D6 y CYP3A4), aumentan su biodisponibilidad. Ejemplo: paroxetina, fluoxetina, fluvoxamina, quinidina, eritromicina, ritonavir, ketoconazol.	Amantadina, ketamina, baclofeno, cimetidina, ranitidina, quinidina.
Interacciones	Relajantes musculares, ketoconazol, quinidina, rifampicina, fenitoína, carbamacepina, alcohol.	Relajantes musculares.	Relajantes musculares, digoxinas, β -bloqueantes.	Agitación, psicosis.
Efectos secundarios	Náuseas, vómitos, diarreas, anorexia, pérdida de peso.	Náuseas, vómitos, diarreas, anorexia, pérdida de peso. Los parches transdérmicos pueden inducir erupciones en la zona de aplicación.	Náuseas, vómitos, diarreas, pérdida de peso.	En general es bien tolerada, las reacciones adversas más frecuentes son agitación y alucinaciones. Se ha descrito también dolor de cabeza, confusión, constipación, tensión alta y vértigos. ²³ En raras ocasiones tiene reacciones cardíacas adversas como bradicardia. ²⁴
Contraindicación	Asma, EPOC, arritmias cardíacas severas (bradicardia y síncope), enfermedad del seno Ulcus gastroduodenal activo, anestesia.	Asma, EPOC, arritmias cardíacas severas (bradicardia y síncope), enfermedad del seno Ulcus gastroduodenal activo, anestesia.	Asma, EPOC, arritmias cardíacas severas (bradicardia y síncope), enfermedad del seno Ulcus gastroduodenal activo, anestesia.	Hipersensibilidad a la memantina. Deben ser observados atentamente, pacientes con padecimientos del corazón como fallo cardíaco, arritmias; debido a raros efectos cardíacos adversos descritos recientemente y cuyo

				mecanismo aún se desconoce. ²⁴
Grado de la enfermedad	Tratamiento sintomático de la EA, grado leve a moderadamente grave.	Tratamiento sintomático de la EA, grado leve a moderadamente grave.	Tratamiento sintomático de la EA, grado leve a moderadamente grave.	Tratamiento de la EA de moderada a grave. Se utiliza tanto sola, como en combinación con los anticolinesterásicos.

2.4 Enfermedad de Parkinson y su impacto social

La enfermedad de Parkinson (EP) es la patología neurodegenerativa más frecuente después del Alzheimer, se caracteriza por una discapacidad motora, seguida de trastornos cognitivos y demencia.⁸ Afecta en todo el mundo a unos 6 millones de personas, se estima que esta cantidad se duplique en 2040.²⁵

El 90-95% de los casos son esporádicos, o sea, no están asociados a factores genéticos de herencia mendeliana. Múltiples factores de riesgo genéticos y ambientales contribuyen a la probabilidad de desarrollar Parkinson esporádico. El Parkinson familiar con una herencia mendeliana de mutaciones genéticas, representa entre el 5-10% de las estadísticas.²⁶ La edad media de manifestación de este trastorno neurológico es sobre los 55 años, aunque el riesgo de padecerlo aumenta con el envejecimiento.²⁷

La incidencia del Parkinson es de 21/100.000 habitantes por año, afecta al 1% del adulto mayor sobre los 60 años de edad. En España la incidencia es de 1,9/1.000 habitantes, lo cual le convierte en la causa más común de asistencia presencial a las consultas de neurología. Debido a la naturaleza intrínseca de la enfermedad, se estima que está infradiagnosticada.²⁸

Se desarrolla de modo gradual y lento, es una degeneración del cerebro compleja y multisistema.⁸ La mayoría de los síntomas motores se manifiestan como temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia, acinesia, hipomimia, hipofonía, salivación, disfagia, trastornos del movimiento y de la marcha, inestabilidad postural y micrografía. Los síntomas no motores incluyen dolor, fatiga, disfunción sexual, pérdida de autonomía, discapacidad cognitiva, trastornos del sueño, depresión, deterioro de la memoria, carencia de iniciativa, respuesta tardía, pasividad, psicosis, confusión y trastornos psiquiátricos.^{27,28} El dolor es el síntoma no motor más frecuente en los pacientes y puede aparecer previo a los síntomas motores.²⁷

Algunos autores plantean que, con síntomas motores tan visibles, la EP está impregnada de mitos y falsas ideas que inevitablemente producen manifestaciones sociales y psiquiátricas: depresión, aislamiento y estigmatización. Defienden que el estigma es un aspecto psicosocial al que se debe prestar más atención para poder abordar el padecimiento adecuadamente y en toda su magnitud.²⁹ La tasa de mortalidad del Parkinson ha ido

aumentando y se estima aproximadamente en 1,5 respecto al total de la población; aunque su cuantificación objetiva se dificulta.³⁰

Es una patología crónica, progresiva e irreversible con un fuerte impacto social; la calidad de vida de los pacientes, familiares y cuidadores es afectada en extremo. Exhibe además una gran carga económica, resultado de los requerimientos de cuidados cada vez más exigentes hacia el paciente con la progresión de la enfermedad.²⁸ Supone un costo social en España que excede los 17.000 euros anuales por paciente.³¹ Una estimación de dicho valor en el año 2004 (gastos directos e indirectos incluidos), arrojó un valor de 19.432 euros por paciente.

A continuación, se muestra la Tabla 4 con estadísticas de la enfermedad para el año 2010 en España; se observa el número de individuos afectados, el costo por paciente y el costo social asociado.

Tabla 4. Número de pacientes de Parkinson, costo por paciente y costo social de la enfermedad en España (2010).⁵

Número de pacientes	Costo por paciente (euros)				Costo Social (millones de euros)			
	Costo directo de asistencia sanitaria y médica	Costo directo de asistencia no médica	Costo indirecto	Costo total	Costo directo de asistencia sanitaria y médica	Costo directo de asistencia no médica	Costo indirecto	Total
79.789	8.614	4.866	9.612	23.091	687	388	767	1.842

2.5 Bases moleculares del Parkinson

La EP es un trastorno neurodegenerativo ligado a la formación de agregados de la proteína α -sinucleína, cuyo origen estriba en un plegamiento aberrante de la misma. La pérdida de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la sustancia negra (SN) de la parte compacta del cerebro, se asocia a la presencia de agregados (cuerpos de Lewy y neuritas) en el tronco encefálico, el sistema límbico y las áreas corticales, con la consecuente reducción de la dopamina en el órgano cerebral.⁸

Los cuerpos de Lewy son inclusiones intraneuronales que contienen agregados de la α -sinucleína, los cuales a su vez pueden contener varios neurofilamentos proteicos y proteínas asociadas a la proteólisis, por ejemplo, ubiquitina. La muerte celular ocurre (vía la acción de los agregados de α -sinucleína), fundamentalmente por pérdida de la integridad de la membrana nuclear y liberación de factores nucleares como las histonas. La forma aberrante de la α -sinucleína daña el sistema de degradación de las proteínas, altera la función de los proteasomas, los lisosomas e induce la macroautofagia afectando la supervivencia neuronal. Una vez que la formación de sus agregados comienza, pueden propagarse hacia otras células por medios directos o indirectos. Comparativamente, respecto al cerebro de individuos sanos,

alrededor de un 50-70% de las neuronas dopaminérgicas desaparecen en pacientes fallecidos con Parkinson.

La α -sinucleína es una proteína pequeña (14 KDa) con 140 aminoácidos, está altamente cargada, la codifica el gen SNCA y constituye el 1% de las proteínas totales en el citosol de la neurona. Es abundante en los terminales presinápticos donde se asocia a las vesículas sinápticas. Pertenece a la familia de las sinucleínas que incluye a las variantes gamma y beta. Posee un extremo N-terminal anfipático con una estructura probable en hélice alfa, la cual facilita el anclaje a la membrana lipídica y tiene, además, un importante papel en la formación de los agregados. Por otro lado, el componente no amiloide del extremo C-terminal es capaz de unirse al Ca, lo cual inhibe la agregación de la proteína.²⁷

La función de la α -sinucleína no está clara del todo, los investigadores sugieren que está involucrada en la regulación de la función neuronal y liberación de la dopamina, el tráfico de vesículas y el estrés oxidativo. En general, se describen también diversos efectos neurotóxicos en la EP, no asociados directamente a la pérdida de su conformación nativa y la consecuente formación de agregados amiloides:

- a) La sobreexpresión de la α -sinucleína puede alterar la homeostasis del calcio y dañar las neuronas dopaminérgicas.
- b) Regulación de la distribución de las vesículas presinápticas y el tamaño de los terminales presinápticos. Tiene gran afinidad por los fosfolípidos de membrana, especialmente de las vesículas presinápticas, en membranas de gran curvatura y microdominios específicos de membrana; dicha unión ocurre a través del extremo N-terminal de la proteína.
- c) El aumento de los niveles de α -sinucleína disminuye los de dopamina, así como la neurotransmisión glutaminérgica mediante la interacción con el complejo de la proteína SNARE. De este modo modula el tráfico de las vesículas entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi; inhibe la maduración de las vesículas celulares y reduce el contacto sináptico.
- d) La sobreexpresión del monómero la α -sinucleína tipo nativo, inhibe la endocitosis y afecta la neurotransmisión. Altera la síntesis, el almacenamiento, el reciclaje y la liberación de la dopamina.
- e) Altas concentraciones reducen la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima involucrada en la producción de dopamina, ya que estabiliza a la TH en su forma inactiva.

- f) Elevadas concentraciones atenúan la actividad del transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2). La dopamina es almacenada en vesículas vía dicho transportador tras su síntesis, para reducir la oxidación del neurotransmisor.
- g) Influye en la dinámica del citoesqueleto celular. La α -sinucleína puede interactuar y repercutir en la polimerización de la actina, afectando el tráfico celular.²⁷

Las mutaciones, la acumulación anormal y los cambios conformacionales de la α -sinucleína propician la formación de oligómeros ricos en hojas β con estructura heterogénea (esferas, cadenas o anillos). Estos se secretan en el espacio extracelular y participan significativamente en la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas y la neuroinflamación. Los oligómeros interactúan para formar fibras amiloides mucho más estables, las cuales se agregan para formar los cuerpos de Lewy.

En la mitocondria los oligómeros originan pérdida de la actividad del Cl, despolarización del potencial de membrana, alteración de la homeostasis del Ca^{2+} y aumento de la liberación de citocromo c. Otro efecto de los oligómeros es la formación de oligómeros de tau, inductores de la apoptosis neuronal. Adicionalmente se ha reportado que los oligómeros de tau inducen la oligomerización de la α -sinucleína *in vitro*; por tanto, el estrés oxidativo tiene una influencia significativa en la neurotoxicidad tanto de tau como de la α -sinucleína.¹⁴

La Figura 4 muestra una estructura tridimensional 3D de la fibra de α -sinucleína, simulada a partir de estimaciones y cálculos informáticos consistentes con los resultados experimentales obtenidos por RMN. Expone una conformación donde los residuos del centro de la estructura de la fibra se organizan en paralelo, en hojas β , con una topología de llave griega (*Greek-key*), que exhibe enlaces de hidrógeno a lo largo del eje longitudinal de la fibra. Existe el consenso de una estructura amiloide rica en hojas β y un corazón hidrofóbico; la cual posee gran complejidad estructural: un puente salino intermolecular; una escalera (*ladder*) de glutamina; fuertes interacciones entre residuos pequeños, cercanos en el espacio; y diversas cremalleras (*zippers*) estéricas que estabilizan la topología de llave griega (*Greek-key*). Estas características contribuyen a la propagación robusta de la fibra en el espacio. Patrones de difracción de rayos X indican una estructura β -transversal (*cross- β*).³² Las fibras son polimórficas, capaces de existir en múltiples formas.²⁷

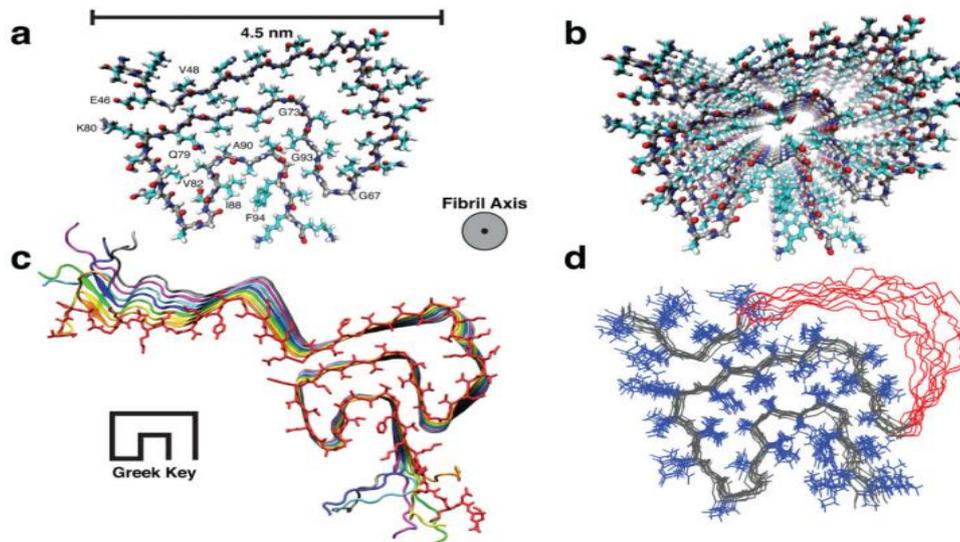


Figura 4. (a) Vista de un monómero desde los residuos 44 a 96, observado desde abajo a lo largo del eje longitudinal de la fibra. Muestra el motivo en llave griega (*Greek-key*) del corazón de la fibra. (b) Imagen de los monómeros apilados. Se observa el alineamiento lateral entre cada monómero, vistos desde abajo a lo largo del eje longitudinal de la fibra. (c) Residuos del 25 a 105, correspondientes a 8 monómeros. Se muestra la estructura en hojas β de cada monómero en la fibra y la topología de llave griega (*Greek-key*) en el corazón de la fibra. (d) Superposición de 10 estructuras de mínima energía mostrando coincidencias en las posiciones laterales dentro del corazón de la fibra (residuos 46 a 54 y 63 a 96). Los residuos 51 a 57, se observan en rojo con sus cadenas laterales omitidas para mayor claridad de la imagen.³²

Se ha propuesto que el mal plegamiento de los péptidos β -amiloides ($A\beta$) en la neuropatología del Alzheimer puede influenciar la progresión de la enfermedad de Parkinson, actuando sinérgicamente con la formación de agregados de α -sinucleína y viceversa. Contrariamente, en una publicación puntual, un equipo de investigación excluyó cualquier asociación entre ambos mecanismos patológicos para la EP.⁸

2.5.1 Factores e investigaciones novedosas sobre los mecanismos moleculares involucrados en la manifestación del Parkinson

- Mutaciones genéticas

La EP es una enfermedad compleja con contribuciones tanto genéticas como ambientales. La evidencia sugiere que la presencia de Parkinson en la historia familiar aumenta de 3 a 4 veces el riesgo de padecer la patología. La variación genética contribuye al 25% del riesgo total; las variantes genéticas varían en términos de frecuencia de alelos y riesgo de desarrollar la neurodegeneración (Figura 5). Existen variantes raras en genes únicos, suficientes y capaces por sí solas de generar la afección (son patogénicas). Ejemplos

de estos genes incluyen: SNCA, PARK7 y PRKN. Por otro lado, existen gran cantidad de variantes genéticas comunes que individualmente contribuyen poco al riesgo de desarrollar la EP. En el centro de este espectro se encuentran variantes poco comunes (aunque no raras), con un riesgo intermedio; es el caso de GBA y LRRK2. Los genes PRKN, PINK1 y PARK7 son reguladores genómicos de la función mitocondrial. El loci MAPT codifica la proteína tau, cuyos agregados se encuentran en diversas neuropatologías como el Alzheimer, la demencia frontotemporal y la parálisis supranuclear progresiva.²⁵

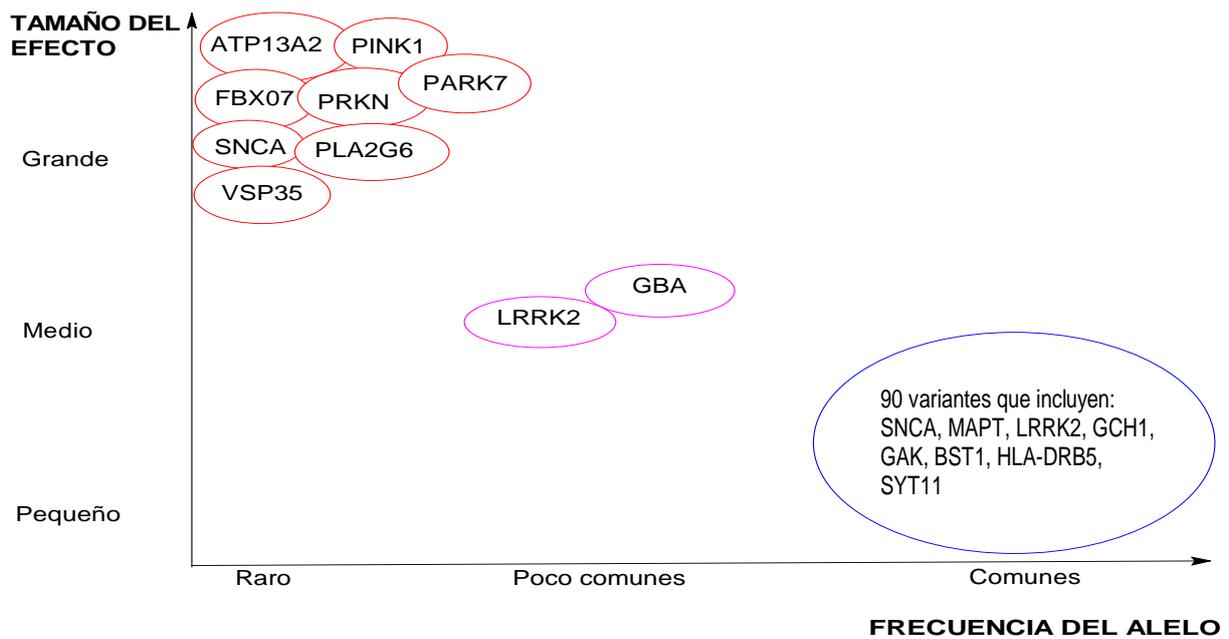


Figura 5. Resumen de las variantes genéticas en la EP, agrupadas según la frecuencia del alelo y el riesgo de desarrollar la enfermedad.²⁵

Un rango de loci y genes se han asociado a fenotipos del Parkinson heredados de forma mendeliana, se designaron originalmente como el locus “PARK”, donde el número es representativo del orden cronológico en el cual se descubrieron. Sin embargo, múltiples loci pueden referirse al mismo gen (PARK1 y PARK4 hacen alusión al gen SNCA). La recomendación actual es utilizar preferentemente el nombre de los genes. En la Tabla 5 se describen los genes con su nomenclatura original y los nombres recomendados para mayor claridad.

Tabla 5. Resumen de variantes monogénicas relacionadas con la EP.²⁵

Características	Nombre aprobado del gen	Nombre alternativo del gen	Herencia	Patogenicidad	Fenotipo de la EP	Función
Penetrancia alta	SNCA	PARK1, PARK4, NCAP	Autosómica dominante	Patogénico	Aparición temprana	Incierta (codifica la α -sinucleína)
	VPS35	ARK17, MEM3	Autosómica dominante	Patogénico	Típico	Retrómero y tráfico endosomal

	PINK 1	PARK6	Autosómica recesiva	Patogénico	Aparición temprana	Mitocondrial
	PARK 7	DJ-1	Autosómica recesiva	Patogénico	Aparición temprana	
	PRKN	ARK2, PARKIN	Autosómica recesiva	Patogénico	Aparición temprana	
	PLA2G6	PARK14, IPLA2	Autosómica recesiva	Patogénico	Aparición temprana, atípico	Membrana celular
	ATP13A2	PARK9	Autosómica recesiva	Patogénico	Aparición temprana, atípico	Lisosomal
	FBX07	PARK15, FBX7	Autosómica recesiva	Patogénico	Aparición temprana, atípico	Mitocondrial
	POLG	POLG1, POLGA	Autosómica dominante	Patogénico	Aparición temprana, atípico	Conservación del ADN mitocondrial
	DNAJC6	PARK19, DJC6	Autosómica recesiva	Parece patogénico	Aparición temprana	Formación de vesículas sinápticas y tráfico vesicular
	DNAJC13	PARK21, RME8	Autosómica dominante	Resultados en conflicto	Típico	
	TMEM230	C20ORF30	Autosómica dominante	Resultados en conflicto	Típico	
	SYNJ1	PARK20	Autosómica recesiva	Patogénico	Aparición temprana, atípico	
	VPS13C	PARK23	Autosómica recesiva	Patogénico	Aparición temprana	Mitocondrial
	CHCHD2	-	Autosómica dominante	Patogénico	Típico	Incierta
	DCTN1	-	Autosómica dominante	Patogénico	Atípico	Microtúbulos
Penetrancia variable	LRRK2	PARK8, DARDARIN	Autosómica dominante	Patogénico	Típico	Lisosomal, mitocondrial, microtúbulos
	GBA	GBA1	Autosómica dominante	Patogénico	Típico	Lisosomal
Relacionados con la EP pero es improbable que sean patogénicos	HTRA2	-	Autosómica dominante	Incierta/ Parece benigno	-	Mitocondrial
	UCHL1	PARK5	Autosómica dominante	Incierta/ Parece benigno	-	Ubiquitina-proteasoma
	GIGYF2	PARK11	Autosómica dominante	Incierta/ Parece benigno	-	Incierta
	EIF4G1	-	Autosómica dominante	Benigno	-	Traducción del mRNA
	LRP10	LRP9	Autosómica dominante	Incierta	-	Incierta

Es interesante que muchos de los genes relacionados con el riesgo de desarrollar Parkinson convergen en la vía endosomal-lisosomal. En particular, los genes asociados con el tráfico de vesículas mediado por clatrina y la endocitosis de vesículas sinápticas; tráfico de los endolisosomas y la función lisosomal.²⁶ Mutaciones en el gen SNCA y en los genes que se describen a continuación en la Figura 6, se asocian con el origen del Parkinson familiar de aparición temprana; ocurre mediante la expresión de la conformación aberrante de la α -sinucleína y la alteración de la capacidad de la maquinaria celular para degradar las proteínas con un plegamiento erróneo.²⁵

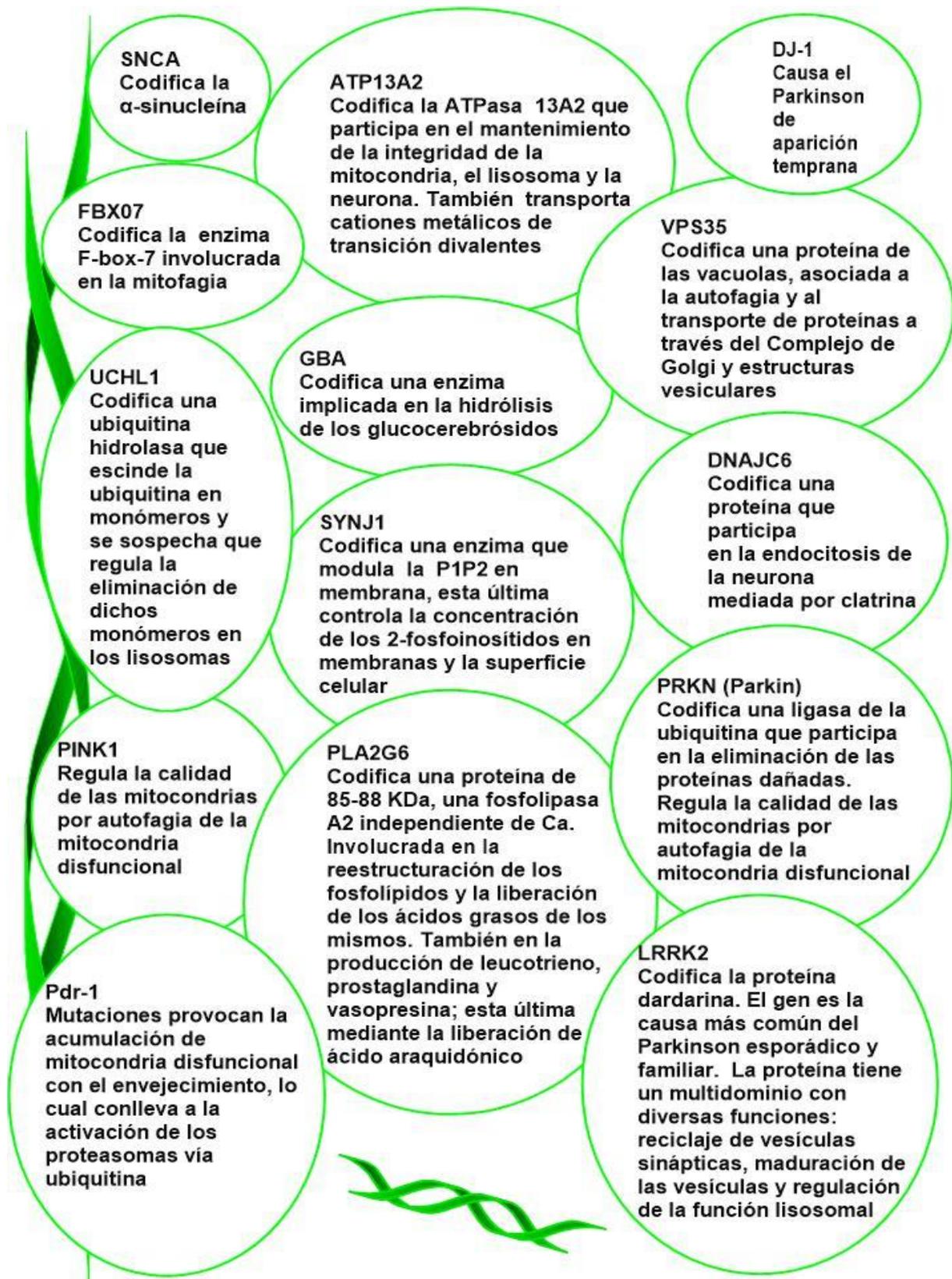


Figura 6. Genes cuyas mutaciones se asocian con el Parkinson familiar de aparición temprana.^{25,26}

La comprensión de los diferentes factores genéticos involucrados en el Parkinson tendrá un mejor impacto en la búsqueda de una cura eficiente.

- Alteraciones del ADN mitocondrial (mtADN), estrés oxidativo

Las perturbaciones del mtADN pueden producir una desregulación de la respiración mitocondrial y el aumento de la producción de ROS. Adicionalmente los productos mitocondriales e intermediarios como el 2-oxoglutarato, succinato, fumarato y el citrato, son compuestos epigenéticamente activos, cuyos niveles modulan la modificación epigenética del ADN nuclear y de las histonas.¹⁴

Las neuronas dopaminérgicas son especialmente sensibles a la disrupción mitocondrial vía ROS ya que el metabolismo de la dopamina produce radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, y quinona-DA (resultado de la autooxidación de la dopamina), todos los cuales dañan la célula.²⁴

Entre los diferentes factores/procesos asociados a las anomalías del mtADN pueden citarse:

- a) ROS: Son claves en la neuroinflamación de la patogénesis, alteran la expresión de las citoquinas. Los oligómeros de α -sinucleína inducen la producción de ROS y la peroxidación lipídica alterando la función mitocondrial.
- b) Mutaciones: A diferencia del ADN nuclear, el mtADN y sus mutaciones o modificaciones epigenéticas se atribuyen exclusivamente a la herencia materna. La mayoría de las proteínas mitocondriales, incluida una alta proporción de enzimas de la fosforilación oxidativa, son controladas por el ADN nuclear. Esto implica que las mutaciones no pueden ser analizadas como un fenómeno aislado, ya que su impacto biológico y clínico dependen de otras modificaciones del ADN o factores patológicos.
- c) Deleciones: La acumulación provoca aumento de ROS y especies de quinona tóxicas. La deleción más frecuente del mtADN en los pacientes de Parkinson se denomina “deleción común” (deleción de 4977 pb), concierne a genes que codifican subunidades del complejo respiratorio I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa). Las alteraciones de la DNA polimerasa responsable de la replicación mitocondrial se asocian a deleciones.
- d) Transversión: En el estado inicial de la enfermedad, las transversiones G→T o C→A inducidas por 8-OHdG (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina), juegan un papel fundamental.
- e) Metilación: Cambios en la metilación pueden regular la replicación del mtADN.
- f) Disfunción de genes nucleares: Por ejemplo, el factor A de transcripción mitocondrial (TFAM) codificado por un gen nuclear, es importante en el empaquetamiento del mtADN. Su pérdida funcional dificulta la transcripción y la replicación. Una deleción de la citosina en el locus 498 (haplogrupo K1c del mtADN) está relacionado con un alto riesgo de desarrollar la EP, mientras que una deleción de timina en la posición 497

(haplogrupo K1a) protege. Ambas posiciones están localizadas entre dos sitios vecinos de unión del TFAM al mtADN.

- g) Haplogrupos: La manifestación fenotípica de algunos haplotipos aumenta los niveles de ROS. Se han identificado haplogrupos capaces de aumentar el riesgo de padecer Parkinson (haplogrupo K1c, HV y A5), mientras otros lo disminuyen (haplogrupo K1a, JT y B5).
- h) Estrés oxidativo: Genera mutaciones y cambios de metilación en el mtADN. Así, es difícil determinar si estas alteraciones inducen la neurodegeneración o son una consecuencia de la misma.

El estrés oxidativo también modifica la estructura de la α -sinucleína, se forman dímeros de tirosina; lo cual constituye una variación estructural fuertemente asociada a la patogénesis. Anomalías en el complejo I de la fosforilación oxidativa en la mitocondria inducen estrés oxidativo, aumento de la producción de ROS y superóxidos, estos últimos pueden afectar la cadena de transporte electrónico acelerando la generación de sí mismos y el fallo en la producción de energía celular en forma de ATP, todo lo cual conlleva a la EP.²⁴

Agentes terapéuticos antioxidantes capaces de contrarrestar el estrés oxidativo y las alteraciones del mtADN, pueden utilizarse no solo para la prevención del Alzheimer sino también en el caso del Parkinson.¹⁴

- Metales

Los metales pesados y las trazas metálicas intervienen en procesos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso. Una exposición excesiva a metales tóxicos como el mercurio (Hg), plomo (Pb), cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe), manganeso (Mn), aluminio (Al), cadmio (Cd) y selenio (Se) que cruzan la barrera hematoencefálica y entran en el cerebro, origina la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Elevadas concentraciones de metales pesados en el órgano cerebral promueven estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. La exposición prolongada se asocia con el aumento de las citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α), genera neuroinflamación y muerte neuronal.

Constituyen fuentes de metales los desechos industriales, residuos, vertidos agrícolas, madera tratada, pinturas, infraestructuras de suministro de agua, baterías de plomo, emisiones de vehículos, fertilizantes y microplásticos. Las fuentes fundamentales asociadas al Parkinson son: la contaminación ambiental, la exposición ocupacional, el alimento marino contaminado, medicinas y la amalgama dental. Los metales interfieren en el balance redox, lo cual conlleva a la formación de radicales libres y la reducción de las concentraciones de enzimas antioxidantes. El aumento masivo del estrés oxidativo genera la formación de agregados de proteínas al alterarse la función del sistema proteasoma-ubiquitina, se

acumulan los agregados proteicos y ocurre la muerte celular. Los metales pesados también inhiben la síntesis de ATP en la mitocondria. Exposiciones a hierro, manganeso y aluminio incrementan al doble el riesgo de padecer EP.

Los metales pueden interactuar en conjunto por vías comunes para generar la neurodegeneración a través del estrés oxidativo, la disfunción de la mitocondria, la fragmentación del ADN, el plegamiento erróneo de las proteínas, el estrés del retículo endoplasmático, la activación de la microglía y de la apoptosis.

Reducir la deposición excesiva de estos metales en el cerebro es una opción prometedora, así las sustancias capaces de absorberlos o de formar complejos metálicos, pueden resultar útiles en una estrategia frente al Parkinson.³³

- Priones

La α -sinucleína (al igual que los péptidos β -amiloides ($A\beta$) y tau) tiene un comportamiento similar a la proteína prion, pues ambas regulan su función y actividad mediante cambios en el plegamiento, dado lo cual se clasifican como: amiloides funcionales. Se ha detectado un hilo evolutivo con especies proteicas encontradas en bacterias, hongos, gastrópodos (moluscos) y mamíferos. Por lo que es muy probable que todas estas proteínas compartan un código biológico común reminiscente de proteínas ancestrales. Obviamente este código no es el mismo que el código genético, pues posee capacidad infectiva, profundizar en el estudio del mismo, permitirá comprender las alteraciones que estas proteínas provocan en los seres humanos. Además, datos estructurales recientes muestran similitudes en la disposición estructural de los priones que originan las Encefalopatías espongiiformes transmisibles, los péptidos β -amiloides ($A\beta$) y la α -sinucleína.

En todos los casos, desde las bacterias hasta los mamíferos, se han descrito priones que comparten la capacidad de exhibir una estructura tridimensional alternativa rica en hojas- β , que se autorreplican induciendo su estructura aberrante en el plegamiento de otras proteínas nativas y migran de una célula a otra. Estas características de autorreplicación condujeron a Maury (2009) a proponer la existencia del “mundo amiloide”.¹⁷

La información estructural sobre la proteína prion humana (PrP) comienza a desvelar el proceso que permite a las proteínas priónicas interactuar para alterar su conformación. La Figura 7 expone las estructuras del dominio globular monomérico y dimérico de la PrP, así como el cambio conformacional asociado a la formación del dímero entrelazado.³⁴ La proteína celular (PrP^C) en su conformación nativa, monomérica y α -helicoidal, transforma su conformación hacia la forma aberrante (PrP^{Sc}); esta última de naturaleza oligomérica, la cual llega a alcanzar una estructura rica en hojas- β .³⁵

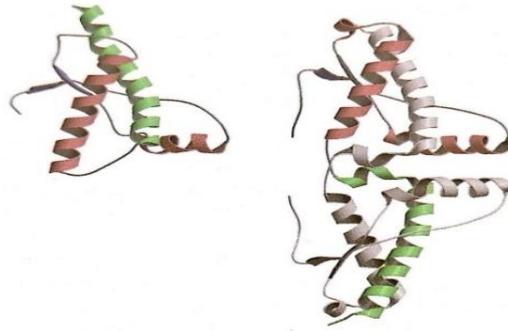


Figura 7. Estructura del dominio globular de la PrP humana en la forma monomérica (izquierda) y dimérica (derecha). La segunda subunidad aparece en color gris para realizar el cambio conformacional en la hélice α verde (ahora girada hacia abajo), al formarse el dímero entrelazado.³⁴

- Activación de la microglía, estrés oxidativo y neuroinflamación asociada

Diversos estudios avalan que el estrés oxidativo y la neuroinflamación asociada, a través de la activación de la microglía, tienen un efecto degenerativo en las neuronas dopaminérgicas. En la EP la activación ocurre mediante los agregados de α -sinucleína, toxinas ambientales, envejecimiento y mutaciones; este proceso produce la intensificación enzimática de la NADPH oxidasa.

Para el caso del Parkinson, al activarse la microglía, ocurre la proliferación de sus células y la acumulación de las mismas en el tejido dañado. Cuando el cerebro se expone a un peligro potencial (infección, trauma, etc.), las células de la microglía experimentan cambios fenotípicos y funcionales que resultan en la liberación de cantidades masivas de ROS, generan inflamación y neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas. Los radicales libres inducen la producción de la interleucina 1 α (IL-1 α), del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y del componente de la cascada del complemento 1q (C1q), los cuales colectivamente estimulan los astrocitos, específicamente el fenotipo reactivo A1 capaz de inducir la muerte de las neuronas. De hecho es muy abundante en las muestras de cerebro de pacientes con Parkinson y Alzheimer.¹⁸ Ciertas sustancias como la cardiolipina, el citocromo c y el TFAM, son liberados de la mitocondria durante la muerte neuronal y también activan la microglía y a los astrocitos, estimulando así la neuroinflamación y la progresión de la enfermedad neurodegenerativa. Altos niveles de ROS, generados fundamentalmente en la mitocondria, son claves en la neuroinflamación de la patogénesis del Parkinson.¹⁴

Diferentes patologías del cerebro, incluida la EP, se caracterizan por una respuesta crónica e inapropiada de la microglía. La activación prolongada de estas células en el cerebro de pacientes con Parkinson estimula la expresión de un gran grupo de citoquinas pro-inflamatorias como: TNF- α , IL-1 e IL-6. Las citoquinas junto al estrés oxidativo aceleran la

muerte de las neuronas. También se libera ácido araquidónico, el cual es oxidado a un grupo de eicosanoides pro-inflamatorios como las prostaglandinas y los leucotrienos. Aumenta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la infiltración de neutrófilos, también de otros glóbulos blancos hacia el tejido nervioso. Los neutrófilos liberan citoquinas que potencian la neuroinflamación, lo cual a su vez activa un mayor número de células de la microglía acentuando todo el proceso.

Estudios recientes demuestran que las citoquinas y los mediadores pro-inflamatorios liberados por la activación de la microglía, son los contribuyentes más potentes del proceso neuroinflamatorio en enfermedades neurodegenerativas.

Teniendo en cuenta el papel irrefutable del estrés oxidativo y el proceso neuroinflamatorio asociado, se han probado diversos antioxidantes como protección, pero los resultados no son concluyentes. En consecuencia, es racional investigar dianas endógenas que mejoren la respuesta frente a ROS y protejan de la neuroinflamación.¹⁸

- Factores ambientales

El Parkinson al igual que el Alzheimer, es una enfermedad multifactorial, donde confluyen como causas en origen factores endógenos, ambientales y/o la interacción de ambos en el desarrollo y progresión de la neurodegeneración. La Tabla 6 expone varios factores de alto y bajo riesgo para la EP.

Tabla 6. Factores asociados a un alto/bajo riesgo de desarrollar Parkinson.²¹

PARKINSON	FACTORES
ALTO RIESGO, EVIDENCIA SÓLIDA	Pesticidas.
ALTO RIESGO, EVIDENCIA DÉBIL	Consumo de leche (hombre), elevada ingesta de hierro, anemia crónica.
BAJO RIESGO, EVIDENCIA SÓLIDA	Hiperuricemia (ácido úrico alto), tabaco, café.
BAJO RIESGO, EVIDENCIA DÉBIL	Consumo de Vitamina E, alcohol, té, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID); ejercicio físico vigoroso.

Se han descrito otros factores de riesgo medioambientales como un traumatismo craneal previo, experimentar una vida rural o la utilización de β -bloqueantes.¹⁴ Estudios epidemiológicos tras varios años han demostrado que no solo la exposición a los pesticidas, también las toxinas como MPTP (neurotoxina 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina, un opioide), la rotenona (insecticida), el paraquat (herbicida) y la 6-OHDA (oxidopamina), propician el padecimiento del Parkinson.¹⁸

2.6 Tratamiento actual del Parkinson, problemas y limitaciones

No existe una cura efectiva para el Parkinson, el tratamiento es sintomático, enfocado a mejorar la calidad de vida del paciente. En el estado inicial de la enfermedad la estrategia terapéutica descansa en la administración de medicación oral, terapia física y nutricional. En

el estado avanzado se emplean métodos más invasivos, lo cual incluye estimulación cerebral profunda (DBS), levodopa duodenal continua/infusión de carbidopa (CDLCI), e infusión de apomorfina subcutánea continua (CSAI).²⁸

El único tratamiento recomendado para la demencia del Parkinson es la rivastigmina; el donepezilo y la galantamina probablemente puedan ser útiles. La memantina es investigada en este caso. Existe poca evidencia sobre los efectos de fármacos ya conocidos (atomoxetina, levodopa, insulina, ambroxol y ceftriaxona), así como en el caso de medicamentos nuevos (SYN120, GRF6021, NYX-458, ANAVEX2-73, LY3154207, ENT-01 y DAAOI-P). La exploración de procedimientos no farmacológicos y quirúrgicos crece. Se requiere mucha más investigación para obtener fármacos capaces de detener, revertir la neurodegeneración e incluso, paliar eficientemente los síntomas. En la Tabla 7 se exponen los fármacos utilizados en la actualidad para tratar la EP.³⁶

Tabla 7. Tratamientos farmacológicos disponibles para el Parkinson.³⁶

Categoría	Fármaco	Deterioro cognitivo medio en el Parkinson	Demencia en el Parkinson	Efectos adversos más comunes	Severos pero raros efectos adversos
Inhibidores anticolinesterasa	Rivastigmina	En investigación	Clínicamente útil	Cápsulas: náuseas, vómitos, pérdida de peso. Parches: náuseas, vómitos, caídas.	Cápsulas: fibrilación auricular, infarto de miocardio, hipopotasemia, ataque isquémico transitorio, convulsiones. Parches: deshidratación.
	Donepezilo	No estudiado	Probablemente útil	Nauseas, diarreas, vómitos.	Hemorragia gastrointestinal, bloqueo cardiaco, torsades de pointes.
	Galantamina	No estudiado	Probablemente útil	Nauseas, diarreas, vómitos.	Sincope, síndrome de Stevens-Johnson, hemorragia gastrointestinal, convulsiones.
Antagonista del receptor NMDA	Memantina	No estudiado	En investigación	Diarrea, constipación, confusión, mareos.	Accidente cerebrovascular (ACV), convulsiones, fallo renal.
Terapia dopaminérgica	Rasagilina (inhibidor de la MAO B).	En investigación	No estudiado	Hipotensión ortostática, dolor de cabeza, náusea.	Síndrome serotoninérgico
Inhibidor de la recaptación de norepinefrina	Atomoxetina	En investigación	No estudiado	Aumento de la frecuencia cardiaca, náusea, disminución del apetito, xerostomía.	Paro cardiorrespiratorio (PCR), accidente cerebrovascular (ACV).

3. Objetivos

El tratamiento farmacológico tanto del Alzheimer como del Parkinson es sintomático y paliativo, no cura ni revierte el detrimento neurológico, simplemente retrasa o estabiliza el deterioro cognitivo y enlentece la pérdida de la calidad de vida del paciente. A esto deben sumarse los efectos secundarios que ocasionan los disímiles medicamentos y sus interacciones. La rivastigmina es un fármaco modelo ideal para proyectar y desarrollar futuras tendencias y líneas de investigación en cuanto a la obtención de terapias útiles para el Parkinson y el Alzheimer, pues su uso está aprobado en las demencias de ambas enfermedades. Entre los objetivos de este trabajo se pueden citar:

- Exponer las limitaciones del tratamiento farmacológico actual para el Alzheimer y el Parkinson.
- Explicar el mecanismo de acción de la rivastigmina a nivel molecular en las dos neuropatologías.
- Desarrollar las ventajas de nuevas formulaciones de rivastigmina capaces de mejorar su biodisponibilidad, selectividad y afinidad por la diana biológica, eficiencia, liberación controlada; así como el diseño de híbridos multidiana que la contienen.
- Describir algunas de las tendencias de investigación más recientes y la búsqueda con ello, de nuevas dianas terapéuticas y tratamientos capaces de curar y/o revertir ambas enfermedades.

4. La rivastigmina: fármaco para tratar el Alzheimer y el Parkinson

4.1 Rivastigmina: tipo de medicamento, familia, mecanismo de acción en Alzheimer y Parkinson

La rivastigmina (Exelon), representada en la Figura 8, es un inhibidor dual de la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BChE), ha sido aprobada por la *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* para el tratamiento del Alzheimer y el Parkinson.³⁷ Durante el año 2006, se convirtió en el primer medicamento aprobado a nivel mundial para tratar la demencia de grado leve a moderada asociada a la EP;³⁸ respecto al Alzheimer la aprobación ocurrió el 21 de abril del año 2000.³⁹ Fue desarrollada por Marta Weinstock-Rosin, en la *School of Pharmacology-Hebrew University of Jerusalem*; realmente es un derivado semisintético del alcaloide tóxico-natural fisostigmina.³⁸ En la Figura 9 se observan las estructuras químicas de la rivastigmina y el alcaloide a partir del cual se obtuvo inicialmente.

LCR durante las primeras 12 horas, están proporcional y directamente correlacionadas con la dosis oral administrada.⁴¹

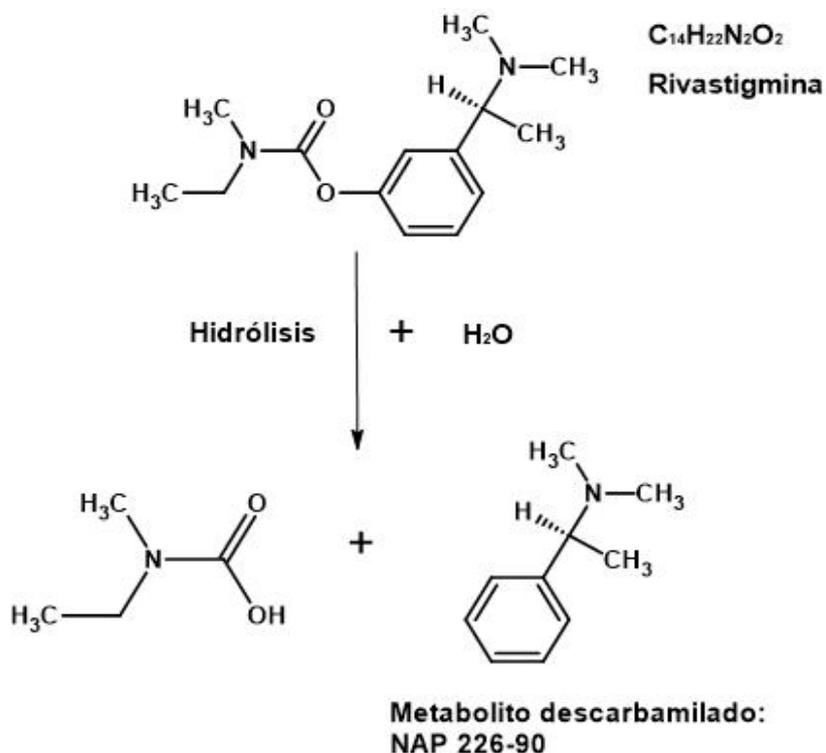


Figura 10. Metabolismo de la rivastigmina. Hidrólisis y formación del metabolito descarbamilado: NAP 226-90.³⁹

La rivastigmina es metabolizada primero por colinesterasas (ChE) a NAP 226-90 (metabolito descarbamilado), el cual después puede experimentar N-desmetilación y/o conjugación sulfato. El metabolismo ocurre predominantemente en el hígado y en menor cuantía en el intestino. Tras el proceso metabólico la rivastigmina es eliminada velozmente por vía renal, la eliminación es superior al 90% unas 24 horas después de la administración del medicamento.⁴¹

El tiempo de vida medio farmacocinético de la rivastigmina en pacientes con EA es de 1,5 horas, mientras que el tiempo de vida medio farmacodinámico es aproximadamente de 10 horas. La diferencia entre ambos valores se debe a que el fármaco se une al sitio de enlace éster (*esteratic site*) de la acetilcolinesterasa, pero se disocia más lentamente del mismo que la acetilcolina. Esta acción pseudo-irreversible de la rivastigmina explica que la inhibición de la colinesterasa sea más prolongada (unas 10 horas), respecto al breve tiempo de vida media en plasma.³⁹ La exposición sistémica a la rivastigmina no está influenciada por la edad, no afecta la absorción del medicamento; aunque la eliminación suele ser más lenta en los ancianos. El tiempo de vida media en ancianos es de 0,88 a 1,25 horas vs 0,80 a 0,99 horas en individuos jóvenes.

La concentración del medicamento en sangre es inversamente proporcional al área de superficie corporal y al consumo de nicotina. Las concentraciones de NAP 226-90 también son inversamente proporcionales al área de superficie corporal. Efectos adversos, entre ellos la anorexia, vómitos, diarreas y náuseas, están más relacionados con el NAP 226-90 que con el fármaco parental. La coexistencia de otras patologías: hipertensión, dispepsia, diabetes mellitus, artritis o neoplasia no tienen un impacto significativo en las concentraciones plasmáticas de la rivastigmina o del NAP 226-90.

El volumen de distribución de la rivastigmina es de 1,8 a 2,7 L/kg, este dato sugiere una distribución extravascular. Debido a que la rivastigmina se une escasamente a las proteínas plasmáticas (40%) y su metabolismo es llevado a cabo fundamentalmente por esterasas del hígado, más que por la enzima citocromo P450 microsomal-hepática, las interacciones clínicas relevantes con otros medicamentos son poco probables,⁴¹ de hecho no se han reportado interacciones significativas. Sin embargo, los fármacos que pueden tener un efecto farmacodinámico aditivo no deben ser administrados de forma concomitante con la rivastigmina (ejemplo: otros inhibidores de colinesterasa y parasimpaticomiméticos), pues incrementan su toxicidad potencial. Al contrario, los anticolinérgicos disminuyen la eficacia de la misma.³⁹

Los efectos adversos en general, son de leves a moderados, de corta duración, responden además a la disminución de la dosis aplicada o se resuelven espontáneamente. La mayoría de los efectos secundarios son el resultado de la acción colinérgica y el más común afecta al tracto gastrointestinal. Puede observarse náuseas, pérdidas de peso, hemorragia gastrointestinal, vómitos, diarreas, angina de pecho y síncope. Se recomienda la ingestión del medicamento con las comidas, lo cual aumenta la tolerancia al mismo.⁴¹ A continuación, la Tabla 8 resume las características generales de la rivastigmina.

Tabla 8. Características generales y farmacológicas de la rivastigmina.⁴⁰

Nombre químico	(S)-3-[1-(dimetilamino)etil]feniletilmetilcarbamato
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₂
Peso molecular	250,34
Clase química	Carbamato
Clase farmacológica	Inhibidor de colinesterasa.
Inhibición de colinesterasa	Ligeramente reversible.
Formulaciones desarrolladas	Cápsulas, solución oral y parches transdérmicos.
Indicaciones terapéuticas	Tratamiento sintomático de la demencia en la EA y EP.
Selectividad a la colinesterasa	Inhibidor dual de la AChE y la BChE.
Absorción	Rápida y completa por vía oral. Retraso de 0,5-1 h con los parches transdérmicos.
Tiempo de inhibición de la AChE	De 8-10 h por vía oral; 9 h con los parches.
Vida media en plasma	~ 1 h por vía oral; ~ 3,4 h con los parches.
Picos de concentración en LCR	1,4–2,6 h

Volumen de distribución aparente	1,8–2,7 L/kg
Unión a proteínas plasmáticas	~ 40%
Biodisponibilidad	~ 36% para 3 mg de dosis
Metabolismo	Hidrólisis mediada por colinesterasa y formación del metabolito descarbamilado (pérdida del grupo carbamato).
Eliminación	Excretada predominantemente por vía renal.
Dosis	1,5; 3; 4,5; ó 6 mg (cápsulas). En solución oral 2 mg/mL. Para los parches: 4,6; 9,5; o 13,3 mg/24 h.

Comparativamente, respecto a la formulación oral, los parches transdérmicos facilitan una liberación suave y continuada del fármaco durante 24 horas, esto resulta en una disminución de los posibles efectos adversos. La formulación de los parches transdérmicos ha sido aprobada por la *US (FDA)* para el tratamiento de la EA de grado leve, moderado y grave, también para la demencia del Parkinson de grado leve a moderado. En la Unión Europea está aprobada para el tratamiento del Alzheimer de grado leve hasta moderadamente severo. Los resultados *in vivo* del estudio de las imágenes de tomografías por emisión de positrones (*Positron emission tomography, PET*) mostraron un mayor déficit de acetilcolinesterasa cortical en pacientes con EP que en aquellos con EA. La rivastigmina tiene efectos terapéuticos sintomáticos aumentando los niveles de acetilcolina para la transmisión sináptica en el cerebro, exhibe una eficacia dependiente de la dosis. Otras investigaciones han sugerido que los parches de 13.3 mg/24 h (15 cm²) confieren los mayores beneficios en la cognición.

El tratamiento sintomático del Parkinson con rivastigmina logra efectos beneficiosos muy significativos de los síntomas cognitivos, en el desarrollo de las actividades diarias y los síntomas neuropsiquiátricos, especialmente alucinaciones y delirios.⁴⁰ Mantiene la función cognitiva, la función global (actividades diarias) y el comportamiento, en pacientes con Alzheimer de grado leve a moderado hasta 52 semanas.³⁹

4.1.1 Rivastigmina: familia de los carbamatos

La rivastigmina pertenece a la familia de los carbamatos, son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico (NH₂COOH). La Figura 11 muestra la estructura de los carbamatos biológicamente activos, donde X puede ser un oxígeno o azufre (tiocarbamato); R₁ y R₂ comúnmente son sustituyentes orgánicos o alquílicos, aunque pueden estar constituidos por un hidrógeno; R₃ es mayoritariamente un grupo orgánico y en ocasiones un metal. Además de las aplicaciones de los carbamatos en el campo de los fármacos terapéuticos (Alzheimer, Parkinson, miastenia grave,⁴² atonía del tracto gastrointestinal,⁴³ glaucoma), estos inhibidores de AChE se han empleado como pesticidas, también en la profilaxis del envenenamiento con compuestos organofosforados (OPs).⁴² La toxicidad de

algunos de ellos ha desviado su uso desde la disciplina clínica hacia la agricultura; incluso a utilizarlos como gases de guerra.⁴³ Juegan un papel fundamental en la industria química y cinematográfica: materiales de partida, intermediarios y solventes.⁴⁴

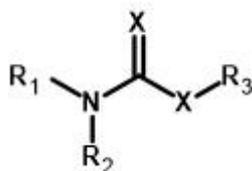


Figura 11. Estructura química general de los carbamatos activos biológicamente.⁴²

En la agricultura los carbamatos se emplean como fungicidas, insecticidas y herbicidas, pertenecen al segundo grupo de pesticidas inhibidores de colinesterasas. Se consideran más seguros que los insecticidas organofosforados, ya que estos últimos inhiben la AChE de modo irreversible, originando envenenamientos colinérgicos más severos.⁴²

Los carbamatos orgánicos o uretanos son elementos estructurales de diversos agentes terapéuticos ya aprobados. Estructuralmente la funcionalidad del carbamato está vinculada a las características híbridas de un amida-éster. En general, manifiestan gran estabilidad química y proteolítica, también una importante capacidad de permear las membranas celulares. Un rasgo único de los carbamatos es su habilidad para modular interacciones inter- e intramoleculares de su enzima o receptor diana. La función del carbamato impone un grado de restricción conformacional debido a la deslocalización de los electrones del nitrógeno hacia el grupo carboxilo; establecen, además, enlaces de hidrógeno a través del grupo carboxilo y el NH. De este modo, las sustituciones del oxígeno y/o del N-terminal en un carbamato, ofrecen la oportunidad de modular propiedades biológicas, así como de mejorar la estabilidad y propiedades farmacológicas del medicamento.

En síntesis orgánica y química de los péptidos, los carbamatos orgánicos constituyen grupos protectores óptimos para las aminas y los aminoácidos. Se han desarrollado diversas cadenas peptídicas de diseño, en las que se sustituye el grupo amida nativo del enlace peptídico por otras uniones no naturales, empleando al grupo carbamato como sustituto. Esta transformación de diseño ha mejorado el carácter de los fármacos incrementando su estabilidad frente a las aminopeptidasas, la potencia, sus especificidades de acción y farmacodinámica (aumento de la bioactividad en el tiempo).

La resonancia de la amida es una propiedad destacable en los carbamatos orgánicos, ha sido estudiada en detalle empleando métodos experimentales y de estimación de las barreras rotacionales del enlace C–N. El valor oscila entre 3–4 kcal mol⁻¹ más bajo que en las amidas, debido a las perturbaciones electrónicas y estéricas introducidas por el átomo de

oxígeno. Las tres estructuras de resonancia posibles (A, B y C, Figura 12) contribuyen a la estabilización del grupo carbamato.⁴⁴

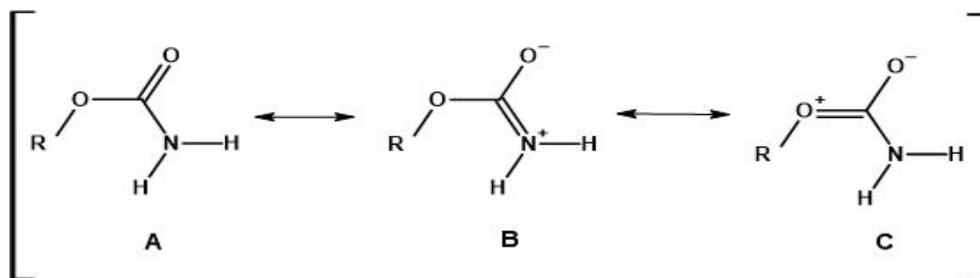


Figura 12. Estructuras de resonancia para el grupo carbamato.⁴⁴

El grupo carbamato se caracteriza por un pseudo doble enlace, lo cual implica una desconjugación potencial del sistema [heteroátomo-(enlace σ)-carbono-(enlace π)-heteroátomo], que restringe la rotación alrededor del simple enlace σ (C-N). Por lo tanto, dos isómeros *sin* y *anti* pueden coexistir en la estructura (Figura 13).

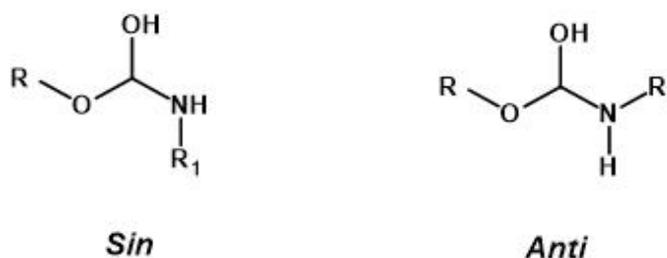


Figura 13. Conformaciones *sin* y *anti* de los carbamatos.⁴⁴

Aunque los carbamatos comparten similitudes con las amidas, el rotámero *anti* está favorecido respecto al isómero *sin* en $1.0\text{--}1.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ por razones estéricas y electrostáticas.

La investigación de los carbamatos en el diseño de drogas y la química medicinal es relevante.⁴⁴ Dada la acción inhibitoria reversible de las colinesterasas, los carbamatos experimentan importantes aplicaciones farmacológicas en la medicina humana,⁴² se estudian incluso como potenciales inhibidores de la proteasa del VIH, enzima esencial en la infección del virus.⁴⁴ La fisostigmina (cuya estructura se observa en la Figura 9 y de la cual la rivastigmina es un derivado semisintético), es un metabolito natural de la planta *Physostigma venenosum* ampliamente utilizado en el tratamiento de la miastenia grave,⁴² en urgencias se aplica como antídoto de fármacos con acción anticolinérgica (antidepresivos, tricíclicos, neurolépticos, antihistamínicos o antiparkinsonianos). Es útil en el glaucoma ya que la estimulación del cuerpo ciliar desde su acción colinérgica indirecta facilita el drenaje del ojo, disminuyendo la presión intraocular. No obstante, posee efectos secundarios nada despreciables; así se diseñó la neostigmina, un análogo de la fisostigmina diseñado para que

no pase la barrera hematoencefálica al ser un compuesto de amonio cuaternario permanentemente cargado. A su vez, la hidrólisis del grupo carbamato se dificulta debido a la mayor tendencia de los dos electrones no compartidos del nitrógeno, a experimentar conjugación cuando se introduce un segundo resto metilo sobre dicho átomo (Figura 14).⁴³

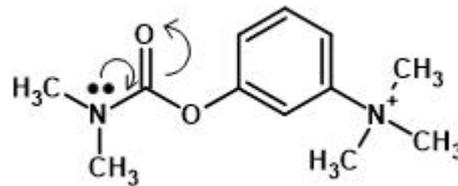


Figura 14. Estructura química de la neostigmina (análogo de diseño de la fisostigmina).⁴³

Entre los carbamatos de gran potencial terapéutico pueden citarse: rivastigmina, muraglitzar, roxifiban, entinostat, albendazol, mebendazol, flupirtina, retigabina, felbamate, efavirenz, zafirlukast y la mitomicina C.⁴⁴

4.1.2 Rivastigmina: mecanismo de acción en Alzheimer y Parkinson

Las colinesterasas (ChE) integran una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, con la consecuente formación de colina y ácido acético. La ACh se libera en las terminaciones del sistema nervioso parasimpático y motor, su acción culmina principalmente al ser hidrolizada por las colinesterasas.⁴³ Es una reacción necesaria para que la neurona colinérgica regrese al estado de reposo tras su excitación. Por ejemplo, cada molécula de AChE activa degrada alrededor de 25.000 moléculas de acetilcolina por segundo. La inactivación de las colinesterasas inducida por inhibidores permite la acumulación de la acetilcolina en las hendiduras sinápticas, hiperestimula los receptores muscarínicos⁴² (decrece su número en cerebros con Alzheimer)⁴¹ y nicotínicos, refuerza además la neurotransmisión colinérgica.⁴²

La inhibición dual de la AChE y la BChE por la rivastigmina puede considerarse una ventaja terapéutica potencial en las demencias subcorticales (Parkinson y demencia vascular). Ambas enzimas son dos colinesterasas diferentes localizadas en el cerebro, responsables de la hidrólisis de la ACh. La acetilcolinesterasa es la principal colinesterasa ubicada en las uniones sinápticas y áreas de intensa actividad de la corteza cerebral en el adulto humano. La butirilcolinesterasa o pseudo-colinesterasa se encuentra en las células gliales del órgano cerebral.⁴⁰ La rivastigmina no tiene afinidad por los receptores muscarínicos, α -/ β -adrenérgicos, dopaminérgicos u opiáceos, por lo que no compite con sus ligandos.⁴¹

La butirilcolinesterasa (BChE) es una enzima colinesterasa no específica que hidroliza ésteres derivados de colina. Es relevante en la regulación de la función colinérgica y su

inhibición es una vía terapéutica viable en la EA. Comparte alrededor del 60% de su secuencia aminoacídica con la AChE.⁴⁵ Durante la progresión del Alzheimer, la BChE intensifica su actividad en el hipocampo y la corteza temporal, en contraste con la actividad de la AChE que disminuye en esas zonas específicas del cerebro. Por otra parte, la actividad de la butirilcolinesterasa aumenta con la edad del paciente que padece EA, en cambio no se ha observado una correlación entre la función de la acetilcolinesterasa y el envejecimiento. Diversos estudios han demostrado la importancia de la inhibición dual de ambas enzimas colinesterasas en la patofisiología y el tratamiento farmacológico del Alzheimer, ya que ofrece beneficios adicionales, especialmente a largo plazo.⁴⁰ De modo que, en las fases tempranas de la EA, la inhibición de la AChE es más importante; luego con el progreso de la neuropatía, la inhibición de la BChE contribuye a reducir en mayor magnitud el déficit colinérgico.³⁹ En pacientes con Alzheimer avanzado los niveles de la AChE declinan entre un 55%-67% mientras que los de la BChE aumentan un 120% respecto a los niveles normales.⁴⁵ Las placas seniles en estado avanzado de formación exhiben hasta un 87% de actividad BChE y hasta un 80% de actividad AChE.³⁹

Se han identificado diferentes isoformas de la acetilcolinesterasa, con secuencias de aminoácidos idénticas pero disímiles modificaciones postraduccionales, localizaciones anatómicas-microanatómicas y funciones. La forma predominante de la AChE en el hipocampo y la región cortical de un cerebro sano es la conformación tetramérica globular unida a la membrana (G4); coexistente con una cantidad residual de la forma monomérica (G1).⁴¹ Cada subunidad monomérica tiene su sitio activo.⁴³ En pacientes con demencia se pierde selectivamente la forma G4 y la forma G1 se vuelve predominante. La rivastigmina inhibe preferencialmente la forma G1 respecto a la forma G4,³⁹ exactamente cuatro veces más en los individuos afectados con Alzheimer.⁴¹

La AChE tiene una estructura de árbol situada próxima a los receptores de ACh, cuyo tronco está compuesto por una molécula de colágeno anclada en la membrana celular. Del mismo, salen tres ramas que sitúan a la enzima por encima de la superficie de la célula. El sitio activo de la colinesterasa posee dos áreas de interacción: uno de enlace éster y otro de enlace aniónico. La acetilcolina se une al segundo por enlace iónico con el carboxilato de un residuo de ácido glutámico (Glu) o ácido aspártico (Asp), de modo similar a la interacción que establece con el receptor colinérgico; también mediante un enlace de hidrógeno a un residuo de tirosina (Tyr) tal cual se observa en la Figura 15.⁴³

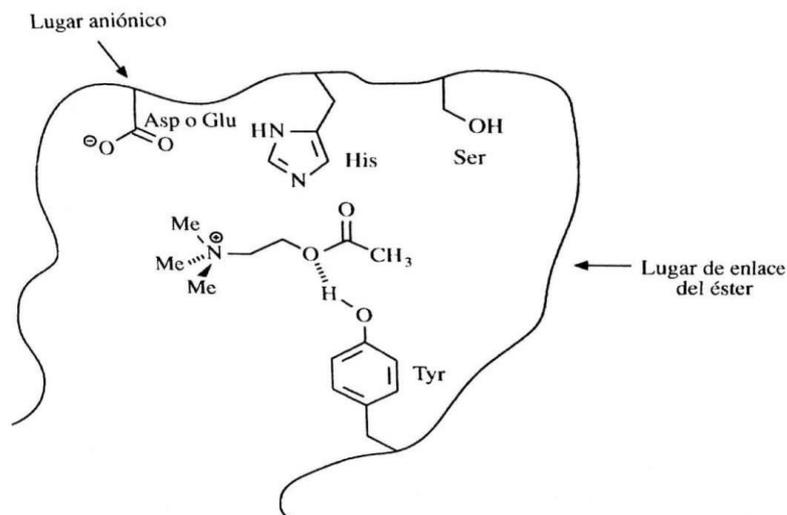


Figura 15. Interacción de la acetilcolina en el centro activo de la AChE.⁴³

En el lugar de enlace éster la acetilcolina es hidrolizada. La rivastigmina es un inhibidor pseudo-irreversible tipo carbamato que bloquea la actividad de la acetilcolinesterasa mediante su unión, dentro del sitio activo, a la región de enlace éster.⁴² Se comporta como un falso sustrato, con una constante de velocidad de hidrólisis k_3 muy pequeña, con lo cual la enzima queda bastante limitada en su capacidad funcional.⁴³ La inhibición de la acetilcolinesterasa por la rivastigmina es relevante en el tratamiento sintomático tanto del Alzheimer como del Parkinson.

Se realizó un interesante estudio de la interacción de la acetilcolinesterasa con la rivastigmina y la acetilcolina (en ausencia del inhibidor), cada sistema se analizó de modo independiente empleando la teoría del funcional de la densidad (*Density Functional Theory* (DFT)). Los resultados energéticos sugieren que la AChE interactúa más fácilmente con la acetilcolina que con el fármaco, aunque acotan que esta teoría está en contradicción con los resultados empíricos obtenidos en pacientes de Alzheimer, en consecuencia se necesitaría más experimentación. No obstante, el estudio permite una mejor comprensión del mecanismo de acción de la rivastigmina sobre su diana biológica. Como inhibidor de colinesterasas a nivel molecular, el mecanismo de acción preciso y exacto de la rivastigmina aún se desconoce.

Tanto la acetilcolina como la rivastigmina se unen a la triada catalítica de la acetilcolinesterasa formada por: serina (Ser200), histidina (His440) y ácido glutámico (Glu327). La rivastigmina se une a la serina (Ser200) tras la inhibición de la enzima, este aminoácido es clave también para la hidrólisis de la acetilcolina.

La Figura 16 muestra el sistema modelo de interacción entre la AChE y la rivastigmina. Se desarrolló la optimización geométrica de las estructuras (fueron consecuentes con los

resultados por difracción de rayos X) como base de estudio de las interacciones, también se optimizó la posibilidad de las diferentes distancias de enlace C-O entre la Ser200 y ambos sustratos a intervalos de 0,2 Å, para lograr así la alternativa de mínima energía.⁴⁶

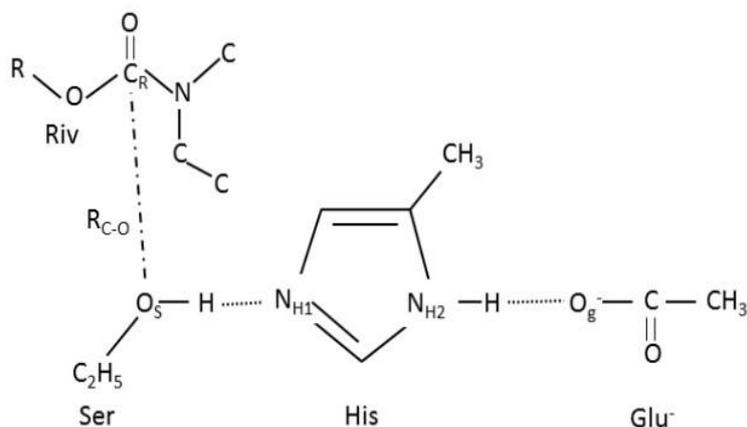


Figura 16. Sistema modelo de la interacción entre la AChE y la rivastigmina.⁴⁶

La estructura de transición en el caso de ambos sistemas (AChE-rivastigmina o AChE-acetilcolina) experimenta una alteración del enlace H-NH₁ (Figura 16). Esta evidencia indica la posibilidad de la transferencia de un protón desde la Ser200 hacia la His440 durante la interacción de la enzima con ambos sustratos. El átomo de hidrógeno tiende a moverse, de manera que el enlace H-NH₁ se acorta 0,75 Å y 0,30 Å, para el sistema AChE-acetilcolina y el sistema AChE-rivastigmina respectivamente.

La formación del enlace C-O involucra la ruptura de la acetilcolina en el grupo acilo que se queda unido a la Ser200, mientras la colina es liberada. En el sistema AChE-rivastigmina, el fármaco se escinde en dos partes, el grupo carbamilo permanece unido a la Ser200 a una distancia de 1,36 Å y el NAP es liberado (Figura 17). Este resultado de distancia de enlace Ser200-rivastigmina (1,36 Å) coincide en gran medida con el obtenido por cristalografía de rayos X (1,39 Å).⁴⁶

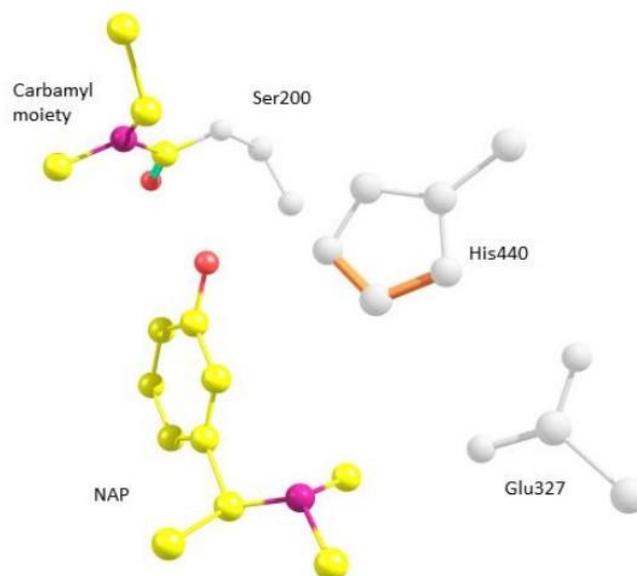


Figura 17. Estructura de la interacción en el sistema AChE-rivastigmina. La rivastigmina es escindida en el grupo carbamilo y NAP. En la representación del modelo estructural los carbonos están coloreados de amarillo, los oxígenos de rojo y los átomos de nitrógeno aparecen de color morado.⁴⁶

El cálculo de las barreras energéticas refleja que la AChE reacciona más fácilmente con la acetilcolina que con la rivastigmina, ya que la barrera energética del sistema AChE-acetilcolina es 0.26 eV menor que dicho valor para el sistema AChE-rivastigmina. Este resultado podría llevar a la conclusión de que la rivastigmina no resulta tan eficaz para prevenir la hidrólisis de la acetilcolina. Sin embargo, el fármaco mejora apreciablemente los síntomas cognitivos en pacientes con Alzheimer, especialmente cuando se administra a dosis elevadas. La gran cantidad de moléculas de rivastigmina probablemente mejore su capacidad de interactuar con la AChE, dada la competitividad de unión con la acetilcolina.⁴⁶

Investigaciones recientes han demostrado que la rivastigmina puede modificar directamente la formación de los péptidos β -amiloides, alterando la vía mediante la cual se procesa la proteína precursora APP por las secretasas. Los péptidos β -amiloides ($A\beta$) se generan dada la acción endoproteolítica y secuencial de la β -secretasa y la γ -secretasa. La proteólisis de APP por la α -secretasa (pertenece a una familia de metaloproteasas ancladas en la membrana), evita la generación de los péptidos tóxicos ($A\beta$); en su lugar se producen fragmentos neuroprotectores (sAPP α). Diversas señales transduccionales que incluyen la proteína quinasa C y MAP quinasa, estimulan la actividad α -secretasa. La rivastigmina desvía el procesamiento de la APP hacia la vía neuroprotectora de las α -secretasas, reduciendo así la generación de los péptidos tóxicos amiloides ($A\beta$). Esta capacidad moduladora del fármaco se suma a su actividad terapéutica como inhibidor dual de la AChE y la BChE en la EA.

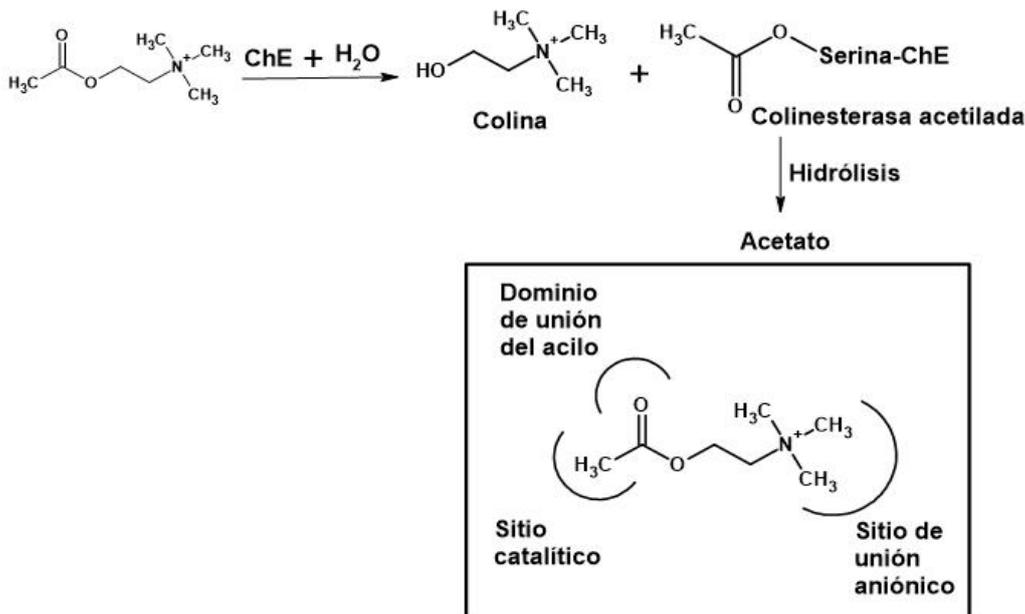
Los resultados anteriores sustentan la idea de que la rivastigmina posee propiedades intrínsecas que modulan mecanismos patológicos, en origen, de la enfermedad de Alzheimer. Esto abre las puertas a investigar derivados de la rivastigmina con bajo potencial en la inhibición de colinesterasas, lo cual permitiría aumentar las dosis del tratamiento sin los indeseables efectos secundarios provocados por la inhibición de la función de dichas enzimas.⁴⁷

Se ha analizado también la interacción de la rivastigmina con la enzima butirilcolinesterasa (BChE) en su sitio activo. Utilizaron el modelado molecular (*molecular modeling docking*) a partir de los datos extraídos por cristalografía de rayos X. Los resultados fueron validados finalmente mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear: STD-NMR (*saturation transfer difference*). Esta última es una herramienta biofísica muy útil para mapear epítomos en estrecho contacto con la proteína, así como determinar el grado de unión entre la enzima y su ligando.

La BChE se caracteriza por una triada catalítica constituida por serina (S198), ácido glutámico (E325) e histidina (H438), los residuos leucina (L286) y valina (V288) definen la hendidura acílica. El triptófano (W82) se une al grupo colina en el sitio activo catalítico a través de una interacción catión- π . El aspartato (D70) forma parte del sitio periférico aniónico (*peripheral anionic site, (PAS)*).

La hidrólisis enzimática de la acetilcolina, sea realizada por la BChE o la AChE, resulta en la formación de colina y acetato, donde la enzima es acetilada como intermediario en el residuo de serina hasta la subsecuente hidrólisis y liberación del acetato (Figura 18). Respecto a la rivastigmina (para ambas colinesterasas dentro del sitio activo), el grupo carbamilo del fármaco se une covalentemente al residuo de serina (Ser200 para la AChE y Ser198 para la BChE) con la liberación de NAP.⁴⁸

a) Escisión de la acetilcolina



b) Escisión de la rivastigmina

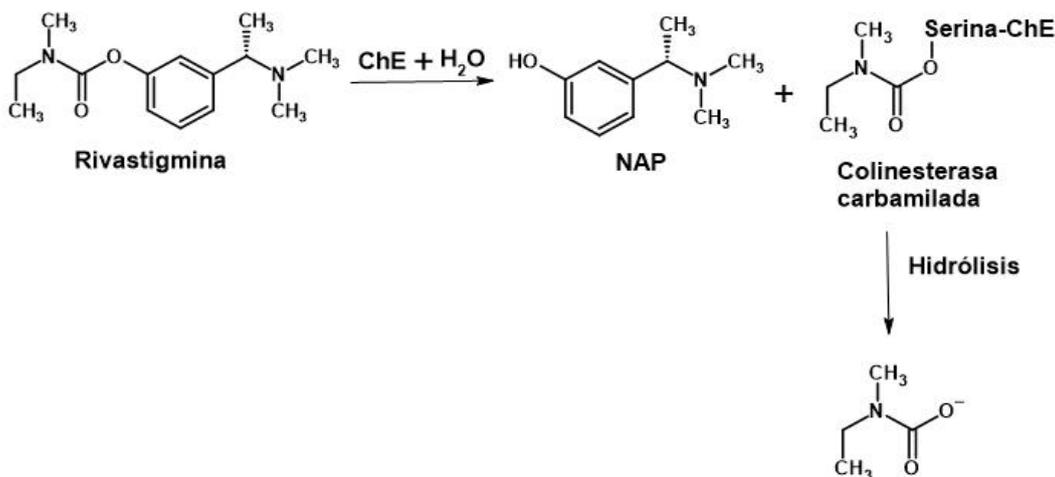


Figura 18. Esquema generalizado de la hidrólisis catalítica de las colinesterasas (ChE): AChE y BChE. (a) acetilcolina. (b) rivastigmina.⁴⁸

El modelo predictivo de la interacción de la rivastigmina con el sitio activo de la BChE se muestra en la Figura 19. Pueden observarse interacciones significativas, las principales son:

a) Dos enlaces de hidrógeno del grupo carbamato formados entre el grupo NH de la unidad imidazol de la histidina (H438) y el grupo C=O (2.87 Å), el otro enlace se forma entre el grupo OH de la serina (S198) y el carbonilo.

b) La treonina (T120) interactúa con una de las dos moléculas de agua, mientras la serina (S79) y el aspartato (D70) lo hacen con una segunda molécula de agua dentro del sitio

activo. Estas asociaciones estrechas parecen facilitar la interacción CH- π entre el triptófano (W82) y el grupo metilo del NAP. Existen evidencias que sustentan además la existencia de enlaces π - π con el triptófano (W82) en el sitio de unión de la colina.⁴⁸

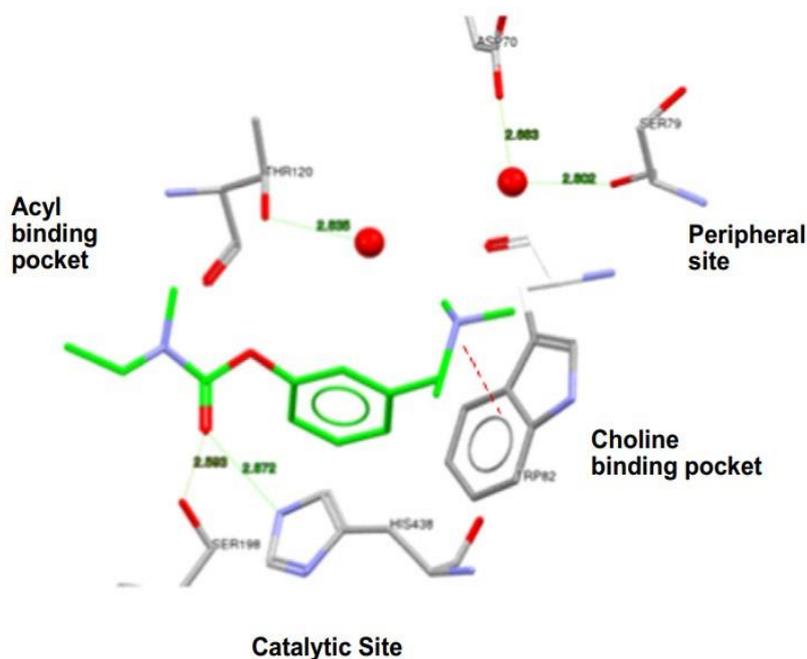


Figura 19. Modelo predictivo de la interacción de la rivastigmina con el sitio activo de la BChE. Los enlaces de hidrógenos formados entre la rivastigmina (color verde) y los residuos en el centro activo (color gris), están representados con líneas verdes de puntos. Las moléculas de agua se muestran como esferas rojas. Las interacciones electrostáticas no covalentes también aparecen como líneas verdes de puntos. La probable interacción CH- π entre el W82 y los grupos metil y etil del NAP se observa como una línea roja discontinua.⁴⁸

Estas conclusiones son importantes para el diseño de potentes análogos de la rivastigmina, respetar así que contengan los farmacóforos esenciales para el reconocimiento y la unión a las enzimas (AChE y BChE), en las posiciones espaciales relativas a los residuos contenidos en sus cavidades catalíticas.⁴⁸

4.2 Mecanismos de síntesis de la rivastigmina. Derivados y mecanismo de acción

4.2.1 Síntesis de la rivastigmina

El método de resolución de racematos con derivados de ácido tartárico se aplica en la producción industrial de (S)-rivastigmina (único enantiómero con actividad biológica deseable).⁴⁹ Charette et al. reportaron un nuevo ligando basado en la estructura del monóxido de bisfosfina, además de cobre para la adición de Me_2Zn a la imina y obtener así el grupo quiral.⁵⁰ Otra estrategia aplicada por el grupo S.L. Buchwald fue la reacción de hidroaminación estereoselectiva catalizada por cobre; esta ruta es corta pero el material de partida (3-

etinilfenol) es caro.⁵¹ El grupo de List utilizó la hidrogenación asimétrica de la N-metilimina como corazón de la reacción, obteniendo el fármaco en cuatro pasos.⁵² Xie y su grupo lograron el producto con una alta enantio-pureza vía seis pasos, partieron de una amina quiral bastante cara.⁵³ También se ha publicado la síntesis asimétrica enzimática.^{54,55,56,57} Un proceso que puede aplicarse a gran escala ha sido documentado por Che et al., utilizan la hidrogenación asimétrica de cetonas y el empleo del altamente tóxico y corrosivo cloruro de metansulfonilo.⁵⁸ Realmente, una síntesis asimétrica práctica y eficiente de la (S)-rivastigmina aún hoy, es una meta deseable.

Se ha demostrado que la difenilmetilamina es una fuente de amina universal para la aminación reductiva asimétrica directa (DARA) de diferentes cetonas, catalizada por iridio y ligandos de fosforamidito basados en la estructura química del económico BINOL. De este modo se logran excelentes resultados de reactividad y estereoselectividad. En el trabajo que se expone a continuación, desarrollaron la síntesis asimétrica de la (S)-rivastigmina mediante la aminación reductiva asimétrica directa en cuatro pasos. El punto de partida es un reactivo asequible y barato (m-hidroxiacetofenona), la cual experimenta esterificación, aminación reductiva asimétrica, N-difenilmetil desprotección y aminación reductiva hasta obtener la (S)-rivastigmina con un 82% de rendimiento global y un 96% de enantioselectividad. Para la catálisis se utilizó un complejo de iridio-fosforamidito (Figura 20).⁵⁹

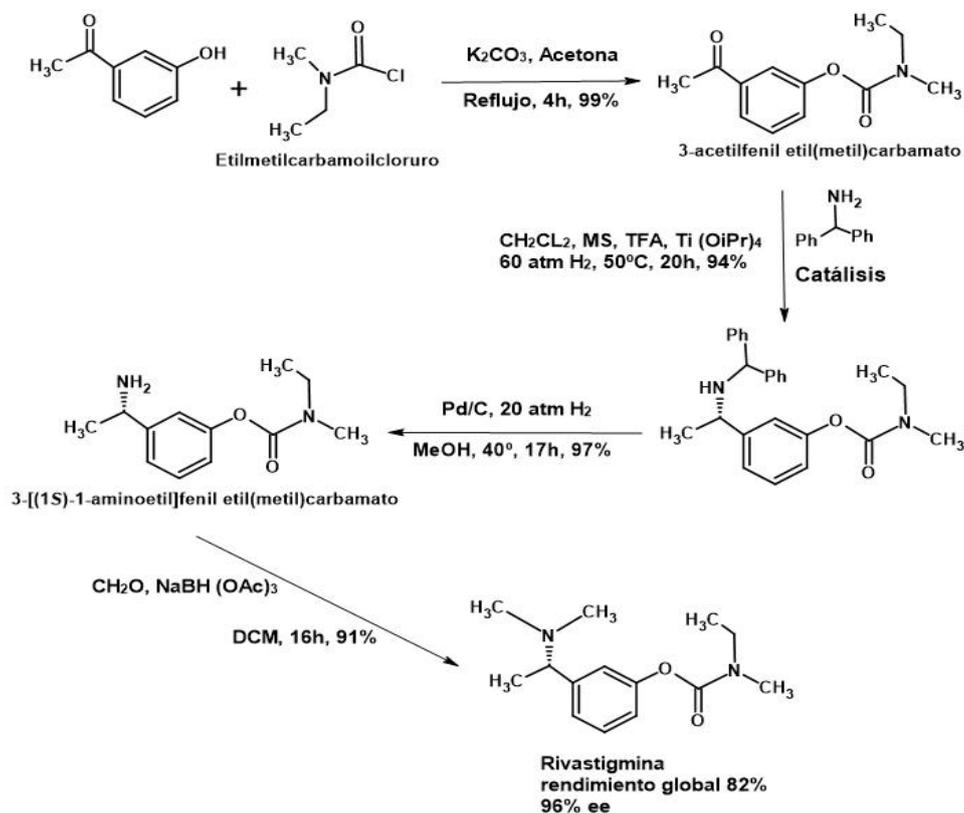


Figura 20. Ruta de síntesis de la (S)-rivastigmina. Estrategia DARA.⁵⁹

La (S)-rivastigmina se obtuvo con un (96% ee), uno de los valores de exceso enantiomérico más altos reportados en la literatura científica según el grupo de investigación que llevó a cabo este proceso. Es una ruta eficiente y corta. DARA destaca por su eficiencia atómica y simplicidad operativa, partiendo además de un material económico.⁵⁹

4.2.2 Derivados de la rivastigmina, mecanismo de acción y análisis de las interacciones con los residuos de las cavidades enzimáticas de la AChE y la BChE

Con el paso del tiempo, diversas razones como la ineficacia de los fármacos, complicaciones en el progreso de la enfermedad, severidad de las terapias etc., han persuadido a los científicos en la dirección de sintetizar y evaluar nuevos compuestos derivados de los medicamentos líderes.⁶⁰

Se han publicado varios estudios sobre la interacción cinética y estructural de la rivastigmina con diferentes colinesterasas, a través de los cuales se han obtenido nociones del mecanismo catalítico. En la siguiente investigación se sintetizaron análogos estructurales rígidos del fármaco, insertando el grupo dimetilaminoetilfenil de la rivastigmina (1) en diferentes sistemas triciclos relativos a la estructura (3). La Figura 21 muestra la estrategia de diseño para la síntesis de los compuestos del (4 al 9). Las estructuras del (1 al 3) se utilizaron como compuestos de referencia para el análisis de los resultados.⁶¹

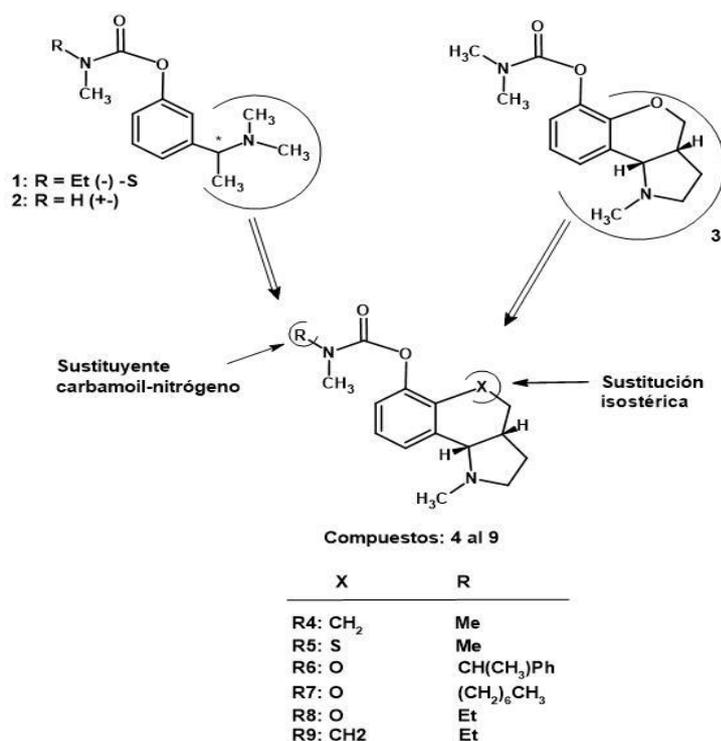


Figura 21. Estrategia de diseño para la síntesis de los compuestos 4 al 9. Se inserta el grupo dimetilaminoetilfenil de la rivastigmina (1) en diferentes sistemas triciclos relativos a la estructura (3).⁶¹

En este trabajo se analizó además el rol del sustituyente carbamoil-nitrógeno a través de la síntesis de diversos aril y alquil carbamatos (**6** al **9**).

La síntesis de los compuestos **4** y **9** se realizó a partir de una tetralona asequible comercialmente. Involucra pasos de alquilación en condiciones anhidras, metilación de una función amina, subsecuente dealquilación de un grupo metoxi y finalmente reacciones con el isocianato adecuado en cada caso (Figura 22).

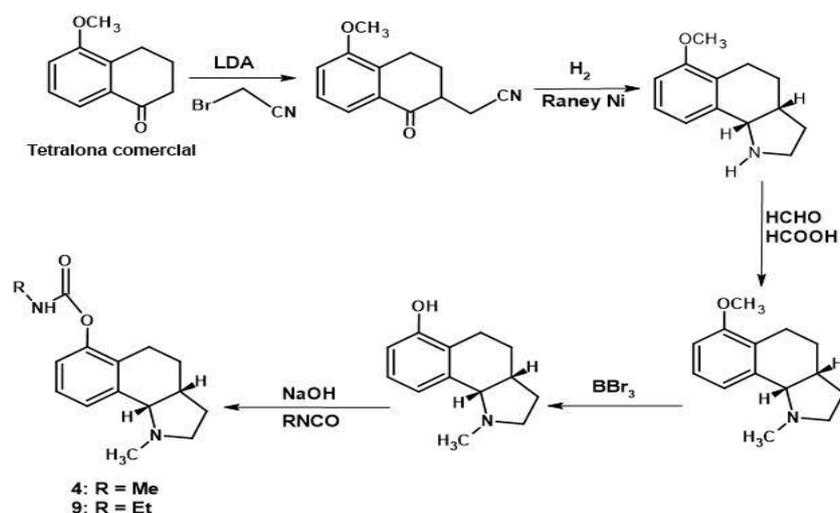


Figura 22. Síntesis de los derivados análogos de la rivastigmina **4** y **9**.⁶¹

La síntesis del compuesto **5** se muestra en la Figura 23 (a), mientras el inciso 23 (b) se corresponde con la síntesis de los derivados estructurales **6**, **7** y **8**.

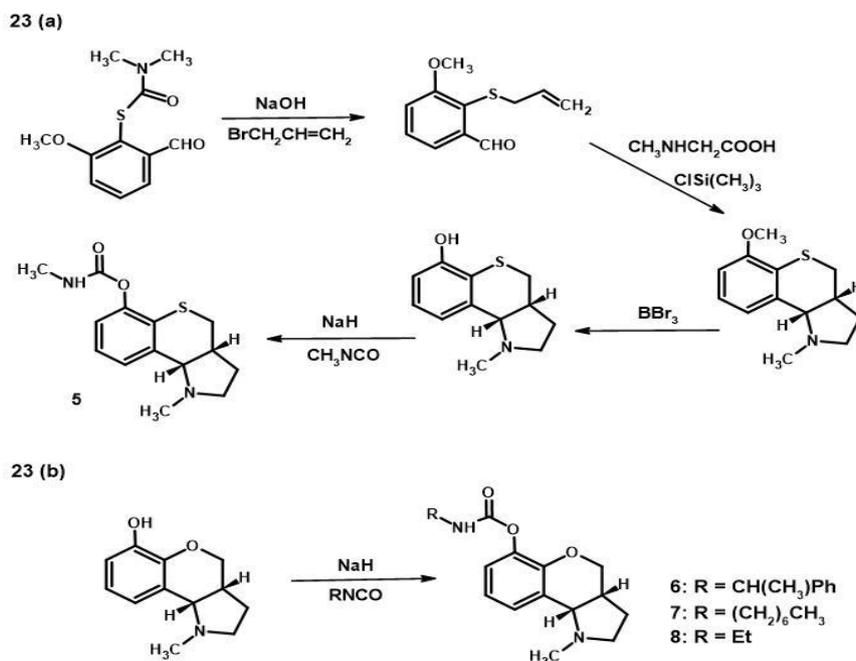
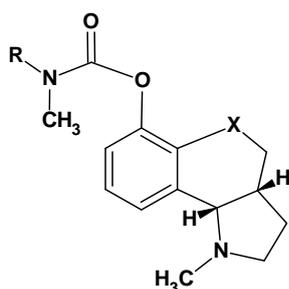


Figura 23. Síntesis de los derivados análogos de la rivastigmina. (a) Análogo **5**. (b) Análogos **6**, **7** y **8**.⁶¹

La separación enantiomérica de las diferentes mezclas racémicas no se llevó a cabo, ya que varios autores han concluido que la quiralidad no afecta de modo significativo la actividad inhibitoria de estos análogos estructurales de la rivastigmina.

La Tabla 9 refleja la capacidad inhibitoria, expresada como valores de IC₅₀ (representa la concentración necesaria del inhibidor para disminuir la actividad enzimática al 50%), de los complejos tricíclicos (**4** al **9**) respecto a la AChE y la BChE. Los compuestos de referencia son la rivastigmina (**1**), miotina (**2**) y **3**.

Tabla 9. Inhibición de la AChE y BChE por los derivados tricíclicos de la rivastigmina.⁶¹



Producto	X	R	IC ₅₀ ± SEM (nM) ^α	
			AChE	BChE
1	Rivastigmina		1535 ± 64	301 ± 14
2	Miotina		100 ± 33	406 ± 13
3	O	Me	30,0 ± 1,7	59,4 ± 2,3
4	CH ₂	Me	17,3 ± 1,2 *	24,5 ± 1,6
5	S	Me	8,11 ± 0,28 *	10,5 ± 0,5 *
6	O	CH(CH ₃)Ph	1870 ± 230	209 ± 3
7	O	(CH ₂) ₆ CH ₃	20,3 ± 3,1	1,26 ± 0,04 *
8	O	Et	420 ± 5	44,41 ± 1,8
9	CH ₂	Et	393 ± 33	30,3 ± 2,5

El compuesto **5** (entrada 5, Tabla 9) con un átomo de azufre en su estructura posee el mayor poder inhibitorio hacia la acetilcolinesterasa, siendo 192 veces más potente que la rivastigmina; de hecho, las estructuras con mejor capacidad inhibitoria son los metilderivados del fármaco. Esta evidencia se explica desde impedimentos estéricos entre el grupo etil de la rivastigmina y la histidina (His440) dentro del sitio activo de la AChE, demostrados por difracción de rayos X. Dichos impedimentos provocan un movimiento de la histidina (His440) lejos de su vecino estructural el glutamato (Glu327), resultando en la disrupción de la triada catalítica de la acetilcolinesterasa. La influencia desfavorable de la cadena N-alquil en el grupo carbamato es sorprendentemente superior en la AChE que en la BChE. El aumento de la longitud de la cadena alquil a etil, resulta en una reducción hasta 40 veces de la capacidad de inhibición de la AChE tanto en la serie del carbón como del oxígeno. Este resultado es lógico, dado que la butirilcolinesterasa tiene una hendidura acílica mayor que la acetilcolinesterasa y

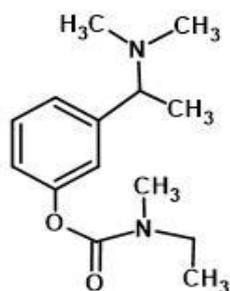
el efecto negativo de un sustituyente voluminoso es menor, así los productos (**6-9**, entradas 6-9, Tabla 9) son mejores inhibidores de la BChE.

En general, la potencia de inhibición hacia la acetilcolinesterasa se incrementa en la medida que aumenta la rigidez de la estructura de los análogos respecto a la flexibilidad estructural de la rivastigmina. Estos compuestos con mayores restricciones tienen mejor afinidad por la enzima, ya que no experimentan penalizaciones entrópicas comparados con el esqueleto del fármaco, mucho más libre en rotación durante la unión. El resultado en cuanto a la butirilcolinesterasa es muy similar a la AChE, los carbamatos rígidos (**3-5**, entradas 3-5, Tabla 9) son mejores inhibidores que la estructura flexible de la rivastigmina.

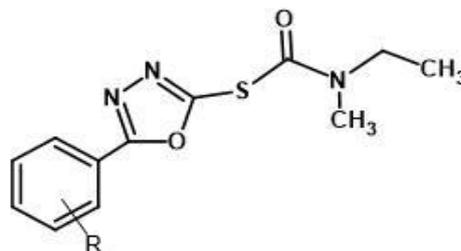
Al intercambiar el átomo de oxígeno o de carbón por azufre (**5 vs 3** y **5 vs 4**, Tabla 9), se aumenta ligeramente la inhibición funcional de ambas colinesterasas, lo cual sugiere una interacción corta y favorable entre el grupo aromático del triptófano (Trp86) en la AChE y del (Trp82) en la BChE, dentro de los sitios activos enzimáticos con el átomo de azufre.⁶¹

Los oxadiazoles entre varios compuestos heterocíclicos, han obtenido gran atención en química medicinal. Potencian la bioactividad mediante interacciones por enlaces de hidrógeno con las proteínas; también debido a la electronegatividad de los átomos del anillo unido a su estructura plana y aromática, todo lo cual les convierte en núcleos farmacológicos muy apreciados. Poseen un gran rango de propiedades: antiviral, antimicrobiana, anticáncer y antihipertensiva.

Una serie de compuestos 5-aril-1,3,4-oxadiazol-2-carbamotioato se sintetizaron a partir de datos estructurales de la rivastigmina. Con tal propósito, se diseñaron a través del método de acoplamiento informático (*computational docking method*). También se analizaron las interacciones resultantes con residuos aminoacídicos dentro de las cavidades catalíticas de la AChE y la BChE. Las estructuras de los compuestos sintetizados se establecieron por métodos fisicoquímicos y espectroscópicos. El grupo carbamoil de la rivastigmina se modificó a carbamotioato y se investigó el efecto del heterociclo 1,3,4-oxadiazol como núcleo-farmacóforo. El potencial de cada compuesto (**1-11**, Figura 24) se evaluó determinando los valores de IC₅₀ en el caso de la AChE y la BChE. La Figura 24 presenta la estructura esquemática de estos análogos isostéricos de la rivastigmina a los que se añadió el heterociclo 1,3,4-oxadiazol con tres átomos electronegativos. El objetivo que se pretendía era mejorar las propiedades fisicoquímicas y la capacidad de formar enlaces de hidrógeno.⁶⁰



Rivastigmina



Compuestos de diseño (1 al 11)

- R 1: H
- R 2: 2-OH
- R 3: 3-OH
- R 4: 4-OH
- R 5: 2,4 diOH
- R 6: 4-Me
- R 7: 4-OMe
- R 8: 4-Cl
- R 9: 3-Cl
- R 10: 4-Br
- R 11: ácido fenilacético

Figura 24. Representación esquemática de los derivados isostéricos de la rivastigmina con el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.⁶⁰

La ruta de síntesis de los derivados oxadiazol de la rivastigmina involucra diversos pasos de reacción, entre los cuales pueden citarse la esterificación de un ácido carboxílico aromático como punto de partida, deshidratación, acidificación, condensación, etc. La vía sintética se muestra en la Figura 25.

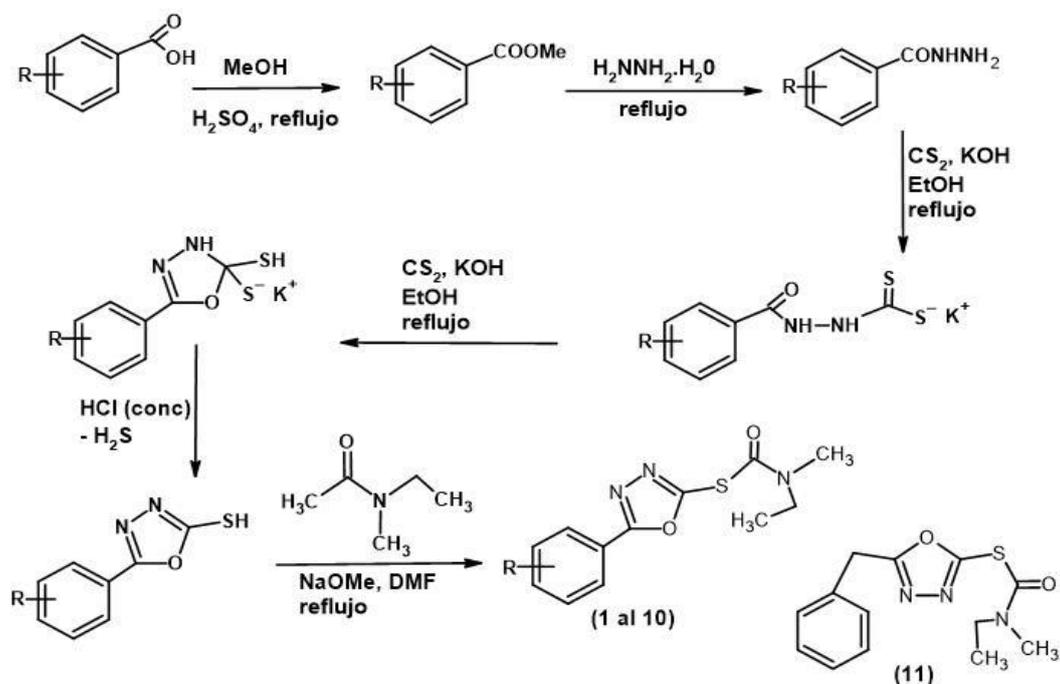
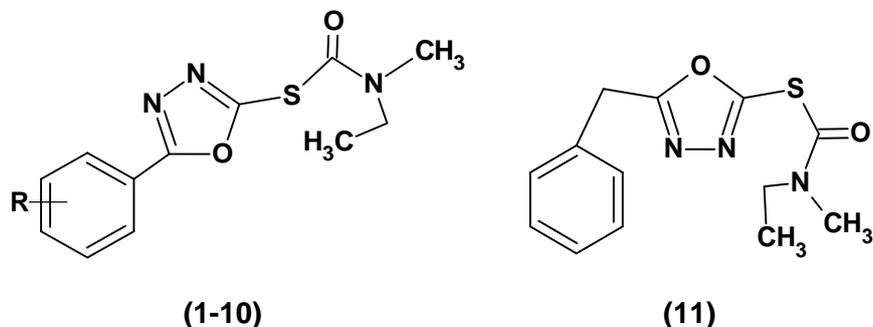


Figura 25. Ruta de síntesis de los derivados oxadiazol de la rivastigmina.⁶⁰

El proceso completo duró 4-5 h hasta alcanzar los derivados y productos (1-11), se obtuvieron con rendimientos de moderados a buenos. La Tabla 10 exhibe los valores de IC₅₀ frente a la AChE y la BChE, para cada derivado oxadiazol de la rivastigmina.

Tabla 10. Valores de IC₅₀ de los derivados con el heterociclo oxadiazol para la AChE y la BChE.⁶⁰



Producto	R	AChE (IC ₅₀ , μM) ^α	BChE (IC ₅₀ , μM)
1	H	>100	11,40
2	2-OH	>100	10,70
3	3-OH	>100	10,90
4	4-OH	>100	13,00
5	2,4 diOH	>100	12,00
6	4-Me	>100	0,51*
7	4-MeO	>100	69,44
8	4-Cl	>100	7,47
9	3-Cl	>100	>100
10	4-Br	>100	>100
11	-	>100	>100
Rivastigmina	-	11,07	7,72

Los valores de IC₅₀ demuestran que los derivados de este estudio poseen actividad inhibitoria sobre la BChE, pero incluso a altas concentraciones (100μM), ninguno es capaz de inhibir la AChE. En las condiciones del experimento, el tamaño de los compuestos diseñados (excepto entradas **9**, **10** y **11**, Tabla 10) permitió que se establecieran interacciones apropiadas con el sitio activo de la butirilcolinesterasa, ya que esta posee una hendidura catalítica con mayor volumen que la acetilcolinesterasa. Contrariamente, estos compuestos fueron incapaces de interactuar con los residuos del sitio catalítico de la AChE.

El compuesto **6** (entrada 6, Tabla 10) con una sustitución metil en posición para del grupo aril, experimentó el mayor valor de inhibición frente a la BChE, al parecer es el análogo que mejor alcanza el balance: volumen/potencial de interacción. En este trabajo queda demostrada la gran importancia, para el diseño de los derivados de rivastigmina, de alcanzar el balance adecuado entre el tamaño del compuesto y la tendencia a interactuar con los aminoácidos dentro de las cavidades catalíticas de ambas colinesterasas.⁶⁰

4.2.3 Síntesis asimétrica sostenible de la rivastigmina

Los procesos biocatalíticos son cada vez más importantes en el desarrollo de la síntesis asimétrica sostenible. En general ocurren en condiciones moderadas tales como: soluciones de pH neutro, temperatura ambiente, presión atmosférica, etc. Si logran alcanzar, en el caso de la rivastigmina, sencillez en su diseño, economía de inversión y altos rendimientos globales, pueden ser altamente competitivos frente a los últimos procedimientos basados en agentes que resuelven la quiralidad, procesos de resolución dinámica, o las reacciones de hidrogenación asimétrica.

La Figura 26 describe diferentes metodologías, recientemente publicadas para la síntesis asimétrica de la (S)-rivastigmina:⁶²

- a) Estrategia de aminación reductiva a partir de aminas con elevada enantio-pureza, sin embargo, el rendimiento general es muy bajo (43%).^{53,63,64,65}
- b) Reacciones mediadas por enzimas (lipasas, transaminasas y cetoreductasas).^{57,56}
,55,66,67,68
- c) Resolución cinética dinámica (*dynamic kinetic resolution*, DKR) empleando un complejo de rutenio enlazado a un polímero y una lipasa inmovilizada.⁵⁴
- d) Reducción asimétrica directa de derivados carbonilo con una catálisis quiral espiro-iridio (Ir-SpiroPAP).⁶⁹

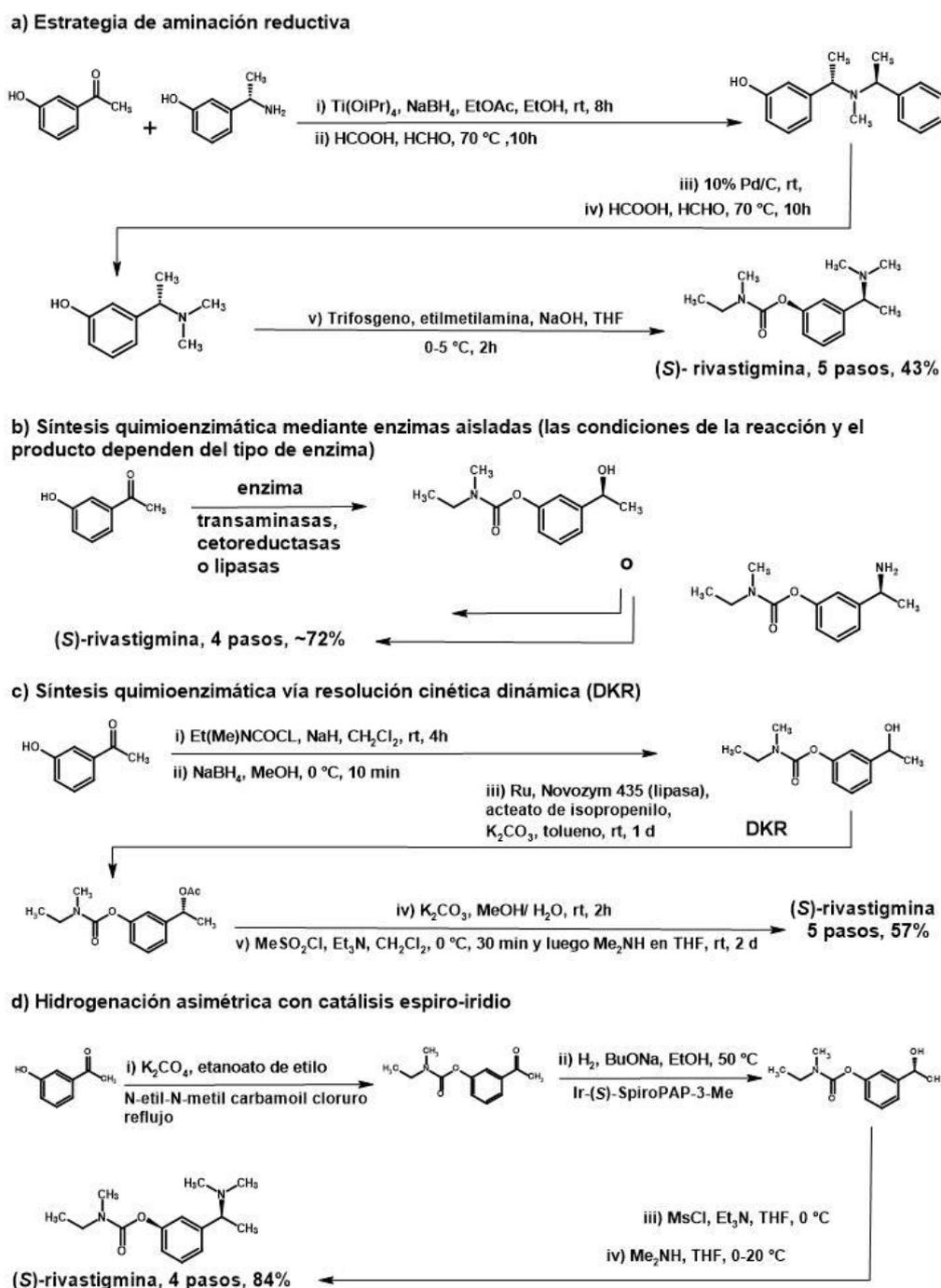


Figura 26. Diferentes mecanismos publicados para la síntesis asimétrica de la (S)-rivastigmina.^{62,64,54,69}

A continuación, se describe una vía quimioenzimática simple y económicamente viable para la producción de (S)-rivastigmina. El reactivo de partida fue la 3-hidroxiacetofenona, reactivo comercialmente accesible. El proceso involucra la bio-reducción *R*-regioselectiva de una cetona aromática, llevada a cabo por células completas de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 en buffer salino fosfato (PBS), a 37° C, durante 24 horas como paso fundamental. Es una ruta de cuatro pasos que se puede implementar a gran escala, respeta al medio ambiente, con un rendimiento global del 78% y un 98% de ee (Figura 27).

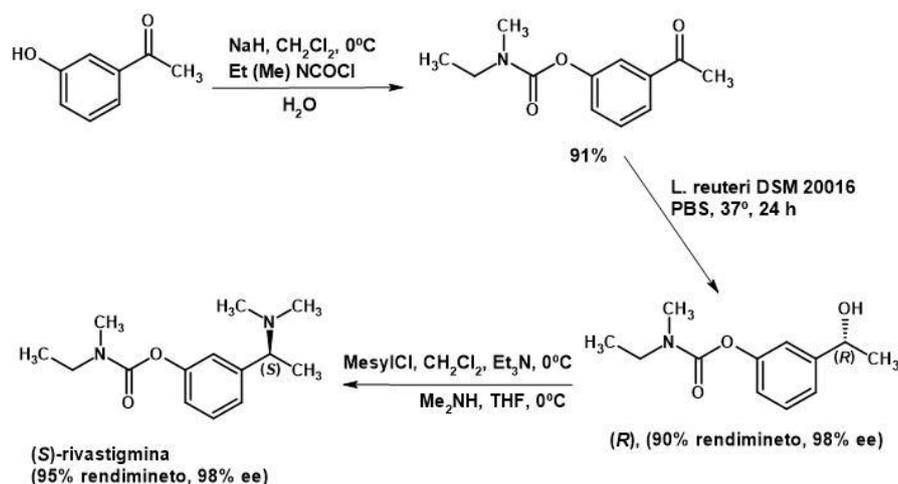


Figura 27. Síntesis total de (S)-rivastigmina en cuatro pasos.⁶²

El carbamato producto de la primera reacción es sometido a una reducción biocatalítica enantioselectiva por células completas de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 en alcohol. La transformación del precursor directo (R)-carbamato a (S)-rivastigmina, ocurre a través de un mecanismo de dos pasos (*one-pot two-step process*); primero se convierte el (R)-precursor en el mesilato correspondiente, el cual después experimenta una sustitución nucleofílica estereoespecífica con una solución de Me₂NH en THF, de este modo se logra invertir la configuración en el centro quiral.

Este procedimiento sencillo, económico, sostenible y fácil de realizar (la preparación de las células completas de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 es simple, barata; poseen además pocos requerimientos nutricionales), es altamente competitivo y aplicable a escala industrial. Se lleva a cabo en condiciones de reacción moderadas, lográndose un buen rendimiento global (78%) y elevada enantio-pureza (98%). Se puede proponer como una vía alternativa válida respecto a todos los procedimientos de síntesis asimétrica, los cuales descansan en costosas organocatálisis, ligandos quirales y complejos de metales de transición; empleando a su vez compuestos orgánicos tóxicos y nocivos.⁶²

4.3 Optimización de las formulaciones de rivastigmina: híbridos, combinación con moléculas y nanovehículos

4.3.1 Híbridos de rivastigmina

Desafortunadamente escasos medicamentos han sido aprobados para tratar sintomáticamente el Alzheimer y el Parkinson. El diseño de nuevos agentes terapéuticos es un gran campo de investigación, donde también se explora la búsqueda de híbridos moleculares más eficaces como potenciales candidatos multidiana o *multitarget*. En la última década, la estrategia de los ligandos dirigidos *multitarget* (MTDL) ha tenido un gran auge enfocada al tratamiento de patologías con una etiopatogenia compleja.⁷⁰ A continuación se

describen someramente dos investigaciones orientadas hacia la obtención de híbridos de rivastigmina.

La primera investigación consiste en la combinación simbiótica (híbridos) de la rivastigmina con agentes antioxidantes: ácido gálico (AG), ácido lipoico (AL) y ácido cromonacarboxílico (AC) (Figura 28):

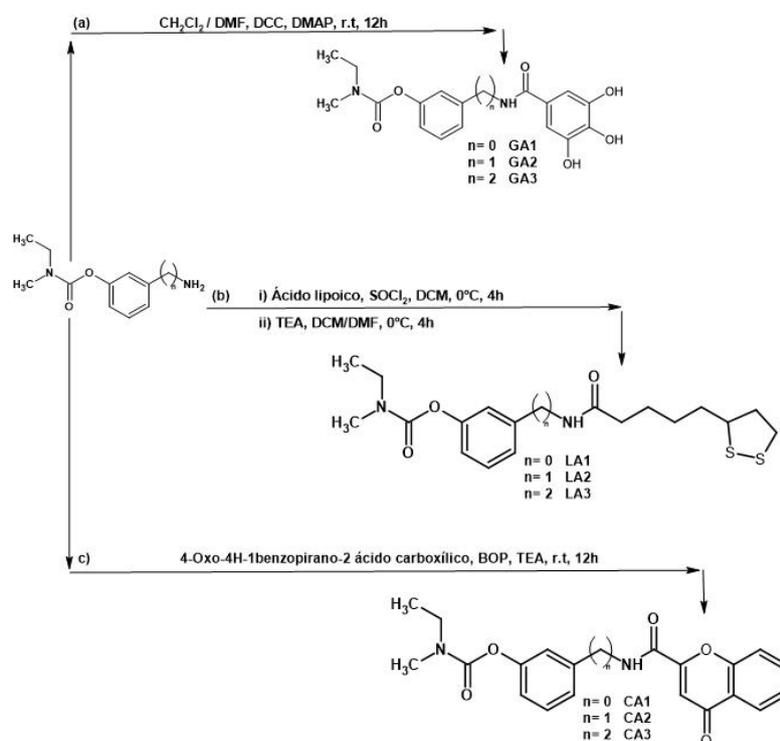


Figura 28. Síntesis de los compuestos híbridos de rivastigmina con agentes antioxidantes. (a) Serie del ácido gálico. (b) Serie del ácido lipoico. (c) Serie del ácido cromonacarboxílico.⁷⁰

In vitro se evaluó la capacidad inhibitoria de los híbridos sintetizados hacia la AChE y la BChE, las propiedades antioxidantes frente a ROS, el potencial de inhibir la formación de agregados A β y el efecto neuroprotector en células neuronales de ratón HT22, en cuanto a la inhibición del mecanismo de muerte neuronal inducido por el glutamato. Además, se realizaron pruebas de citotoxicidad en células neuronales de ratón HT22. Los resultados más destacables se exponen en la Tabla 11.

Tabla 11. Características más destacables en el estudio y evaluación de cada serie híbrida.⁷⁰

Serie del ácido gálico (GA)	Serie del ácido lipoico (AL)	Serie del ácido cromonacarboxílico (AC)
-----Baja afinidad por la AChE-----		
Inhibición significativa de la BChE respecto a la rivastigmina.	Todos destacan en la inhibición de la BChE, 9 veces más activos que el donepezilo y 2 veces más que la rivastigmina. Es la serie que mejor inhibe a la BChE.	Inhibición significativa de la BChE respecto a la rivastigmina.
Inhiben la formación de los agregados A β . Dentro de la serie destaca GA2, entre 53-59% de inhibición.	Inhiben la formación de los agregados A β .	Inhiben la formación de los agregados A β . Dentro de la serie destacan CA1 y CA2, entre 53-59% de inhibición.

Mantienen la propiedad antioxidante frente a ROS.	Mantienen la propiedad antioxidante frente a ROS.	Pierden la propiedad antioxidante frente a ROS.
GA1 produce un efecto neuroprotector significativo a 10 μ M.	Inactivos en cuanto a neuroprotección.	CA2 produce un efecto neuroprotector significativo a 10 μ M.
GA1 y GA3 son citotóxicos a más de 100 μ M en células HT22.	No se observa citotoxicidad (análisis hasta más de 100 μ M) en células HT22.	CA2 induce citotoxicidad a menos de 30 μ M en células HT22.

La segunda investigación consiste en el diseño y la síntesis de híbridos moleculares de rivastigmina y memantina (Figura 29):

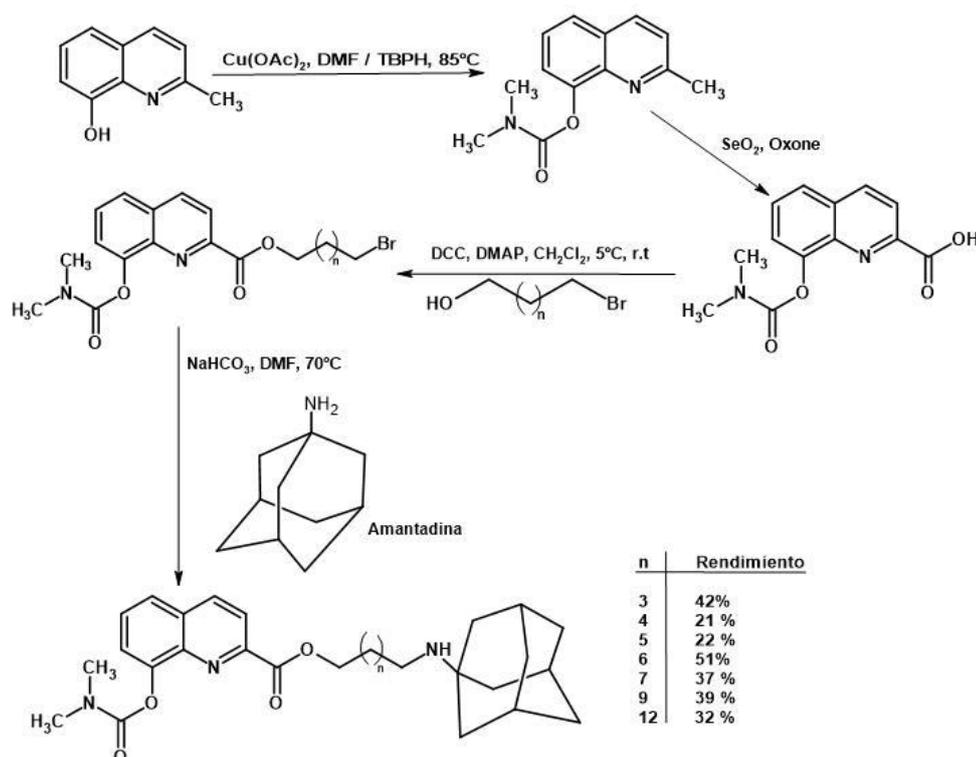


Figura 29. Síntesis de los compuestos híbridos de rivastigmina con memantina.⁷¹

En este caso se analizaron los híbridos rivastigmina-memantina evaluando la afinidad de cada compuesto hacia los canales iónicos (PDB: 4TWD de la bacteria Elic) en comparación con la memantina, también se estudiaron las afinidades por las colinesterasas AChE y BChE respecto a la rivastigmina.

Los resultados de acoplamiento molecular proteína-ligando revelaron que los nuevos híbridos poseen mayor afinidad por los canales iónicos (entre -10,2 y -8,0 Kcal/mol) que la memantina (-6,8 Kcal/mol). A su vez exhibieron mayor afinidad por la AChE (-8,1 a -7,4 Kcal/mol) y la BChE (-10,0 a -8,7 Kcal/mol) que la rivastigmina, esta última con -5,9 Kcal/mol y -7,1 Kcal/mol para la AChE y BChE respectivamente. El híbrido n=3 mostró la formación de fuertes enlaces de hidrógeno con los residuos ácido aspártico (Asn251) y serina (Ser247) del canal iónico PDB: 4TWD, así como diversas interacciones hidrofóbicas que estabilizan la interacción proteína-ligando.⁷¹

4.3.2 Nanovehículos, estudio de nuevas formulaciones de la rivastigmina y vía de administración alternativa: nasal

La rivastigmina sufre un importante primer paso metabólico en el hígado, lo cual disminuye su biodisponibilidad.⁷² La liberación oral posee grandes limitaciones como el tener que eludir el metabolismo hepático, o la destrucción de la molécula bien por digestión enzimática o debido al pH ácido del estómago.⁷³ El fármaco además tiene una vida media corta y es de naturaleza hidrofóbica, ambas características dificultan su paso por la barrera hematoencefálica (BHE) y el líquido cefalorraquídeo (LCR). Las uniones estrechas entre las células endoteliales de la BHE restringen la absorción y permeabilidad de los fármacos al cerebro; de modo que para alcanzar los niveles terapéuticos se necesitan altas concentraciones y elevadas frecuencias de administración. El resultado, son los efectos colinérgicos no deseados: náusea, dispepsia, bradicardia y alucinaciones. Se requieren modos más eficientes de liberar la rivastigmina en el órgano cerebral, una opción puede ser la utilización de los nanosistemas a través de vías alternativas, por ejemplo: la nasal.⁷²

La superficie de las mucosas ha sido ampliamente investigada como una potencial ruta de administración en el caso de agentes terapéuticos con escasa biodisponibilidad oral. La vía intranasal ha demostrado ser una técnica eficiente para liberar un fármaco directamente al cerebro, los patrones de concentración de los fármacos administrados a través de la ruta nasal son comparables a los patrones obtenidos por vía intravenosa.⁷³ No obstante, presenta limitaciones como evadir el mecanismo de aclaramiento mucociliar entre otros.⁷² Los agentes terapéuticos pueden ser absorbidos a través de las membranas de las mucosas en la región olfativa de la cavidad nasal y acceder así directamente al cerebro vía la lámina cribosa⁷³ y el nervio trigémino, este último conecta directamente con el órgano cerebral y el LCR.⁷²²

A continuación, se describen someramente dos investigaciones orientadas hacia la obtención de nuevas formulaciones de rivastigmina empleando nanovehículos.

La primera investigación consiste en la formulación y la evaluación de nanopartículas (NPs) constituidas de Eudragit RL-100 cargadas con rivastigmina y formuladas en gel para liberación intranasal.⁷³ Las NPs se prepararon utilizando diferentes proporciones del polímero Eudragit RL-100/rivastigmina (en la proporción 10:1, se obtuvo un 62% de encapsulación), aplicando la técnica de nanoprecipitación⁷⁴ con algunas modificaciones. Se evaluaron las características físico-químicas de las NPs de Eudragit RL-100/rivastigmina (NPs EU-R), la absorción celular y la citotoxicidad en células de adenocarcinoma de pulmón A459. La nanoformulación de las NPs EU-R en gel se realizó, empleando PF-127 (la proporción óptima fue una concentración 18% w/v), como agente gelificante mediante la metodología *cold method* desarrollada por Schmolka.⁷⁵ Posteriormente, se analizó dicha formulación en cuanto

a sus propiedades físico-químicas, así como el perfil de liberación del fármaco a través de estudios *ex vivo* de la permeabilidad de la rivastigmina en mucosa nasal de ovejas. En la Figura 30 se muestra la imagen liofilizada de las NPs de Eudragit RL-100/rivastigmina (NPs EU-R).

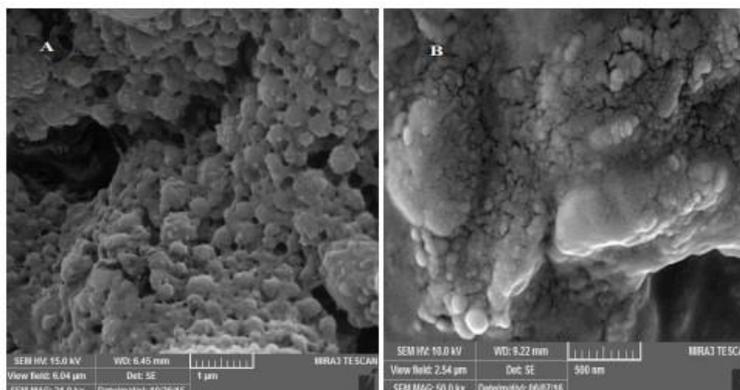


Figura 30. (A) Imagen de las NPs de Eudragit RL-100/rivastigmina (NPs EU-R) liofilizadas. (B) Las NPs EU-R embebidas en el gel de la nanoformulación para administración intranasal.⁷³

Las NPs EU-R exhiben un tamaño de partícula entre 118-154 nm, valores positivos del potencial zeta (22,5 a 30 mV), y una forma aproximadamente esférica. Estas NPs mostraron baja citotoxicidad en células A549 al analizarse la internalización del fármaco en las células, dependiendo del tiempo y por otro lado, de la dosis. La nanoformulación en gel posee una temperatura de transición cercana a la temperatura corporal, experimenta un perfil de liberación controlado de la rivastigmina durante 24 horas que responde al patrón de difusión de Fickian. La penetración y permeabilidad de la rivastigmina en la mucosa nasal de ovejas, fue significativamente superior para la nanoformulación en gel de las nanopartículas (NPs EU-R), en comparación con la rivastigmina formulada en gel sin haber sido previamente encapsulada en el nanovehículo. Por lo que se deduce que la absorción en la mucosa está favorecida por las propiedades muco-adhesivas de las NPs EU-R.⁷³

La siguiente investigación consiste en la síntesis y caracterización de nanopartículas de un nuevo polímero impreso molecularmente para la liberación controlada de rivastigmina.⁷⁶ En este caso se prepararon y se caracterizaron nanopartículas constituidas de polímeros impresos molecularmente (MIPs) con rivastigmina. Estos nanovehículos tipo MIPs son polímeros que contienen una impresión que simula la estructura tridimensional del fármaco en cuanto a forma, tamaño y orientación de unión de la molécula hacia sitios específicos anclados en el polímero. La impresión molecular del medicamento se logra con un molde del mismo que es finalmente removido, dejando entonces la cavidad preparada para la inserción de la rivastigmina a estudio dentro de la misma. Las nanopartículas MIPs se desarrollaron optimizando la proporción del monómero funcional (poli-ácido metacrílico) y dos *cross-linkers*

(PETA y TMPTA), estos últimos se emplean como potenciales sitios de unión de la rivastigmina a la cavidad del polímero. Los mejores resultados en general se obtuvieron con las NPs generadas en una proporción rivastigmina: monómero de ácido metacrílico: PETA de 1: 6: 12. La formación de las NPs con el molde de rivastigmina se realizó mediante el proceso de polimerización-precipitación⁷⁷ y posterior adición de PETA, esta mezcla final se calentó sobre los 60°C durante 12 horas con agitación moderada. Tras completarse el proceso de polimerización, las partículas poliméricas se lavaron repetidamente con una solución de metanol y ácido acético (90:10% v/v) para poder extraer el molde de rivastigmina de las cavidades en los nanovehículos MIPs. En la Figura 31 se muestra la síntesis de las nanopartículas MIPs impresas con el molde de rivastigmina, empleando el *cross-linker* PETA.

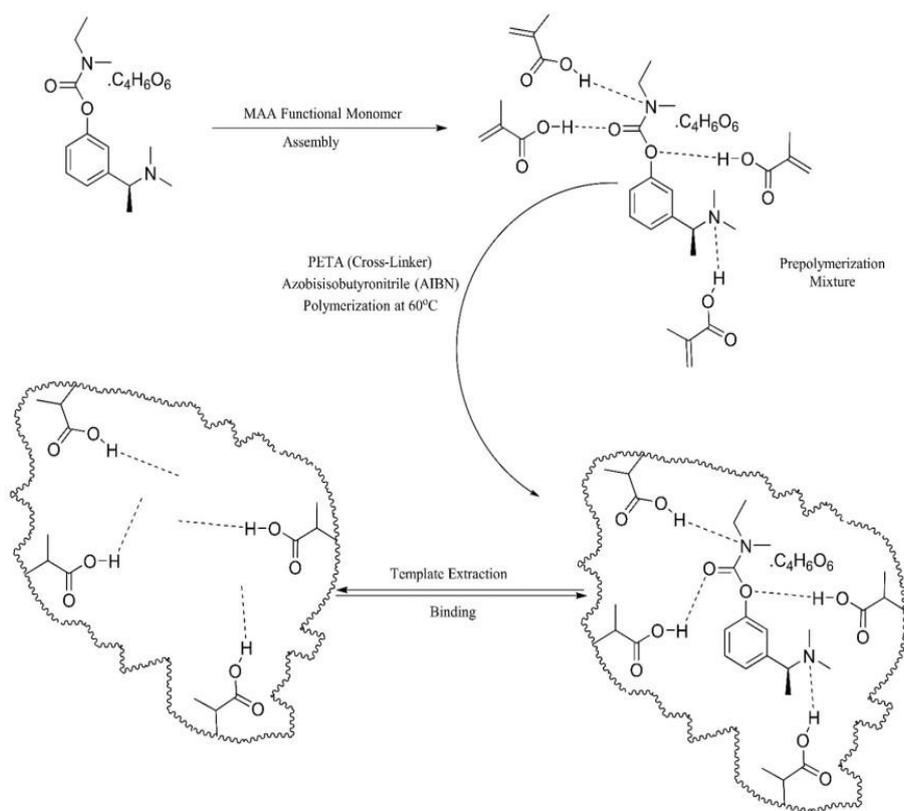


Figura 31. Esquema general del proceso de síntesis de las nanopartículas formadas por polímeros impresos molecularmente (MIPs) con rivastigmina.⁷⁶

La carga del fármaco en las nanopartículas se llevó a cabo con 30 mg de MIPs y 10 mL de la solución de rivastigmina a 90 mg/L. Este proceso se repitió de manera idéntica con nanopartículas sin impresión molecular (NIPs), las cuales poseen idéntica formulación que MIPs y se utilizaron como control en los experimentos. Se estudió la integridad, características físico-químicas, morfología, degradación cinética y el patrón de liberación de la rivastigmina desde la matriz del polímero impreso molecularmente.

Las nanopartículas MIPs tenían forma esférica con una dimensión sobre los 66 nm, mientras las NIPs eran capas extendidas con una extensión aproximada de 427 nm. El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo con la línea celular L929 (fibroblastos de ratón). A concentraciones de MIPs inferiores a 50 µg/mL, los valores de viabilidad eran superiores al 60%; a concentraciones por debajo de 10 µg/mL el valor de viabilidad oscilaba sobre el 80%.

El seguimiento de la liberación controlada de la rivastigmina se realizó empleando el método de diálisis: *bag method*⁷⁸ en PBS a pH 7,4. Las partículas NIPs sin impresión molecular liberaron el 98% de la rivastigmina en 54 horas, mientras las nanopartículas MIPs liberaron el fármaco totalmente después de 168 horas. La rivastigmina absorbida en la superficie de los nanovehículos sin impresión molecular se libera de modo más rápido y fluido comparadas con las moléculas en la cavidad, dentro de su molde molecular. El resultado puede ser debido a que el solvente necesite más tiempo para vencer las interacciones de la rivastigmina con los sitios específicos de unión en la impresión molecular 3D del polímero.⁷⁶

4.4 Estrategias recientes de investigación y nuevas dianas terapéuticas para Alzheimer y Parkinson

En la actualidad el tratamiento farmacológico disponible para el Alzheimer comprende los fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (donepezilo, galantamina, rivastigmina) y la memantina; no obstante, se ha reportado que solo un tercio de los pacientes responden al tratamiento. De hecho, la eficacia de los inhibidores colinérgicos es heterogénea, considerada de baja a media. Un estudio reciente calculó una tasa de respuesta del 27,8% a tres de estos fármacos en la EA, a lo cual se pueden añadir además los efectos adversos que provocan: diarrea, náuseas, inestabilidad, vómitos, pérdida de peso; otras reacciones de mayor severidad como úlcera estomacal, síncope y crisis convulsivas generalizadas. Como resultado, el paciente puede requerir la suspensión del fármaco y ver limitadas sus opciones terapéuticas. Hasta la fecha, ninguno de los medicamentos desarrollados con el objetivo de detener la producción, la formación de agregados o eliminación de los péptidos A β , ha demostrado ser eficaz en los ensayos clínicos de fase III, esto impone la investigación hacia nuevas dianas terapéuticas, principalmente en la etapa preclínica de la enfermedad.⁷⁹ Tampoco existe un tratamiento farmacológico efectivo en el caso del Parkinson.³⁶

4.4.1 Alzheimer: estrategias recientes y nuevas dianas terapéuticas

- Microglía e inmunoterapia

En este caso las terapias se basan en el principio de eliminar el estado disfuncional de la microglía o en restablecer su estado neuroprotector, lejos de la hiperactivación de la misma;

enfocados hacia: la modificación de la microglía, inmunoreceptores y la respuesta inflamatoria (Tabla 12).²⁰

Tabla 12. Terapias dirigidas a la microglía en el Alzheimer.²⁰

Estrategia	Mecanismo	Agente/ método terapéutico	Referencia
Modificación terapéutica de la microglía.	Depleción disfuncional de la microglía.	PLX3397, PLX5622.	Sosna et al. (2018) y Spangenberg et al. (2019).
	Restablecimiento del estado neuroprotector de la microglía.	Delección del promotor Csf1r (locus que controla al receptor del factor estimulador de la colonia de macrófagos). Involucra técnicas genéticas.	Rojo et al. (2019).
Inmunoreceptores de la microglía como dianas.	Aumento de la actividad TREM2 para potenciar la actividad fagocítica de la microglía hacia A β .	AL002, AL002a, AL002c, Anticuerpo monoclonal 4D9.	Cheng et al. (2018), Price et al. (2020), Wang et al. (2020) y Schlepckow et al. (2020).
	Inhibición de CD33 para favorecer la fagocitosis de A β .	P22, Lintuzumab.	Zhang et al. (2016) y Miles et al. (2019).
Respuesta inflamatoria de la microglía como diana.	Disminución de la hiperactivación de la microglía e inhibición de la respuesta inflamatoria.	Ibuprofeno, Pioglitazona, MCC950, JC-124, Minociclina, Edaravone, ATP oxidado, Brilliant Blue G, Nimodipine.	Yan et al. (2003), McLarnon et al. (2006), Ryu y McLarnon (2008), Geldmacher et al. (2011), Sato et al. (2011), Wilkinson et al. (2012), Jiao et al (2015), Yang et al. (2015), Wang et al. (2017), Parikh et al. (2018), Yin et al (2018), Chiozzi et al. (2019), Garcez et al. (2019) y Luciunaite et al. (2020).

La inmunoterapia aplicada en la EA utiliza tanto la inmunidad activa (se emplean como inmunógenos los péptidos A β , la proteína tau o péptidos artificiales específicos), como la inmunidad pasiva (administración de anticuerpos monoclonales). Existen estudios preclínicos y clínicos para ambas estrategias inmunológicas. Los anticuerpos monoclonales son capaces de penetrar la BHE y se consideran más prometedores en cuanto a resultados clínicos.¹ Hasta el año 2020 existían alrededor de 132 agentes terapéuticos en 156 ensayos clínicos para el Alzheimer, de los cuales 29 correspondían a anticuerpos monoclonales involucrados en 24 ensayos clínicos.⁸⁰

- Agentes terapéuticos multidiana o *multitarget*

Los ligandos dirigidos *multitarget* (MTDLs) generan gran interés en los investigadores académicos y en aquellos volcados más hacia los procesos industriales. Pueden interactuar con diversas dianas biológicas al poseer diferentes grupos farmacóforos. Se estudian y sintetizan con el objetivo fundamental de tratar enfermedades multifactoriales, incluidas el Alzheimer y el Parkinson. Es común leer investigaciones sobre el Alzheimer donde se investigan *multitargets* capaces de inhibir a las colinesterasas y a la enzima monoamino oxidasa B (MAOB). Esta última aumenta sus niveles en el cerebro de pacientes con EA

propiciando la formación de ROS; además pudiera regular las concentraciones intracelulares de los péptidos Aβ.⁸¹ El descubrimiento del Ladostigil (TV3326) fue el resultado de la búsqueda de un híbrido entre la rivastigmina y la rasagilina, el cual es capaz de inhibir a las colinesterasas y a la monoamino oxidasa B, también posee actividad neuroprotectora e inhibitoria de la apoptosis.⁸²

- Nanotecnología y nanovehículos

Los investigadores exploran diversos biomateriales para el desarrollo de nanovehículos o *nanocarriers* con el propósito de dirigir las sustancias bioactivas hacia el cerebro, preservar sus propiedades, saltar las barreras asociadas a la baja solubilidad, permeabilidad, biodisponibilidad y minimizar los efectos adversos. En la Tabla 13 se describen los nanovehículos empleados en la investigación del Alzheimer, así como ejemplos recientes desarrollados con rivastigmina.⁸³ En la Figura 32 pueden observarse algunos ejemplos.⁸⁴

Tabla 13. Nanovehículos empleados en la investigación del Alzheimer.^{83,84}

Nanovehículo/ Definición	Características	Ejemplos de estudios recientes con rivastigmina
Nanopartículas: Fragmentos muy pequeños, generalmente esféricos, con un radio entre 2-100 nm. ⁸⁵	Como desventaja general tienen la acumulación de material no biodegradable en el cerebro. Las NPs de PLGA* recubiertas con quitosano y luteína atraviesan muy bien la membrana de las mucosas, y con selenio la BHE. Las NPs de PEG* son interesantes para liberar fármacos en el cerebro.	NPs de quitosano con rivastigmina-HCL; vía intranasal. ⁸⁴
		NPs de PLGC* y PBCA* con rivastigmina; vía intravenosa. ⁸⁴
Dendrimeros: El nombre proviene del griego <i>dendron</i> que significa árbol. También se denominan <i>cascade molecules</i> , idealmente son macromoléculas monodispersas con una arquitectura tridimensional ampliamente ramificada. ⁸⁵	Se han sintetizado diferentes tipos dependiendo del material que los compone: PAMAM, PPI50, carbosilano, PLL y triazina. PAMAM es el más utilizado debido a su biocompatibilidad, flexibilidad y bajo costo.	-
Micelas: Las micelas poliméricas se forman por asociación espontánea de bloques anfipáticos de copolímeros en solución acuosa. Tienen corazón hidrofóbico y una cubierta hidrofílica.	Permite atrapar elementos hidrofóbicos en su interior y solubiliza las sustancias hidrofílicas en su estructura más externa de carácter hidrofílico. Es compatible con gran variedad de fármacos dada dicha propiedad.	-
Liposomas: Es una vesícula lipofílica compuesta por una bicapa de fosfolípidos que rodean a un compartimento acuoso.	Permiten atrapar sustancias hidrofóbicas en la bicapa lipídica e hidrofílicas en el interior acuoso. Son inestables, por vía intravenosa sufren un rápido aclaramiento. Pueden ser modificados para ganar en estabilidad a través de la PEGilación y adición de transferrina a la partícula.	Liposomas de fosfatidilcolina, diexadecil fosfato, colesterol y glicerol con rivastigmina-HCL; vía subcutánea. ⁸⁴
		Liposomas cubiertos de CPP (<i>cell-penetrating peptide</i>), de fosfatidilcolina de huevo, colesterol, DSPE*, PEG* y CPP, con rivastigmina-HCL; vía intranasal. ⁸⁴
Nanoemulsión: Mezcla isotrópica termodinámicamente estable de dos líquidos inmiscibles, uno orgánico y otro en fase acuosa, estabilizados con surfactantes y co-surfactantes. El tamaño promedio es de 10-200 nm.	Permiten cargar sustancias hidrofóbicas e hidrofílicas. Facilita la permeabilidad en las mucosas. Puede utilizarse en gran variedad de formulaciones como las semisólidas, líquidas, en crema, gel, spray, etc.	-
SLN (partículas lipídicas sólidas): Es una nueva generación de sistemas de liberación de fármacos, formado por lípidos en estado sólido como corazón	Tienen una gran capacidad de carga, pequeño tamaño, una gran área de superficie efectiva y mayor estabilidad que otras partículas lipídicas. Son muy	SLN de Compritol 888 ATO, con rivastigmina-HCL; vía intranasal. ⁸⁴

fundamental de la estructura y una fase más externa con surfactantes biocompatibles.	prometedores para la liberación de agentes terapéuticos en el cerebro.	
NLC (partículas de lípidos líquidos y sólidos): Conocidos como la segunda generación de SLN. Poseen lípidos en estado líquido y sólido estabilizados con surfactantes.	Gran capacidad de carga. Penetran fácilmente la piel y otras membranas fisiológicas, esto les hace interesante para la liberación de fármacos en el cerebro.	-
Hidrogel: Compuestos de una red de materiales blandos entrecruzados en una estructura 3D capaz de retener un considerable volumen de fluidos acuosos o agua.	Propiedades reactivas importantes. Pueden involucrar interacciones covalentes o supramoleculares. Poseen una capacidad de carga eficiente.	-
Scaffold biodegradable: Matriz extracelular que actúa como un molde para la regeneración del tejido, facilita la adhesión, diferenciación, proliferación de las células y la formación del tejido en tres dimensiones.	Se enfocan hacia la terapia <i>multitarget</i> o multidiana. Deben tener una estructura altamente porosa y biodegradable.	-

*PLGA: ácido láctico-co-glicólico, *PEG: polietilenglicol, *PBCA: polibutil ciano acrilato, *DSPE: 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

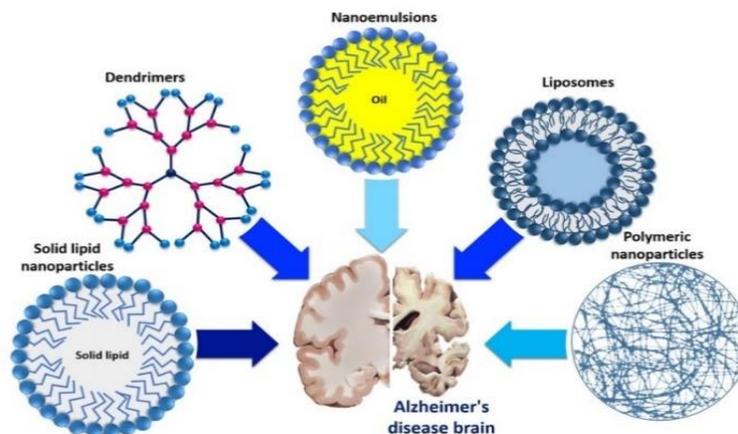


Figura 32. Algunos nanovehículos empleados en la investigación del Alzheimer. De izquierda a la derecha de la figura (sentido manecillas del reloj): SLN, dendrímeros, nanoemulsión, liposomas y nanopartículas.⁸⁴

4.4.2 Parkinson: estrategias recientes y nuevas dianas terapéuticas

- Terapia génica

Se enfoca hacia los genes GBA, LRRK2 y PRKN. El gen GBA codifica la glucocerebrosidasa, la pérdida funcional de esta enzima hace que se acumulen sus sustratos (glucolípidos); se cree que dicho efecto propicia la formación de oligómeros de α -sinucleína. LRRK2 codifica a 2527 proteínas-quinasas, la hiperfosforilación de la enzima Rab10 GTPasa se asocia a diversos mecanismos de la EP. La proteína codificada por PRKN es una ubiquitina ligasa E3 que juega un papel importante en la mitofagia y la eliminación de las mitocondrias dañadas. La disfunción de este mecanismo eleva los niveles de ROS hasta la citotoxicidad. La Tabla 14 expone un resumen del mecanismo de terapia génica investigado para cada gen, la fase de los ensayos preclínicos o clínicos, y el estado actual de los mismos.⁸⁶

Tabla 14. Terapia génica para GBA, LRRK2 y PRKN. Ensayos preclínicos o clínicos.⁸⁶

Gen	Mecanismo	Agente terapéutico	Registro del ensayo o referencia	Fase	Estado del ensayo
GBA	Sustitución del gen mutado con una copia correcta del gen (<i>wild type copy</i>).	PR001	NC T04127578	1/2a	Estudio de la actividad enzimática. Posible respuesta inmune severa.
LRRK2	Oligonucleótidos sin sentido (inhiben la transcripción).	BIIB094	NCT03976349	1	Reclutamiento de pacientes con y sin variantes genéticas de la EP.
	Oligonucleótidos sin sentido (inducen el salto del exón 41).	ASO 41- 1	Korecka et al. (2020).	Preclínica	Disminución de la fosforilación de Rab10 y normalización de la autofagia en ratones transgénicos. Normalización de la mitofagia y de la homeóstasis del Ca ²⁺ en el Retículo endoplasmático <i>in vitro</i> .
PRKN	Activadores de Parkin; disruptores del mecanismo autoinhibitorio.	WO-2018/023029 WO-2010/011839	Kluge et al. (2018).	Preclínica	Datos limitados a ensayos <i>in vitro</i> .

- Inmunoterapia y vacuna

Los investigadores han desarrollado la inmunoterapia pasiva y activa hacia la α -sinucleína como inmunógeno diana. Actualmente existen diversos ensayos preclínicos y clínicos, la Tabla 15 expone los ensayos clínicos vigentes.⁸⁷

Tabla 15. Inmunoterapia dirigida a la α -sinucleína. Ensayos clínicos vigentes.⁸⁷

Tipo de inmunidad	Compuesto	Vía de administración	Mecanismo	Resultados	Referencia
Activa	PD01A/AFFiRiS	Inyección subcutánea	Mimifica el C-terminal de la α -sinucleína. Actúa como epítipo de células B.	Finalizado, seguro y tolerado.	Volc et al. (2020).
Activa	PD03A/AFFiRiS	Inyección subcutánea	Mimifica el C-terminal de la α -sinucleína. Actúa como epítipo de células B.	Finalizado, seguro y tolerado.	Poewe et al. (2021).
Pasiva	PRX002/RG7935 (Prasinezumab)/Prothena Biosciences Limited	Intravenosa	Se une al extremo C-terminal de la α -sinucleína y bloquea su transmisión tipo prion.	Finalizado, seguro y bien tolerado. Está en Fase II.	Jankovic et al. (2018).
Pasiva	BIIB054 (Cinpanemab)/ Biogen	Intravenosa	Actúa sobre los agregados de α -sinucleína.	Completado. Fase II terminada.	Brys et al. (2019).
Pasiva	MEDI1341/Astra Zeneca	Intravenosa	Actúa sobre los agregados y el monómero de α -sinucleína.	Está en Fase I	Schofield et al. (2019).
Activa	UB-312	Inyección intramuscular	Actúa sobre los agregados de α -sinucleína.	Está en Fase I	Nimmo et al. (2020).

- Nanotecnología y nanovehículos

Diversas investigaciones sobre el Parkinson han empleado disímiles nanovehículos para la liberación controlada de los fármacos en el cerebro, pueden citarse: las micelas poliméricas, las nanopartículas, nanoemulsión, nanosuspensión (partículas muy finas o cristales del fármaco), dendrímeros, partículas lipídicas sólidas, nanotubos de carbón (hoja de grafito enrollada en forma cilíndrica, sobre los 100nm), liposomas flexibles (transferosomas), inmunoliposomas (conjugados con anticuerpos) y vectores virales. La Figura 33 muestra algunos de estos *nanocarriers* empleados para el estudio de la EP.⁸⁸

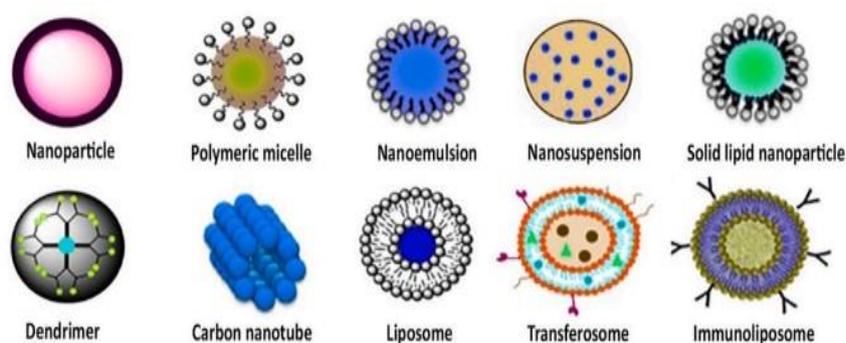


Figura 33. Varios Nanovehículos o *nanocarriers* empleados en la investigación del Parkinson. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo (sentido manecillas del reloj): nanopartícula, micela polimérica, nanoemulsión, nanosuspensión, partícula lipídica sólida, dendrímero, nanotubos de carbón, liposoma, transferosoma e inmunoliposoma.⁸⁸

5. Conclusiones

El Alzheimer y el Parkinson son dos enfermedades con una etiopatogenia compleja, de origen multifactorial que involucra factores endógenos, ambientales y/o la interacción de ambos. El tratamiento farmacológico actual para estas neuropatías es sintomático, con problemas de biodisponibilidad, interacciones cruzadas y efectos adversos. Se impone la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y con ello, de fármacos más eficientes; capaces de curar, evitar totalmente la progresión de la neurodegeneración y/o revertir dichas patologías.

Los agentes *multitarget* ofrecen la posibilidad de contrarrestar varios mecanismos desencadenantes de estos padecimientos con una única molécula, en una única formulación farmacéutica. Es eficaz a nivel biológico y productivo, también propicia disminuir el número de medicamentos totales a ingerir por el paciente en su rutina. Los nanovehículos son otra herramienta potente, facilitan dirigir el fármaco hacia el cerebro protegiendo las propiedades del elemento bioactivo, aumentan su biodisponibilidad, su liberación controlada en el tiempo, la permeabilidad; todo lo cual puede redundar a su vez, en mayores concentraciones efectivas en el tejido diana y la disminución de la dosis, de la frecuencia de administración, la acción

cruzada con otras sustancias bioactivas y los efectos adversos. La nanotecnología se complementa perfectamente además con los compuestos terapéuticos multidiana (menor ingesta de medicamentos totales, menor dosis y/o menores frecuencias de administración).

La terapia génica (evitar la expresión de fenotipos aberrantes amiloides) y la inmunoterapia (tanto pasiva como activa), emergen como metodologías que buscan combatir estas afecciones del SNC en su origen; el cual estriba en la formación de agregados amiloides producto de la pérdida conformacional de proteínas con un comportamiento autorreplicante, tipo prion (péptidos A β , proteína tau y α -sinucleína). Es una esperanza prometedora, sin abandonar el intentar comprender del todo cada mecanismo implicado en la manifestación patológica de la EA y la EP, así como mejorar la eficacia de las terapias paliativas que hoy se tienen a nuestro alcance.

6. Bibliografía

¹ Yiannopoulou, K. G.; Papageorgiou, S. G. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J. Cent. Nerv. Syst.* **2020**, 12, 1–12.

² Villarejo Galendea, A.; Eimil Ortiz, M.; Llamas Velasco, S.; Llanero Luquec, M.; López de Silanes de Miguel, C.; Prieto Jurczynska, C. Informe de la Fundación del Cerebro. Impacto social de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Rev Neurol.* **2021**, 36(1), 39–49.

³ Olazarán-Rodríguez, J.; Agüera-Ortiz, L. F.; Muñiz-Schwochert, R. Síntomas psicológicos y conductuales de la demencia: prevención, diagnóstico y tratamiento. *Rev Neurol.* **2012**, 55(10), 598–608.

⁴ L Johnson, J.; A Johnson, L. Homeostasis of Lipid Metabolism in Disorders of the Brain; Elsevier, **2022**, 378–380.

⁵ Pare´s-Badell, O.; Barbaglia, G.; Jerinic, P.; Gustavsson, A.; Salvador-Carulla, L.; Alonso, J. Cost of Disorders of the Brain in Spain. *PLoS ONE.* **2014**, 9(8), 1–10.

⁶ Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica, 12^a ed.; Elsevier España, S.L.: Barcelona, **2011**, 728.

⁷ Petkova, A.T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R. A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci.* **2002**, 99(26), 16742–16747.

⁸ Salahuddin, P.; Tamkeen Fatima, M.; Uversky, V. N.; Hasan Khan, R.; Islam, Z.; Furkan, M. The role of amyloids in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 190, 44–55.

⁹ Hsu, S.; Pimenova, A. A.; Hayes, K.; Villa, J. A.; Rosene, M. J.; Jere, M.; Goate, A. M.; Karch, C. M. Systematic validation of variants of unknown significance in APP, PSEN1 and PSEN2. *Neurobiol. Dis.* **2020**, 139, 1–9.

¹⁰ Hsu, S.; Gordon, B. A.; Hornbeck, R.; Norton, J. B.; Levitch, D.; Loudon, A.; Ziegemeier, E.; Laforce, R. Jr.; Chhatwal, J.; Day, G. S.; McDade, E.; Morris, J. C.; Fagan, A. M.; Benzinger, T. L. S.; Goate, A. M.; Cruchaga C.; Bateman, R. J.; Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN); Karch, C. M. Discovery and validation of autosomal dominant Alzheimer's disease mutations. *Alzheimer's res. & ther.* **2018**, 1–8.

-
- ¹¹ Rosales-Reynoso, M.A.; Ochoa-Hernández, A.B.; Juárez-Vázquez, C.I.; Barros-Núñez, P. Mecanismos epigenéticos en el desarrollo de la memoria y su implicación en algunas enfermedades neurológicas. *Rev Neurol.* **2016**, 31(9), 628–638.
- ¹² Wanga, H.; Yangb, J.; Schneider, J. A.; De Jager, P. L.; Bennett, D. A.; Zhanga, H. Genome-wide interaction analysis of pathological hallmarks in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* **2020**, 93, 61–68.
- ¹³ Paliwal, D.; McInerney, T.; Pa, J.; Swerdlow, R. H.; Eastal, S.; Andrews, S. J.; for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Mitochondrial pathway polygenic risk scores are associated with Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging.* **2021**, 1–10.
- ¹⁴ Antonyová V.; Kejíka, Z.; Brogyányi, T.; Kaplánek, R.; Pajková, M.; Talianová, V.; Hromádka, R.; Masaříka, M.; Sýkora, D.; Mikšátková, L.; Martásek, P.; Jakubek, M. Role of mtDNA disturbances in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's disease. *DNA Repair (Amst.).* **2020**, 91–92, 1–13.
- ¹⁵ Bello-Medina, P.C.; González-Franco, D.A.; Vargas-Rodríguez, I.; Díaz-Cintra, S. Oxidative stress, the immune response, synaptic plasticity, and cognition in transgenic models of Alzheimer disease. *Rev Neurol.* **2019**, 1–9.
- ¹⁶ Fasae, K. D.; Abolaji, A. O.; Faloye, T. R.; Odunsi, A. Y.; Oyetayo, B. O.; Enya, J. I.; Rotimi, J. A.; Akinyemi, R. O.; Whitworth, A. J.; Aschner, M. Metallobiology and therapeutic chelation of biometals (copper, zinc and iron) in Alzheimer's disease: Limitations, and current and future perspectives. *J Trace Elem Med Biol.* **2021**, 67, 1–21.
- ¹⁷ Coca, J. R.; Erana, H.; Castilla, J. Biosemiotics comprehension of PrP code and prion disease. *BioSystems.* **2021**, 210, 2–7.
- ¹⁸ Jayaram, S.; Thaggikuppe Krishnamurthy, P. Role of microgliosis, oxidative stress and associated neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease: The therapeutic role of Nrf2 activators. *Neurochem. Int.* **2021**, 145, 2–13.
- ¹⁹ Wang, Q.; Yao, H.; Liu, W.; Ya, B.; Cheng, H.; Xing, Z.; Wu, Y. Microglia Polarization in Alzheimer's Disease: Mechanisms and a Potential Therapeutic Target. *Front. Aging Neurosci.* **2021**, 13, 1–10.
- ²⁰ Zhang, G.; Wang, Z.; Hu, H.; Zhao, M.; Sun, L. Microglia in Alzheimer's Disease: A Target for Therapeutic Intervention. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, 15, 1–18.
- ²¹ Campdelacreu, J. Parkinson's disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurologia.* **2014**, 29(9), 541–549.
- ²² López Locanto, O. Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Arch Med Interna.* **2015**, 37(2), 61–67.
- ²³ Alam, S.; Skye Lingenfelter, K.; Bender, A. M.; Lindsley, C. W. Classics in Chemical Neuroscience: Memantine. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, 8(9), 1823–1829.
- ²⁴ Mousailidis, G.; Bhan-Kotwal, S.; Lazzari C.; Shoka, A. Memantine-induced bradycardia – a rare adverse reaction. *Prog. Neurol. Psychiatry.* **2018**, 22, 15–18.
- ²⁵ Day, J. O.; Mullin, S. The Genetics of Parkinson's Disease and Implications for Clinical Practice. *Genes.* **2021**, 12, 1–23.
- ²⁶ Sanchiz-Calvo, M.; Bentea, E.; Baekelandt, V. Rodent models based on endolysosomal genes involved in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2022**, 72, 55–62.
- ²⁷ Srinivasan, E.; Chandrasekhar, G.; Chandrasekar, P.; Anbarasu, K.; Vickram, A. S.; Karunakaran, R.; Rajasekaran, R.; Sri Kumar, P. S. Alpha-Synuclein Aggregation in Parkinson's disease. *Front. Med.* **2021**, 8, 1–14.

-
- ²⁸ Elisa Gomez-Inhiesto; María Teresa Acaiturri-Ayesta; Iker Ustarroz-Aguirre; Diana Camahuali; Maider Urtaran-Laresgoiti; Marisol Basabe-Aldecoa; Roberto Nuño-Solinís; Elena Urizar. Direct Cost of Parkinson's Disease: A Real-World Data Study of Second-Line Therapies. *Parkinson Dis.* **2020**, 1–6.
- ²⁹ Tsiang, J. T. H.; Woo, B. K. P. Diagnosis and Management in Parkinson's Disease. The stigma of Parkinson's disease: development and implications; *Elsevier Inc.* **2020**, 283–294.
- ³⁰ Hoogland, J.; Post, B.; de Bie, R. M. A. Overall and Disease Related Mortality in Parkinson's Disease – a Longitudinal Cohort Study. *J Parkinsons Dis.* **2019**, 9(4), 767–774.
- ³¹ García-Ramos, R.; López Valdés, E.; Ballesteros, L.; Jesús, S.; Mir, P. The social impact of Parkinson's disease in Spain: Report by the Spanish Foundation for the Brain. *Rev Neurol.* **2016**, 31(6), 401–413.
- ³² Tuttle, M. D.; Comellas, G.; Nieuwkoop, A. J.; Covell, D. J.; Berthold, D. A.; Kloepper, K. D.; Courtney, J. M.; Kim, J. K.; Barclay, A. M.; Kendall, A.; Wan, W.; Stubbs, G.; Schwieters, C. D.; Lee, V. M. Y.; George, J. M.; Rienstra, C. M. Solid-State NMR Structure of a Pathogenic Fibril of Full-Length Human α -Synuclein. *Nat Struct Mol Biol.* **2016**, 23(5), 409–415.
- ³³ Raj, K.; Kaur, P.; Gupta, G.D.; Singh, S. Metals associated neurodegeneration in Parkinson's disease: Insight to physiological, pathological mechanisms and management. *Neurosci. Lett.* **2021**, 753, 1-9.
- ³⁴ Nelson, D.L.; Lehninger, M.M.C. Principios de Bioquímica, 5ta ed.; Ediciones Omega, S.A.: Barcelona, **2009**, 148.
- ³⁵ Surewicz, W.K.; Apostol, M.I. Prion Protein and Its Conformational Conversion: A Structural Perspective. *Top Curr Chem.* **2011**, 305, 135–167.
- ³⁶ Sun, C.; Armstrong, M. J. Treatment of Parkinson's Disease with Cognitive Impairment: Current Approaches and Future Directions. *Behav. Sci.* **2021**, 11, 2–21.
- ³⁷ Wua, J.; Pistolozzic, M.; Liud, S.; Tand, W. Design, synthesis and biological evaluation of novel carbamates as potential inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, 28, 1–8.
- ³⁸ Dembitsky, V. M.; Dzhemileva, L.; Glorizova, T.; D'yakonov, V. Natural and synthetic drugs used for the treatment of the dementia. *Biochem. Biophys.* **2020**, 524, 772–783.
- ³⁹ Williams, B. R.; Arlette Nazarians, A.; Giii, M.A. A Review of Rivastigmine: A Reversible Cholinesterase Inhibitor. *Clin Ther.* **2003**, 25, 1634–1653.
- ⁴⁰ Kandiah, N.; Pai, M-C.; Senanarong, V.; Looi, I.; Ampil, E.; Park, K. W.; Karanam, A. K.; Christopher, S. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clin Interv Aging.* **2017**, 12, 697–707.
- ⁴¹ Spencer, C. M.; Noble, S. Rivastigmine A Review of its Use in Alzheimer's Disease. *Drugs Aging.* **1998**, 13 (5), 391–411.
- ⁴² Colovi, M. B.; Krstic, D. Z.; Lazarevic-Pasti, T. D.; Bondzic, A. M.; Vasic, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol.* **2013**, 11, 315–335.
- ⁴³ Avendaño, C. Introducción a la Química Farmacéutica, 2nd ed.; Madrid, **2001**; pp 275–278.
- ⁴⁴ Ghosh, A.k.; Brindisi, M. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 2895–2940.
- ⁴⁵ Li, S.; Li, A.J.; Travers, J.; Xu, T.; Sakamuru, S.; Klumpp-Thomas, C.; Huang, R.; Xia, M. Identification of Compounds for Butyrylcholinesterase Inhibition. *SLAS Discov.* **2021**, Vol. 26(10) 1355–1364.

- ⁴⁶ Khoirunisa, V.; Rusydi, F.; Kasai, H.; Gandaryus, A. G.; Dipojono, H. K. A first principle study on the interaction between acetylcholinesterase and acetylcholine, and also rivastigmine in alzheimer's disease case. *J Phys Conf Ser.* **2016**, 739, 1–6.
- ⁴⁷ Ray, B.; Maloney, B.; Kumar Sambamurti, K.; Karnati, H. K.; Nelson, P. T.; Nigel H. Greig, N. H.; Lahiri, D. K. Rivastigmine modifies the α -secretase pathway and potentially early Alzheimer's disease. *Transl. Psychiatry.* **2020**, 1–17.
- ⁴⁸ Bacalhau, P.; San Juan, A. A.; Goth, A.; Caldeira, A. T.; Martins, R.; Burke, A. J. Insights into (S)-rivastigmine inhibition of butyrylcholinesterase (BuChE): Molecular docking and saturation transfer difference NMR (STD-NMR). *Bioorg. Chem.* **2016**, 67, 105–109.
- ⁴⁹ Gaitonde, A.; Mangle, M.; Pawar, S. Novel Processes for the Preparation of Aminoalkyl Phenylcarbamates. International Patent WO 2005/061446, 7 July **2005**.
- ⁵⁰ Boezio, A. A.; Pytkowicz, J.; Côté, A.; Charette, A. B. Asymmetric, catalytic synthesis of r-chiral amines using a novel bis(phosphine) monoxide chiral ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14260–14261.
- ⁵¹ Shi, S.L.; Buchwald, S. L. Copper-catalysed selective hydroamination reactions of alkynes. *Nat. Chem.* **2015**, 7, 38–44.
- ⁵² Wakchaure, V. N.; Kaib, P. S. J.; Leutzsch, M.; List, B. Disulfonimide-catalyzed asymmetric reduction of N-alkyl imines. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, 54, 11852–11856.
- ⁵³ Hu, M.; Zhang, F. L.; Xie, M. H. Novel convenient synthesis of rivastigmine. *Synth. Commun.* **2009**, 39, 1527–1533.
- ⁵⁴ Han, K.; Kim, C.; Park, J.; Kim, M. J. Chemoenzymatic Synthesis of Rivastigmine via Dynamic Kynetic Resolution as a Key Step. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3105–3108.
- ⁵⁵ Mangas-Sánchez, J.; Rodríguez-Mata, M.; Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. Chemoenzymatic synthesis of rivastigmine based on lipase-catalyzed processes. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 5304–5310.
- ⁵⁶ Fuchs, M.; Koszelewski, D.; Tauber, K.; Sattler, J.; Banko, W.; Holzer, A. K.; Pickl, M.; Kroutil, W.; Faber, K. Improved chemoenzymatic asymmetric synthesis of (S)-rivastigmine. *Tetrahedron.* **2012**, 68, 7691–7694.
- ⁵⁷ Fuchs, M.; Koszelewski, D.; Tauber, K.; Kroutil, W.; Faber, K. Chemoenzymatic asymmetric total synthesis of (S)-rivastigmine using ω -transaminases. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5500–5502.
- ⁵⁸ Yan, P. C.; Zhu, G. L.; Xie, J. H.; Zhang, X. D.; Zhou, Q. L.; Li, Y. Q.; Shen, W. H.; Che, D. Q. Industrial scale-up of enantioselective hydrogenation for the asymmetric synthesis of rivastigmine. *Org. Process.* **2013**, 17, 307–312.
- ⁵⁹ Gao, G.; Du, S.; Yang, Y.; Lei, X.; Huang, H.; Chang, M. Direct Asymmetric Reductive Amination for the Synthesis of (S)-Rivastigmine. *Molecules.* **2018**, 23, 1–8.
- ⁶⁰ Fallah, A.; Mohanazadeh, F.; Safavi, M. Design, synthesis, and in vitro evaluation of novel 1,3,4-oxadiazolecarbamothioate derivatives of Rivastigmine as selective inhibitors of BuChE. *Med Chem Res.* **2020**, 29, 341–355.
- ⁶¹ Bolognesi, M. L.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Andrisano, V.; Rosini, M.; Minarini, A.; Melchiorre, C. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Conformationally Restricted Rivastigmine Analogues. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5945–5952.
- ⁶² Vitale, P.; Perna, F. M.; Agrimi, G.; Pisano, I.; Mirizzi, F.; Capobianco, R. V.; Capriati, V. Whole-Cell Biocatalyst for Chemoenzymatic Total Synthesis of Rivastigmine. *Catalysts.* **2018**, 8, 1–12.

- ⁶³ Hana, S.; Josef, H.; Stanislav, S. A Method of Production of (-)-(S)-3-[1-(Dimethylamino)ethyl]phenyl-N-ethyl-N-methylcarbamate. Patent Application No. WO2004037771 A1, 6 May **2004**.
- ⁶⁴ Rao, R.; Shewalkar, M. P.; Nandipati, R.; Yadav, J. S.; Khagga, M.; Shinde, D. B. General Strategy for Large-Scale Synthesis of (+)-Rivastigmine and (+)-NPS R-568. *Synth. Commun.* **2012**, *42*, 589–598.
- ⁶⁵ Reddy, V. V.; Rao, M. V. N. B.; Ganesh, V.; Kumar, A. V.; Praveen, C.; Mukkanti, K.; Reddy, G. M.; Reddy, G. M. An Improved Process for the Production of Rivastigmine Tartrate, a Cholinesterase Inhibitor. *Lett. Org. Chem.* **2010**, *7*, 149–154.
- ⁶⁶ Sethi, M.K.; Bhandya, S. R.; Maddur, N.; Shukla, R.; Kumar, A.; Mittapalli, V. S. N. J. Asymmetric synthesis of an enantiomerically pure rivastigmine. *Tetrahedron Asymmetry.* **2013**, *24*, 374–379.
- ⁶⁷ Sethi, M. K.; Bhandya, S. R.; Kumar, A.; Maddur, N.; Shukla, R.; Mittapalli, V. S. N. J. Chemo-enzymatic synthesis of optically pure rivastigmine intermediate using alcohol dehydrogenase from baker's yeast. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, *91*, 87–92.
- ⁶⁸ Nagai, T.; Sakurai, S.; Natori, N.; Hataoka, M.; Kinoshita, T.; Inoue, H.; Hanaya, K.; Shoji, M.; Sugai, T. Synthesis of enantiomerically enriched drug precursors and an insect pheromone via reduction of ketones using commercially available carbonyl reductase screening kit "Chiralscreen® OH". *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1304–1313.
- ⁶⁹ Yan, P.-C.; Zhu, G. L.; Xie, J. H.; Zhang, X. D.; Zhou, Q. L.; Li, Y. Q.; Shen, W. H.; Che, D. Q. Industrial Scal-Up of Enantioselective Hydrogenation for the Asymmetric Synthesis of Rivastigmine. *Org. Proc. Dev.* **2013**, *17*, 307–312.
- ⁷⁰ Nesi, G.; Chen, Q.; Sestito, S.; Digiaco, M.; Yang, X.; Wang, S.; Pi, R.; Rapposelli, S. Nature-based molecules combined with rivastigmine: A symbiotic approach for the synthesis of new agents against Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *141*, 232–239.
- ⁷¹ Rada, M.; Ramírez, J. C.; Cardona, W.; Yepes, A. F. Híbridos moleculares inspirados en rivastigmina y memantina como potenciales candidatos multitarget contra la enfermedad de Alzheimer: diseño, síntesis y estudios computacionales. LatinXchem 2020, Congreso Latinoamericano de Química en Twitter, septiembre 7, **2020**.
- ⁷² Cunha, S.; Costa, C. P.; Loureiro, J. A.; Alves, J.; Peixoto, A. F.; Forbes, B.; Sousa, J. M.; Catarina Silva, A.C. Double Optimization of Rivastigmine-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Nose-to-Brain Delivery Using the Quality by Design (QbD) Approach: Formulation Variables and Instrumental Parameters. *Pharmaceutics.* **2020**, *12*, 1–25.
- ⁷³ Salatin, S.; Barar, J.; Barzegar, M.; Adibkia, K.; Alami-Milani, M.; Jelvehgari, M. Formulation and Evaluation of Eudragit RL-100 Nanoparticles Loaded In-Situ Forming Gel for Intranasal Delivery of Rivastigmine. *Adv Pharm Bull.* **2020**, *10*(1), 20–29.
- ⁷⁴ Lboutounne, H.; Chaulet, J. F.; Ploton, C.; Falson, F.; Pirot, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(epsilon-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J Control Release.* **2002**, *82*(2-3), 319–34.
- ⁷⁵ Schmolka I. R. Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res.* **1972**, *6*(6), 571–82.
- ⁷⁶ Torabi, S. J.; Mohebbali, A.; Abdouss, M.; Shakiba, M.; Abdouss, H.; Ramakrishna, S.; Teo, Y. S.; Iman Jafari, I.; Ghomi, E.R. Synthesis and characterization of a novel molecularly imprinted polymer for the controlled release of rivastigmine tartrate. *Mater. Sci. Eng. C.* **2021**, *128*, 1–10.
- ⁷⁷ Shi, Y.; Lv, H.; Lu, X.; Huang, Y.; Zhang, Y.; Xue, W. Uniform molecularly imprinted poly(methacrylic acid) nanospheres prepared by precipitation polymerization: the control of

particle features suitable for sustained release of gatifloxacin. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 3889–3898.

⁷⁸ Leo, E.; Cameroni, R.; Forni, F. Dynamic dialysis for the drug release evaluation from dexoribicin-gelatin nanoparticle conjugates. *Int. J. Pharm.* **1999**, 180, 23–30.

⁷⁹ Zúñiga T.; Yescas P.; Fricke, I.; González, M.; Ortega, A.; López, M. Estudios farmacogenéticos en la enfermedad de Alzheimer. *Neurología.* **2018**, 1233, 1–17.

⁸⁰ Plotkina, S. S.; Cashman, N. R. Passive immunotherapies targeting A β and tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **2020**, 144, 1–26.

⁸¹ Godyn, J.; Zaręba, P.; Łazewska, D.; Stary, D.; Reiner-Link, D.; Frank, A.; Latacz, G.; Mogilski, S.; Kaleta, M.; Doroz-Płonka, A.; Lubelska, A.; Honkisz-Orzechowska, E.; Olejarczyk-Maciej, A.; Handzlik, J.; Stark, H.; Kieć-Kononowicz, K.; Malawska, B.; Bajda, M. Cyanobiphenyls: Novel H3 receptor ligands with cholinesterase and MAO B inhibitory activity as multitarget compounds for potential treatment of Alzheimer's disease. *Inorganic Chemistry. Bioorg. Chem.* **2021**, 114, 1–17.

⁸² Nadeem, M. S.; Khan, J. A.; Rashid, U. Fluoxetine and sertraline based multitarget inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidase-A/B for the treatment of Alzheimer's disease: Synthesis, pharmacology and molecular modeling studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 193, 19–26.

⁸³ Agrawal, M.; Prathyusha, E.; Ahmed, H.; Dubey, S. K.; Kesharwani, P.; Singhvi, G.; Naidu, V. G. M.; Alexander, A. Biomaterials in treatment of Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **2021**, 145, 1–12.

⁸⁴ Wen, M. M.; El-Salamouni, N. S.; El-Refaie, W. M.; Hazzah, H. A.; Ali, M. M.; Tosi, G.; Farid, R. M.; Blanco-Prieto, M. J.; Billa, N.; Hanafy, A. S. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges. *J Control Release.* **2017**, 245, 95–107.

⁸⁵ Steed, W. J.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Chichester, U.K., **2009**; pp 862 y 921.

⁸⁶ Senkevich, K.; Rudakou, U.; Gan-Or, Z. New therapeutic approaches to Parkinson's disease targeting GBA, LRRK2 and Parkin. *Neuropharmacology.* **2022**, 202, 1–14.

⁸⁷ Sheila M. Fleming, S. M.; Davis, A.; Simons, E. Targeting alpha-synuclein via the immune system in Parkinson's disease: Current vaccine therapies. *Neuropharmacology.* **2022**, 202, 1–7.

⁸⁸ Shankar, J.; Geetha, K.M.; Wilson, B. Potential applications of nanomedicine for treating Parkinson's disease. *J Drug Deliv Sci Technol.* **2021**, 66, 1–21.