



Isoflavonas preniladas y su relación con enfermedades degenerativas

Patricia Ibarra-Torres^{1,2}, Jazmín Ruíz-García¹, Rubí Galindo-Ferrer³, Miguel Ángel Leán-Hernández¹, Luis Mario Ayala-Guerrero¹, Aarón Mendieta-Moctezuma^{1*}

¹ Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla, Km 1.5, Tepetitla de Lardizábal, 90700, Tlaxcala, México

² Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica de Guanajuato, Av. Universidad Sur 1001, 38496 Cortazar, Guanajuato, México

³ TecNM - Campus Altiplano de Tlaxcala. Km. 7.5 Carretera Federal San Martín Texmelucan-Tlaxcala. San Diego Xocoyucan, 90122, Tlaxcala, México

Correo electrónico: amendietam@ipn.mx



RESUMEN

Las isoflavonas son conocidas como fitoestrógenos y presentan propiedades farmacológicas como cardioprotectores, antidiabéticos, anticancerígenos y neuroprotectores. En la búsqueda de potenciales agentes neuroprotectores, se evaluó una serie de isoflavonas preniladas derivadas de la isoflavona natural formononetina para determinar su actividad inhibidora *in vitro* sobre la enzima acetilcolinesterasa. Los resultados muestran que las isoflavonas presentan moderada a débil actividad siendo la formononetina con mayor efecto inhibitorio ($CI_{50} = 100 \mu M$) con respecto a tacrina ($CI_{50} = 14.79 \mu M$). Esto sugiere que la presencia de un grupo hidroxilo en posición C-7 del núcleo de isoflavona favorece el efecto inhibitorio mientras que, la adición de un grupo prenilo lineal o ciclizado disminuye la actividad. Por tanto, formononetina es un buen candidato para el diseño de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa relacionados al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Palabras clave: isoflavonas preniladas, formononetina, acetilcolinesterasa, enfermedades degenerativas

ABSTRACT

Isoflavones are known phytoestrogens and have pharmacological properties such as cardioprotective, antidiabetic, anticancer, and neuroprotective. In the research for potential neuroprotective agents, a series of prenylated isoflavones derived from the natural isoflavone formononetin were evaluated for their *in vitro* inhibitory activity against the enzyme acetylcholinesterase. The results displayed that isoflavones showed moderate to weak activity where formononetin had the greatest inhibitory effect ($CI_{50} = 100 \mu M$) concerning tacrine ($CI_{50} = 14.79 \mu M$). This suggests that the presence of a hydroxyl group at C-7 position of the isoflavone core favors the inhibitory effect, while the addition of a linear or cyclized prenyl group decreases the activity. Therefore, formononetin is a good candidate for designing new acetylcholinesterase inhibitors related to treating neurodegenerative diseases.

Keywords: prenylated isoflavones, formononetin, acetylcholinesterase, Degenerative diseases

Introducción

Las enfermedades degenerativas (ED) afectan la función, estructura de los tejidos u órganos en progresión lenta y de larga duración, como es el caso de la osteoartritis, osteoporosis y la enfermedad de Alzheimer [Dos Santos et al., 2018]. Esta última, causa deterioro de las funciones cognitivas, con tratamientos costosos y mortales para las personas que la padecen. La disfunción y muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer (EA) está asociada a placas de β amiloide (β A) y marañas neurofibrilares (MNF), formadas por agregados del péptido β A (P β A) y la proteína tau. Estas estructuras se encuentran en regiones específicas del cerebro asociadas a funciones cognitivas como hipocampo y corteza entorrinal [López-Camacho et al., 2017].

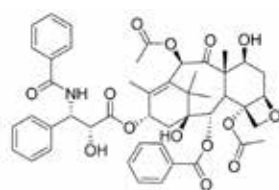
es una enzima responsable de la terminación de la transmisión de señales en el sistema colinérgico y su sustrato, la acetilcolina [ACh] es un neurotransmisor de este sistema, su efecto es predominante sobre las neuronas motoras implicadas en la formación de la memoria. Inhibir la actividad de AChE permite tratar diversos trastornos de las neuronas motoras relacionadas con la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, estos inhibidores de la AChE [tacrina, galantamina, donepezilo, rivastigmina] presentan limitaciones en términos de eficacia, rango terapéutico y efectos adversos [Khan et al., 2018; Maramai et al., 2020].

Por otra parte, las plantas medicinales representan una fuente natural importante en la medicina tradicional y en el desarrollo de fármacos ya que se han aislado metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas como son alcaloides, glicósidos, saponinas, terpenoides, fenoles y flavonoides [anticolinérgicos, antiinflamatorios, anticancerígenos, antioxidantes, sedantes y antidiabéticos, antimicrobianos, antisépticos, antialérgicos y antivirales] [Figura 1] [Behloul y Wu, 2013; Das y Gezici, 2018; Khan et al., 2018; Velu et al., 2018; Barreca et al., 2020; Chávez-Pérez et al., 2021].

Figura 1. Productos naturales empleados como fármacos.



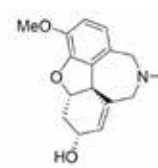
Taxus brevifolia



Paclitaxel (Anticancerígeno)



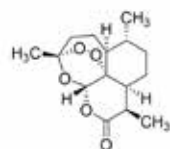
Galanthus nivalis



Galantamina (Tratamiento para Alzheimer)



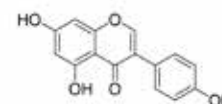
Artemisia annua



Artemisina (Antimálarico)



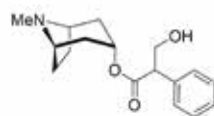
Genista tinctoria



Genisteína (Antidiabético) (anti-obesidad)



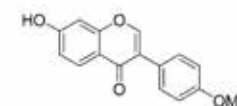
Atropa belladonna



Atropina (Antiespasmódico)



Trifolium pratense



Formononetina (Anticancerígeno) (Neuroprotector)

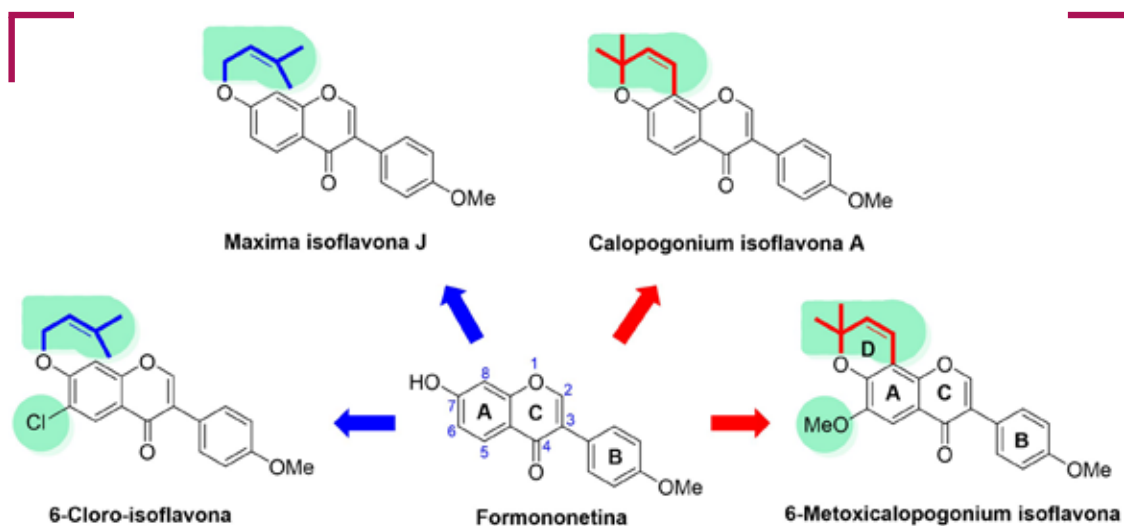


Figura 2. Isoflavonas preniladas como potenciales inhibidores de acetilcolinesterasa.

De los metabolitos secundarios, los de tipo alcaloide han sido la base para el desarrollo de fármacos dirigidos al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, las isoflavonas naturales y sintéticas han mostrado potencial efecto neuroprotector [Enamorado-Rodríguez, 2017; Ribaudo et al., 2019; Wang et al., 2019]. Las isoflavonas son denominadas fitoestrógenos debido a su estructura similar a los estrógenos mostrándose como cardioprotectores, antioxidantes, antidiabéticos, anticancerígenos y neuroprotectores [Tay et al., 2019; Karmakar et al., 2019]. Formononetina, es una hidroxi-isoflavona con propiedades anticancerígenas y neuroprotectoras [Tian et al., 2022; Singh et al., 2023] además, ha sido intermediario en la obtención de derivados con potente actividad antidiabética [inhibición en α -glucosidasa y α -amilasa] y tratamiento para la enfermedad de Alzheimer [inhibición de acetilcolinesterasa] [Wang et al., 2019]. Considerando que las isoflavonas son una alternativa importante en el diseño y desarrollo de nuevos compuestos con actividad neuroprotectora, el presente trabajo evalúa *in vitro* el potencial inhibitorio sobre acetilcolinesterasa de isoflavonas funcionalizadas derivadas de la isoflavona natural formononetina [Figura 2].



2

Materiales y métodos

2.1 Materiales

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. LLC (st Louis, MO): acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus*, acetilcolina, reactivo de Ellman, tacrina, dimetilsulfóxido y fosfato de sodio monobásico. Las isoflavonas preniladas (calopogonium isoflavona A, 6-metoxicalopogonium isoflavona y maxima isoflavona J) fueron sintetizadas previamente como se describe en la literatura (Hernández-Gutiérrez et al., 2024).



2.2 Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa

La actividad inhibitoria de AChE se determinó empleando el método colorimétrico de Ellman con algunas modificaciones (Ellman et al., 1961). La mezcla de reacción con 275 μL de búfer de fosfatos (0.1 M, pH 8.0), 50 μL del inhibidor (en concentraciones de 0.1 a 4.0 mM), 50 μL de sustrato acetilcolina (0.5 mM) y 25 μL de enzima AChE [5 U/mL] se incubó a 30 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 100 μL de reactivo de Ellman [2.52 mM]. La absorbancia de la mezcla resultante fue registrada a 412 nm en un lector de microplacas de 96 pocillos [Multiskan™ GO, Thermo Fisher Scientific]. Se prepararon dos mezclas (control y blanco) empleando el disolvente DMSO y búfer de fosfatos en lugar del inhibidor. El porcentaje de inhibición de la actividad de AChE [%In] se calculó utilizando la ecuación:

$$\%In = \left\{ \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right\} \times 100\%$$

donde $A_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra que contiene el compuesto isoflavona y $A_{control}$ es la absorbancia de la mezcla de control. Todos los ensayos se realizaron por triplicado como mínimo. Se determinó la concentración de isoflavona en la mezcla necesaria para una inhibición del 50% de la actividad de AChE.

3

Resultados y discusión

3.1 Inhibición de acetilcolinesterasa

El potencial neuroprotector de las isoflavonas naturales se muestra en la Tabla 1, y se reportó mediante la inhibición de la enzima AChE obteniendo su valor de CI_{50} empleando concentraciones de 0.1 mM – 4.0 mM de cada compuesto. Los resultados obtenidos se compararon con el control positivo tacrina (fármaco inhibidor de AChE) y se analizaron estadísticamente con el software minitab en su versión 19 y los valores se presentan como la media desviación estándar basada en cuatro replicas.

Las isoflavonas mostraron de moderada a débil inhibición con CI_{50} en un intervalo de 100 a 3000 μ M en comparación con tacrina ($CI_{50} = 14.97 \mu$ M). Inicialmente, la formononetina mostró moderada inhibición con una $CI_{50} = 100 \mu$ M. La presencia del grupo prenilo ciclado que une las posiciones C-7 y C-8 del núcleo de isoflavona [calopogonium isoflavona A] resultó en la pérdida del efecto inhibitorio. Por su parte, la presencia de un grupo metoxilo en la posición C-6 [6-metoxicalopogonium isoflavona] no mostró efecto inhibitorio significativo. Para la isoflavona con el grupo prenilo lineal [máxima isoflavona J] la actividad observada es débil ($CI_{50} = 1000 \mu$ M). De manera

similar, 6-cloro-isoflavona con un átomo de cloro en la posición C-6 no favoreció el efecto biológico.

Estudios recientes han reportado a isoflavonas y piranoisoflavonas como potenciales inhibidores naturales [Venzke et al. 2013; Wu et al., 2019]. Derivados de piranosioflavonas con grupos electrodonadores (OH, OMe) y halógenos en el anillo B no favorecen la actividad. Por su parte la adición de grupos carbamatos, la actividad inhibitoria es favorecida [Wu et al., 2019]. Además, la introducción de alquilaminas en la posición C-7 del núcleo isoflavona incrementó significativamente la inhibición inhibitoria sobre acetilcolinesterasa [Wang et al., 2019].

Por tanto, dentro del núcleo de isoflavona, la presencia de grupos electrodonadores en la posición C-7 contribuyen con la actividad inhibitoria, con respecto a la presencia de un grupo prenilo lineal o ciclizado. Además, el grupo metoxilo en la posición C-6 favorece la inhibición. Por tanto, la isoflavona formononetina es un buen candidato para el diseño de nuevos compuestos con propiedades neuroprotectoras.

Table 1: Efecto inhibitorio de isoflavonas preniladas sobre acetilcolinesterasa.

Isoflavona	Acetilcolinesterasa $CI_{50} (\mu$ M) [†]
Formononetina	100.0 $\pm$ 0.01
Colopogonium isoflavona A	3000 $\pm$ 0.40
6-metoxicalopogonium isovano	150.0 $\pm$ 1.18
maxima isoflavona J	1000 $\pm$ 1.19
6-cloro-isoflavona	1500 $\pm$ 0.98
tacrina	14.97 $\pm$ 0.03

[†] Los valores están expresados como la media $\pm$ SD. Los valores seguidos de letras iguales en la misma columna no difieren significativamente entre sí (ANOVA, $p < 0.05$, Tukey's Test).

4

Conclusiones

Los derivados de la isoflavona formononetina mostraron un efecto inhibitorio de moderado a débil sobre AChE con respecto al fármaco tacrina, donde el grupo hidroxilo en la posición C-7 del núcleo isoflavona favorece la actividad biológica.

5

Agradecimientos

A la Secretaría de Investigación y Posgrado-IPN [20240224, 20242920] y Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) [CF-2023-I-2072] por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo.



REFERENCIAS

- Barreca M, Spanò V, Montalbano A, Cueto M, Díaz MAR, Deniz I, Erdoğan A, Lukić BL, Moulin C, Taffin-de-Givency E, Spriano F, Perale G, Mehiri M, Rotter A, Thomas PO, Barraja P, Gaudêncio PS, Bertoni F [2020] Marine anticancer drugs agents: An overview with a particular focus on their chemical classes. *Mar. Drugs*. 18:619. <https://doi.org/10.3390/md18120619>
- Chávez-Pérez C, Ceballos-Ramírez A, Suárez-Castro A [2021] Efectos del uso del 17 β -estradiol y la genisteína en la enfermedad de Alzheimer en mujeres con menopausia. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* 56:236-240. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2021.04.005>
- Das K, Gezici S [2018] Secondary plant metabolites, their separation and identification, and role in human disease prevention. *Ann. Phytomed.* 7:13-24. <https://doi.org/10.21276/ap.2018.7.2.3>
- Dos Santos TC, Gomes TM, Pinto B. AS, Camara AL, Paes AMDA [2018] Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy. *Front. Pharmacol.* 9:1192. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01192>
- Ellman GL, Courtney KD, Andres JrV, Featherstone RM [1961] A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95. [https://doi.org/10.1016/0006/2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006/2952(61)90145-9)
- Enamorados-Rodríguez Y, Ilyina A, Silva-Belmares Y, Vargas-Segura AI, Martínez-Hernández JL, Segura CEP [2017] Uso de plantas mexicanas con efecto inhibitorio sobre la enzima acetilcolinesterasa como un posible tratamiento para la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 48:7-16.
- Hernández-Gutiérrez B, Cruz-López MC, Gómez-García O, Becerra-Martínez E, Jiménez-Montejo FE, Mendieta-Moctezuma A [2024] Alpha-glucosidase and Alpha-amylase inhibitors derived from naturally occurring prenylated isoflavones. *J. Mex. Chem. Soc.* 68:156-169. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v68i1.2129>
- López-Camacho PY, Guzmán-Hernández RN, Hernández GVH, Díaz MJE, García-Sierra F, Basurto-Islas G [2017] Investigación y terapias en la enfermedad de Alzheimer basadas en beta amiloide y tau. *Arch. Neurocién.* 22:72-88.
- Karmakar A, Ambure P, Mallick T, Das S, Roy K, Begum NA [2019] Exploration of synthetic antioxidant flavonoid analogs as acetylcholinesterase inhibitors: An approach towards finding their quantitative structure-activity relationship. *Med. Chem. Res.* 28:723-741.
- Khan H, Mayra, Amin S, Kamal MA, Patel S [2018] Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomed. Pharmacother.* 101:860-870. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.007>
- Maramai S, Bencheikroun M, Gabr TM, Yahiaoui S [2020] Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer's disease: Review on emerging target combinations. *BioMed Res. Int.* 2020:5120230. <https://doi.org/10.1155/2020/5120230>
- Ribaudo G, Coghi P, Zanforlin E, Law BYK, Wu YYJ, Han Y, Qiu AC, Qu YQ, Wong VKW [2019] Semi-synthetic isoflavones as BACE-1 inhibitors against Alzheimer's disease. *Bioorg. Chem.* 87:474-483. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.034>
- Singh L, Kaur H, Chandra AG, Bhatti R [2023] Neuroprotective potential of formononetin, a naturally occurring isoflavone phytoestrogen. *Chem. Biol. Drug Des.* 103:e14353. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14353>
- Tay KC, Tan LT, Chan CK, Hong SL, Chan KG, Yap WH, Pusparajah P, Lee LH, Goh BH [2019] Formononetin: A review of its anticancer potentials and mechanisms. *Front. Pharmacol.* 10:820. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00820>
- Tian J, Wang X-Q, Tian Z [2022] Focusing on formononetin: Recent perspective for its neuroprotective potentials. *Front. Pharmacol.* 13:905898. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.905898>
- Velu G, Palanichamy V, Rajan AP [2018] Phytochemical and pharmacological importance of plant secondary metabolites in modern medicine. *Bioorganic phase in natural food: An overview*, 135-156. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74210-6_8
- Venzke D, Carvalho FK, Ruani AP, Oliveira AS, Brighente IMC, Micke GA, Barison A, Pizzolatti MG [2013] PAMPA permeability, acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of pyranoisoflavones from *Polygala molluginifolia* (Polygalaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 24:1991-1997. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130249>
- Wang D, Hu M, Li X, Zhang D, Chen C, Fu J, Shao S, Shi G, Zhou Y, Wu S, Zhang T [2019] Design, synthesis, and evaluation of isoflavones analogs as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 168:207-220. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.053>
- Wu C, Tu Y-b, Li Z, Li Y-f [2019] Highly selective carbamate-based butyrylcholinesterase inhibitors from a naturally occurring pyranoisoflavone. *Bioorg. Chem.* 88:102949. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102949>

