

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**Cribado virtual de metabolitos secundarios presentes en líquenes con una
alta afinidad a la acetilcolinesterasa vinculada con la enfermedad de
Alzheimer**

Tesis presentada por la Bachiller:

Larico Ramirez, Leslie Pamela

ORCID: 0009-0002-1343-154X

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Asesor (a):

Dra. Barazorda Ccahuana, Haruna Luz

ORCID: 0000-0001-8791-0506

Arequipa - Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FARMACIA Y BIOQUIMICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 19 de Agosto del 2025

Dictamen: 010795-C-EPFyB-2025

Visto el borrador del expediente 010795, presentado por:

2018203012 - LARICO RAMIREZ LESLIE PAMELA

Titulado:

**CRIBADO VIRTUAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LÍQUENES CON UNA ALTA
AFINIDAD A LA ACETILCOLINESTERASA VINCULADA CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Titulo Profesional/Titulo de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**29228284 - DAVILA DEL CARPIO GONZALO HERMILIO
DICTAMINADOR**



**29440909 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**



**40617097 - NIETO MONTESINOS RITA MILAGROS
DICTAMINADOR**



Cribado virtual de metabolitos secundarios presentes en líquenes con una alta afinidad a la acetilcolinesterasa vinculada con la enfermedad de Alzheimer

INFORME DE ORIGINALIDAD

21%	14%	12%	8%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María	2%
	Trabajo del estudiante	
2	hdl.handle.net	1%
	Fuente de Internet	
3	www.alzheimeruniversal.eu	1%
	Fuente de Internet	
4	www.coursehero.com	<1%
	Fuente de Internet	
5	www.science.org	<1%
	Fuente de Internet	
6	Amitesh Badkul, Li Xie, Shuo Zhang, Lei Xie. "TrustAffinity: accurate, reliable and scalable out-of-distribution protein-ligand binding affinity prediction using trustworthy deep learning", Cold Spring Harbor Laboratory, 2024	<1%
	Publicación	
7	patents.google.com	<1%
	Fuente de Internet	
8	www.jove.com	<1%
	Fuente de Internet	
9	d3amtssd1tejdt.cloudfront.net	<1%
	Fuente de Internet	
10	docksci.com	<1%
	Fuente de Internet	
11	docplayer.es	<1%
	Fuente de Internet	

DEDICATORIA

A mi familia, por apoyarme incondicionalmente durante toda mi etapa universitaria y por sus palabras de aliento cuando más lo necesitaba. Su amor y apoyo han sido mi mayor fortaleza, recordándome siempre que ellos son el motor y el motivo para superarme.

A mis mejores amigas, por estar siempre conmigo en los momentos difíciles. Su compañía y sus ánimos fueron importantes para seguir adelante y para demostrarme el verdadero valor de la amistad.

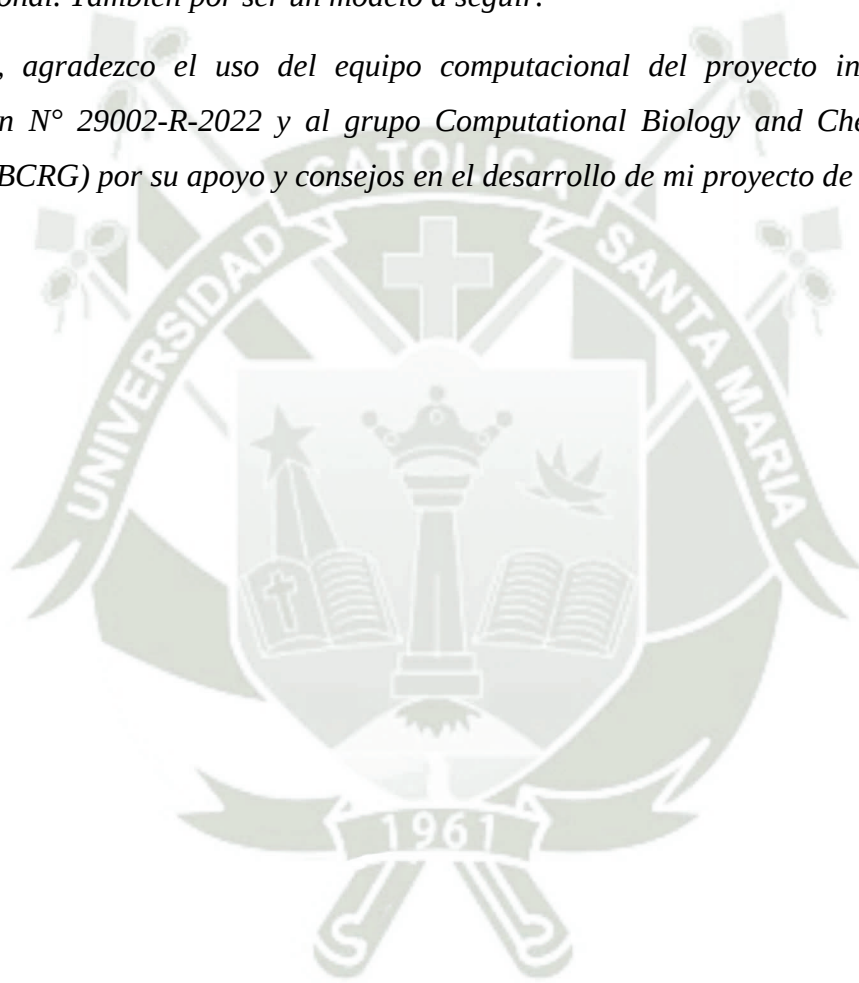


AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Haruna Barazorda, por su orientación y apoyo en el desarrollo de esta tesis. Valoro mucho su paciencia, sus consejos y el tiempo que dedicó para guiarme, lo que me ha permitido adentrarme en un campo que hasta hace poco era nuevo para mí.

A Margot Paco, por su apoyo a lo largo de este proceso. Aprecio profundamente su compañía y sus palabras de ánimo, que no solo me han ayudado en el ámbito académico, sino también en el personal. También por ser un modelo a seguir.

Asimismo, agradezco el uso del equipo computacional del proyecto interno UCSM de Resolución N° 29002-R-2022 y al grupo Computational Biology and Chemistry Research Group (CBCRG) por su apoyo y consejos en el desarrollo de mi proyecto de investigación.



RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo progresivo que afecta funciones cognitivas como la memoria, el lenguaje y el comportamiento. Una de las principales alteraciones observadas en esta enfermedad es la disminución de los niveles de acetilcolina, un neurotransmisor esencial en la transmisión de señales en el sistema nervioso central. La acetilcolina es degradada por la acetilcolinesterasa (AChE), por lo que inhibir su acción podría mejorar la función colinérgica y mitigar los síntomas cognitivos asociados con la enfermedad de Alzheimer. El objetivo de este estudio fue identificar metabolitos secundarios presentes en líquenes con alta afinidad por la AChE. Para ello, se emplearon métodos como el cribado virtual mediante acoplamiento molecular, el análisis de propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de toxicidad, así como simulaciones de dinámica molecular. Se optimizaron 251 metabolitos secundarios obtenidos de la base de datos LDB. La estructura de la AChE se extrajo del PDB-RCSB, se completó mediante homología y se evaluó su calidad utilizando el diagrama de Ramachandran. Del análisis de cribado virtual, se identificaron 33 compuestos que mostraron mayor afinidad, cuyas propiedades ADMET fueron analizadas. Los compuestos 172, 179, 201 y 225 demostraron la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, además de presentar mayor afinidad que el fármaco de referencia. Las simulaciones de dinámica molecular permitieron analizar la estabilidad del complejo AChE-ligando. En conclusión, se observó que el compuesto 172, identificado como calicina, se perfila como un candidato prometedor para el desarrollo de terapias dirigidas al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Palabras claves: Acetilcolinesterasa, Alzheimer, cribado virtual.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder that affects cognitive functions such as memory, language, and behavior. One of the main alterations observed in this disease is the decrease in acetylcholine levels, a neurotransmitter essential for signal transmission in the central nervous system. Acetylcholine is degraded by the enzyme acetylcholinesterase (AChE); therefore, inhibiting its activity could enhance cholinergic function and mitigate the cognitive symptoms associated with Alzheimer's disease. The aim of this study was to identify secondary metabolites present in lichens with high affinity for AChE. For this purpose, methods such as virtual screening via molecular docking, analysis of physicochemical, pharmacokinetic, and toxicity properties, as well as molecular dynamics simulations, were employed. A total of 251 secondary metabolites obtained from the LDB database were optimized. The AChE structure was retrieved from the RCSB-PDB, completed through homology modeling, and its quality was assessed using the Ramachandran plot. From the virtual screening analysis, 33 compounds with higher binding affinity were identified, and their ADMET properties were evaluated. Compounds 172, 179, 201, and 225 demonstrated the ability to cross the blood–brain barrier and showed greater affinity than the reference drug. Molecular dynamics simulations were used to assess the stability of the AChE–ligand complex. In conclusion, compound 172, identified as calycin, stands out as a promising candidate for the development of therapies targeting Alzheimer's disease.

Keywords: Acetylcholinesterase, Alzheimer's, virtual screening.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

HIPÓTESIS 3

OBJETIVOS..... 4

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO..... 5

1.1. Enfermedades neurodegenerativas 6

1.1.1. Generalidades 6

1.1.2. Clasificación de enfermedades neurodegenerativas..... 7

1.1.3. La enfermedad de Alzheimer 7

1.1.4. Síntomas y estadios de la enfermedad de Alzheimer 8

1.1.5. Fisiopatología de la enfermedad 9

1.1.6. Rol de la acetilcolina y la acetilcolinesterasa en el Alzheimer 12

1.1.7. Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer 13

1.2. Acetilcolinesterasa..... 15

1.2.1. Función y estructura 16

1.2.2. Importancia de inhibir la acetilcolinesterasa en el Alzheimer 19

1.2.3. Inhibidores de la acetilcolinesterasa..... 19

1.3. Líquenes: asociaciones simbióticas 21

1.3.1. Metabolitos secundarios de Líquenes 23

1.3.2. Tipos y características de los metabolitos secundarios de líquenes 23

1.3.3. Aplicaciones farmacéuticas conocidas de los metabolitos secundarios de líquenes..... 24

1.4.1. Base de datos 25

1.4.2. Cribado Virtual o virtual screening 26

1.4.3. Acoplamiento molecular o molecular docking 26

1.4.4. Dinámica Molecular 27

1.4.5. Ventajas del cribado virtual en la búsqueda de nuevos fármacos	27
CAPÍTULO II. MÉTODOS Y DETALLES COMPUTACIONALES.....	29
2.1. Lugar de ejecución.....	30
2.2. Detalles Computaciones	30
2.2.1. Hardware	30
2.2.2. Software	30
2.2.3. Servidores en línea	32
2.3. Metodología.....	34
2.3.1. Preparación y optimización de metabolitos secundarios de líquenes	34
2.3.2. Modelamiento estructural y optimización de la enzima acetilcolinesterasa	35
2.3.3. Cribado virtual de proteína – ligando.....	36
2.3.4. Análisis de propiedades moleculares y predicción de toxicidad.....	37
2.3.5. Análisis mediante dinámica molecular	37
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1. Análisis de los metabolitos de líquenes	41
3.2. Análisis de la acetilcolinesterasa	42
3.3. Análisis del cribado virtual.....	49
3.4. Análisis de propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas.....	52
3.5. Análisis de la dinámica molecular AChE-Ligando	62
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS.....	90
GLOSARIO.....	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de energía de afinidad entre los mejores compuestos con igual o mejor desempeño que el donepezilo.	49
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los compuestos que atraviesan la BHE.....	53
Tabla 3. Perfil de interacción con P-gp y enzimas CYP de los metabolitos con SwissADME.....	57
Tabla 4. Propiedades toxicas de los compuestos con Datawarrior.	59
Tabla 5. Promedios y desviaciones estándar de RMSD, RG y SASA, con un ligando en ambas cadenas desde los 50ns.	67
Tabla 6. Interacciones moleculares entre los compuestos y los residuos de aminoácidos en las cadenas A y B de AChE.	72



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante sus principales rutas de escisión.	10
Figura 2. Placas amiloides y ovillos de proteína tau, en neuronas del Alzheimer.	11
Figura 3. Comparación de imágenes PET cerebrales: Cerebro normal vs. cerebro con enfermedad de Alzheimer.	14
Figura 4. Estructura tridimensional de AchE dimérica.	17
Figura 5. Sitio activo de la acetilcolinesterasa.	18
Figura 6. Organización compleja del talo del liquen. A la derecha se muestran ejemplos de metabolitos producidos por líquenes <i>Ophioparma venrtosa</i> y <i>Peltigera</i>	22
Figura 7. Comparación de las conformaciones de Ácido hematómico (ID-043).	42
Figura 8. Identificación de residuos no esenciales y regiones faltantes de la acetilcolinesterasa.	43
Figura 9. Acetilcolinesterasa reparada por homología en SwissModel.	44
Figura 10. Diagrama de Ramachandran de AChE con MolProbity.	44
Figura 11. Identificación de los mejores pockets en el servidor PockDrug, visualizados desde una orientación frontal.	46
Figura 12. Identificación de aminoácidos que componen el sitio activo de la cadena A de AChE.	47
Figura 13. Identificación de aminoácidos que componen el sitio activo de la cadena B de AChE.	48
Figura 14. Scatter plot de las afinidades de unión de los 251 compuestos, incluyendo el donepezilo y la acetilcolina, generado en Python.	51
Figura 15. Representación gráfica de los valores de las propiedades fisicoquímicas.	54
Figura 16. Comparación de WLogP y TPSA de 33 compuestos con mayor afinidad junto a donepezilo en Python.	54
Figura 17. Estructura bidimensional de Crisofanol.	60
Figura 18. Estructura bidimensional de los compuestos que atraviesan la BHE y no tóxicos.	61
Figura 19. RMSD de la proteína con un ligando en ambas cadenas, desde los 50ns.	64
Figura 20. RMSF de la proteína con un ligando en ambas cadenas, desde los 50ns.	65
Figura 21. RG de la proteína con un ligando en ambas cadenas, desde los 50ns.	66
Figura 22. SASA de la proteína con un ligando en ambas cadenas, desde los 50ns.	66

Figura 23. Identificación de las interacciones moleculares que componen el sitio activo de la cadena A de AChE.....	69
Figura 24. Identificación de las interacciones moleculares que componen el sitio activo de la cadena B de AChE.....	70



ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Relación de los metabolitos secundarios de líquenes que constituyen la Lichen DataBase	91
ANEXO B. Listado completo de residuos y átomos faltantes en la estructura PDB (7E3D).....	104
ANEXO C. Tabla de afinidades de unión (kcal/mol)	107
ANEXO D. Propiedades fisicoquímicas de los 33 compuestos analizados	117
ANEXO E. SMILES de los compuestos con mayor afinidad.....	122
ANEXO F. Análisis de dinámica molecular de 0 a 100ns	125



INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo de trastornos caracterizados por la pérdida progresiva de funciones neuronales, que afectan tanto a las capacidades cognitivas como motoras. Entre las más prevalentes se encuentran el Alzheimer, el Parkinson y otras formas de demencia, con el Alzheimer representando el mayor porcentaje de casos a nivel mundial. Este tipo de patologías se asocian comúnmente a alteraciones bioquímicas en proteínas específicas dentro de neuronas y células gliales, lo que contribuye al deterioro funcional del sistema nervioso. (1)

Un elemento clave en el desarrollo de estas enfermedades es la disminución de la acetilcolina, un neurotransmisor fundamental para la memoria, el aprendizaje, el sueño y diversas funciones fisiológicas. La acetilcolinesterasa es la enzima encargada de degradar la acetilcolina, y su inhibición ha sido una estrategia terapéutica central para tratar síntomas de la enfermedad de Alzheimer. Al limitar la acción de esta enzima, se busca prolongar la disponibilidad del neurotransmisor en la sinapsis y mejorar la función cognitiva de los pacientes. (2,3)

Dada la creciente incidencia de enfermedades neurodegenerativas y su impacto en la salud pública, se intensifican los esfuerzos por descubrir nuevos compuestos terapéuticos. En este contexto, los productos naturales han emergido como una fuente importante de moléculas bioactivas. Entre ellos, los líquenes, asociaciones simbióticas entre hongos y algas o cianobacterias, destacan por su capacidad de producir metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas, incluyendo actividad antioxidante, antiinflamatoria, y enzimática. (4,5)

Una de las posibles causas del aumento de la incidencia del Alzheimer es el envejecimiento progresivo de la población, especialmente en países en desarrollo como los de América Latina. Estas regiones enfrentan importantes limitaciones en recursos para la atención de la salud mental y carecen de financiamiento adecuado para impulsar la investigación científica. A diferencia de los países desarrollados, que cuentan con agencias de financiación y organizaciones dedicadas a la investigación. En este sentido, el descubrimiento de fármacos asistido por computadora surge como una herramienta prometedora que permite reducir considerablemente el tiempo y los costos asociados al desarrollo de nuevos tratamientos. (6)

El descubrimiento de fármacos asistidos por computadoras reduce tiempo y costos. El presente estudio se enfoca en la identificación *in silico* de metabolitos secundarios provenientes de líquenes con potencial inhibitorio sobre la acetilcolinesterasa. Mediante técnicas de cribado virtual, se evaluará la afinidad de estos compuestos por el mencionado blanco terapéutico, con el objetivo de aportar alternativas viables para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer.



HIPÓTESIS

Dado que hay un déficit colinérgico en el espacio sináptico, por acción de la acetilcolinesterasa, y esta puede desencadenar la progresión de la enfermedad de Alzheimer, se puede analizar por métodos de cribado virtual la afinidad de metabolitos secundarios presentes en líquenes con capacidad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa.



OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar y evaluar por cribado virtual los metabolitos secundarios presentes en líquenes de la base de datos Lichen Data Base (LDB) que tengan una alta afinidad a la acetilcolinesterasa.

Objetivos Específicos

1. Preparar y optimizar las estructuras de los metabolitos secundarios presentes en líquenes, correspondientes de la base de datos Lichen DataBase.
2. Optimizar y analizar la enzima acetilcolinesterasa por métodos *in silico*.
3. Determinar la mejor afinidad de unión que el donepezilo mediante cribado virtual y acoplamiento molecular.
4. Evaluar las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y predecir la toxicidad de los compuestos con mayor afinidad.
5. Analizar la afinidad proteína-ligando mediante simulaciones de dinámica molecular.



**CAPÍTULO I.
MARCO TEÓRICO**

1.1. Enfermedades neurodegenerativas

1.1.1. Generalidades

Las enfermedades neurodegenerativas se generan a causa de la disfunción progresiva y la pérdida de neuronas. Su clasificación patológica molecular se basa en las proteínas mal plegadas presentes en neuronas y/o glía. Las principales proteínas involucradas en la patogénesis de estas enfermedades son la proteína precursora amiloide (APP), la proteína tau, la α -sinucleína, la proteína de unión a TAR-ADN de 43 kDa y la proteína de sarcoma fusionada. Asimismo, existen proteínas asociadas a trastornos hereditarios, las cuales están codificadas por genes vinculados a estos trastornos por repetición de trinucleótidos, tales como la ferritina, la neuroserpina y las amiloidosis cerebrales familiares. (7)

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) menciona que, a nivel mundial, las principales causas de discapacidad y dependencia en las personas mayores es la demencia, clasificada como una de las diez principales causas de muerte a nivel global y la tercera en las Américas. La demencia es un término general que engloba diversos trastornos crónicos y progresivos que provocan deterioro cognitivo e interfieren con la capacidad para realizar actividades cotidianas. (1)

En noviembre de 2021 se llevó a cabo la reunión técnica sobre los aspectos de la salud pública de la demencia en las Américas, donde se estimó que más de 55 millones de personas en todo el mundo vivían con esta condición, y que el costo anual en 2018 ascendía a 1 billón de dólares. Además, se proyecta que el número de personas con demencia, independientemente de su origen, aumentará de 50 millones en 2010 a 113 millones para 2050, un incremento observado tanto en países de altos ingresos como en aquellos de ingresos medios y bajos durante los últimos 50 años, debido principalmente al aumento en la expectativa de vida. La enfermedad de Alzheimer constituye la forma más común de demencia y es responsable del 60% al 70% de los casos. En 2019 se reportó que 10.3 millones de personas vivían con demencia en las Américas, lo que representó un costo estimado de 379 mil millones de dólares para la región. (1)

1.1.2. Clasificación de enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se agrupan según el tipo de proteína anormal que se acumula en el sistema nervioso, ya sea dentro de las neuronas o células gliales (en forma intracelular) o en el espacio entre las células (en forma extracelular). Entre estas enfermedades se incluyen las tauopatías, las α -sinucleinopatías, las proteinopatías asociadas a TDP-43 y FUS/FET, trastornos por repetición de trinucleótidos, neuroserpinopatía, ferritinopatía y amiloidosis cerebral. Esta clasificación se basa en los síntomas clínicos, que varían según las áreas cerebrales afectadas, y en los cambios bioquímicos de las proteínas implicadas. Generalmente, los primeros síntomas se agrupan en dos categorías: por un lado, el deterioro cognitivo y la demencia, que afectan regiones como el hipocampo, el sistema límbico y las cortezas frontal y temporal; y por otro, los trastornos del movimiento (como temblores o rigidez) y los problemas en las neuronas motoras, que afectan estructuras como los ganglios basales, el tálamo, el tronco encefálico y la médula espinal. Según la enfermedad, se acumulan distintas proteínas: la α -sinucleína está presente en el Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy y la atrofia multisistémica; la proteína Tau se encuentra en el Alzheimer, la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, entre otras; la β -amiloide se asocia principalmente al Alzheimer; y la TDP-43 está relacionada con la degeneración lobar frontotemporal y la esclerosis lateral amiotrófica, aunque también puede encontrarse en el Alzheimer. Esta última enfermedad se estudia por separado, ya que en ella se acumulan tanto la A β como la Tau simultáneamente. (7,8)

1.1.3. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez por el psiquiatra Alois Alzheimer en 1907. Es la forma más común de enfermedad neurodegenerativa entre las personas mayores, representando entre el 60% y el 80% de los casos de demencia. A nivel mundial, afecta a aproximadamente 50 millones de personas, y su incidencia se duplica cada cinco años después de los 65 años, por lo que el factor de riesgo más importante es la edad. (3) Desde un punto de vista biológico, la EA se caracteriza por la acumulación de placas de β -amiloide, la formación de ovillos neurofibrilares debido a la hiperfosforilación de la proteína Tau, la muerte neuronal y la degeneración sináptica. Aunque no existe cura para la demencia,

se ha demostrado que sus síntomas son tratables. Con intervenciones apropiadas y el uso de medicamentos disponibles, es posible ralentizar el progreso de la enfermedad, lo que mejora tanto los síntomas como la calidad de vida de los pacientes y de sus familias. (10)

1.1.4. Síntomas y estadios de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) se manifiesta principalmente a través del deterioro cognitivo, pérdida de memoria y alteraciones en la personalidad. Uno de los primeros signos clínicos suele ser la dificultad para recordar información reciente. A medida que la enfermedad progresa, aparecen otros síntomas como problemas para encontrar las palabras adecuadas, disminución en la capacidad de juicio y razonamiento, así como alteraciones en la percepción visual. Con el avance de la EA, se intensifican la desorientación espacial, la deambulación y la dependencia funcional. Los pacientes también experimentan un deterioro creciente en la capacidad para llevar a cabo actividades cotidianas, junto con cambios marcados en la personalidad y el comportamiento. En las etapas más avanzadas, el lenguaje se ve seriamente afectado, aumenta la confusión y se vuelve difícil reconocer a familiares o personas cercanas. Finalmente, la extensa acumulación de placas de β -amiloide y ovillos neurofibrilares compromete todo el cerebro, haciendo que el paciente dependa completamente del cuidado de terceros. El tratamiento de la enfermedad de Alzheimer sigue siendo un gran desafío, ya que actualmente no existe un fármaco capaz de detener su progresión de forma efectiva. (11)

La EA se clasifica en dos formas principales: la enfermedad de Alzheimer esporádica (SAD, por sus siglas en inglés), de inicio tardío, y la enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano (FAD, por sus siglas en inglés). La FAD es hereditaria y está asociada a mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide (APP), así como en los genes de las presenilina 1 (PSEN1) y 2 (PSEN2). Por otro lado, la SAD tiene una etiología multifactorial, en la que intervienen elementos genéticos, ambientales, metabólicos y virales. El principal factor genético de riesgo para la forma esporádica es la variante APOE4 del gen que codifica la apolipoproteína E. La progresión clínica de la EA se divide en tres fases: preclínica, deterioro cognitivo leve (DCL) y demencia. Esta última se clasifica, a su vez, en tres niveles: leve, moderado y severo, que representan el grado de impacto funcional sobre la vida diaria del paciente. (12)

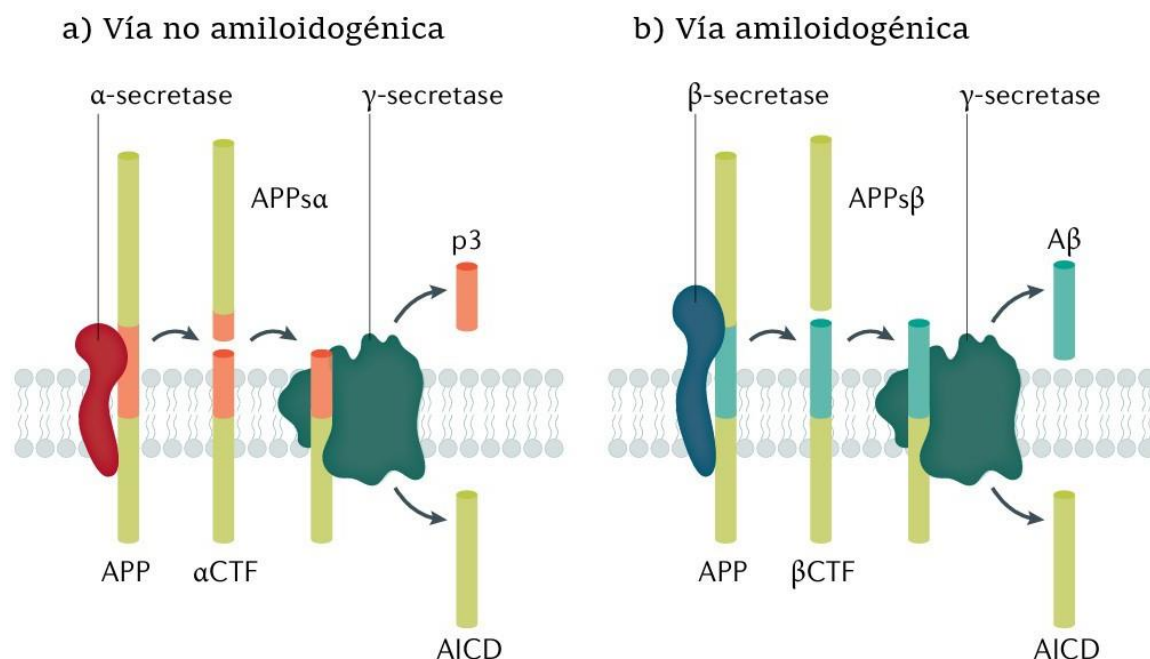
1.1.5. Fisiopatología de la enfermedad

La fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer (EA) se basa en diversas hipótesis que intentan explicar sus mecanismos patogénicos subyacentes. Esta patología se caracteriza por una disfunción sináptica progresiva, fuertemente asociada con la acumulación de placas extracelulares de beta-amiloide ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares (NFT) compuestos por proteína tau hiperfosforilada, principalmente en el hipocampo. Además, se ha observado una marcada deficiencia en los niveles de acetilcolina, neurotransmisor clave en funciones cognitivas. (9)

Un elemento central en este proceso es la proteína precursora de amiloide (APP), una proteína transmembrana con dominios intracelular y extracelular. Fisiológicamente, APP interviene en la regulación de la supervivencia neuronal, el crecimiento de neuritas, la plasticidad sináptica y la adhesión celular. No obstante, estas funciones son ejercidas a través de fragmentos resultantes de su escisión proteolítica. (13)

La Figura 1 ilustra las rutas de procesamiento de la APP, que puede seguir dos vías principales: la amiloidogénica y la no amiloidogénica. En la vía amiloidogénica, la APP es inicialmente escindida por la β -secretasa y posteriormente por la γ -secretasa, lo que da lugar a péptidos $A\beta$ de entre 27 y 43 aminoácidos. La variante $A\beta_{42}$, en particular, presenta una alta propensión a la agregación y es la principal responsable de la formación de las placas seniles extracelulares características de la EA. Además, esta vía genera otros productos, como APPs β , β CTF y AICD, que desempeñan diversas funciones celulares; por ejemplo, β CTF se ha asociado con alteraciones endosómicas en fases tempranas de la enfermedad. La sobreproducción de $A\beta$ genera efectos neurotóxicos, incluyendo disfunción sináptica, reducción de la plasticidad neuronal, estrés oxidativo, daño mitocondrial y alteración del equilibrio del calcio intracelular. Por otro lado, la vía no amiloidogénica bloquea la generación de $A\beta$ mediante la escisión de APP por la α -secretasa, lo que da lugar a APPs α y α CTF. A continuación, la γ -secretasa actúa sobre α CTF para producir el péptido p3 (extracelular) y AICD (intracelular). Los productos derivados de esta vía desempeñan funciones neuroprotectoras; por ejemplo, APPs α actúa como ligando de un subtipo de receptor GABA, modulando la actividad sináptica y regulando la excitabilidad neuronal y la plasticidad, procesos fundamentales para el aprendizaje y la memoria. (13–15)

Figura 1. Procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante sus principales rutas de escisión.



* Figura adaptada de Knopman y colaboradores. (14)

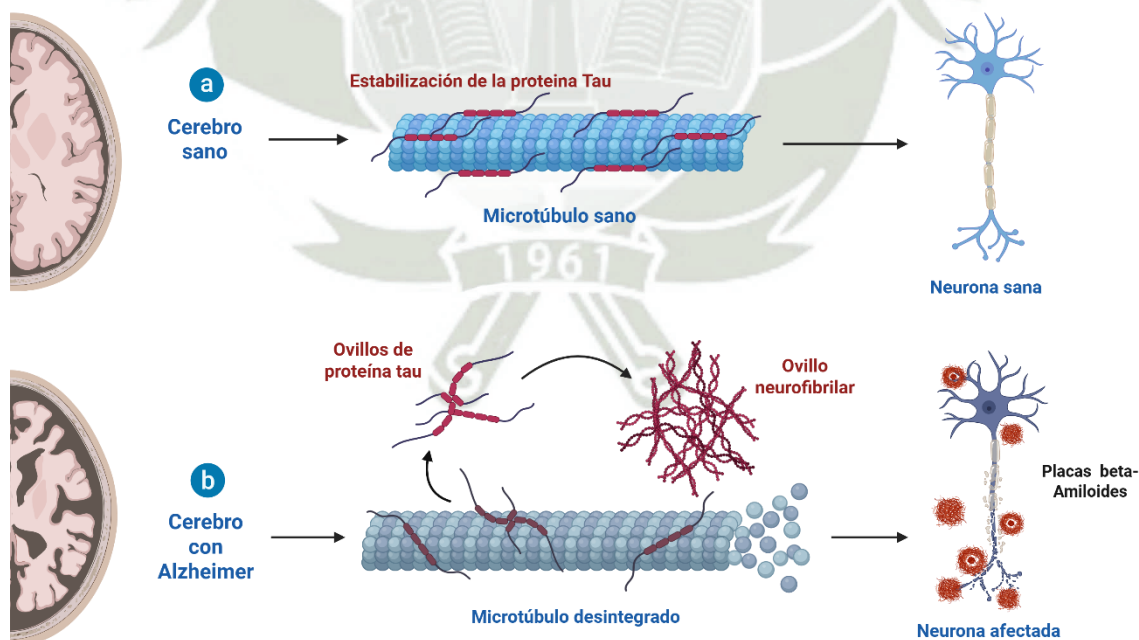
La proteína Tau desempeña un papel esencial en la fisiopatología de la EA. Está asociada a los microtúbulos, es fundamental para su ensamblaje y estabilización, lo que respalda la integridad neuronal. Aunque se localiza principalmente en el citoplasma de los axones, también está presente en compartimentos sinápticos y en la membrana nuclear. Existen seis isoformas de Tau, derivadas del empalme alternativo de sus exones (2, 3 y 10), que se denominan isoformas 3R o 4R según tengan tres o cuatro dominios de unión a microtúbulos, respectivamente. En la EA, ambas isoformas están presentes. Sin embargo, modificaciones postraduccionales anómalas, como la fosforilación aberrante promovida por proteínas quinasa y fosfatasa alteradas, favorecen la agregación y acumulación de Tau hiperfosforilada en cuerpos celulares y dendritas, formando los característicos ovillos neurofibrilares. (15)

Otro factor fundamental en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer es la apolipoproteína E (ApoE), cuya variación genética tiene un impacto considerable en el riesgo de desarrollar esta patología. El gen APOE codifica la proteína ApoE, que se produce principalmente en astrocitos y microglía en el sistema nervioso central. Las formas más comunes, ApoE2, ApoE3 y ApoE4, se diferencian en los aminoácidos ubicados en las posiciones 112 y 158, lo que modifica su funcionalidad y su influencia en la acumulación de Aβ y la disfunción neuronal. La isoforma ApoE4 incrementa significativamente la probabilidad

de desarrollar demencia asociada a la EA, al afectar tanto la acumulación como la eliminación de A β . En particular, ApoE4 es la menos eficaz en la depuración de A β , seguida por ApoE3 y ApoE2. Como consecuencia, ApoE4 favorece una acumulación temprana de A β ; se observa que aproximadamente el 10% de los portadores de esta isoforma muestran un aumento de A β alrededor de los 57 años, mientras que en quienes no la tienen, este aumento ocurre casi siete años después. (16)

Como resultado de estos procesos, los pacientes con EA presentan una reducción significativa de sinapsis, atribuida a la pérdida neuronal ocasionada por la formación de ovillos neurofibrilares, la acumulación de placas seniles en la corteza cerebral y el hipocampo, así como un marcado déficit de acetilcolina. Este déficit se evidencia por la disminución de la actividad de la acetiltransferasa, lo que refleja un daño severo en el sistema colinérgico. Esta pérdida sináptica está estrechamente vinculada con el deterioro cognitivo característico de la EA (17). La Figura 2 muestra una representación adaptada de BioRender (www.biorender.com), que ilustra la acumulación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares.

Figura 2. Placas amiloides y ovillos de proteína tau, en neuronas del Alzheimer.



*Figura adaptada de Team B. Biorender. (18)

1.1.6. Rol de la acetilcolina y la acetilcolinesterasa en el Alzheimer

El sistema colinérgico es fundamental para la memoria y el aprendizaje, ya que la acetilcolina (ACh) actúa como un neurotransmisor excitatorio que facilita la transmisión y plasticidad sináptica, la liberación presináptica de neurotransmisores y la excitabilidad neuronal. La ACh está involucrada en procesos cognitivos como la memoria, la motivación, la excitación y la atención, y desempeña funciones tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) como en el sistema nervioso central (SNC). En el SNP, la acetilcolina se libera en la unión neuromuscular para activar la contracción muscular, mientras que en el SNC influye en áreas clave como el hipocampo y la corteza, modulando el estado de alerta, el aprendizaje y la memoria. (19)

El nombre acetilcolina deriva de su estructura química, ya que es un éster de ácido acético y colina, y su síntesis comienza en los extremos terminales de los axones. La colina se obtiene de tres fuentes: por la descomposición de fosfolípidos que contienen colina, colina plasmática libre (proporcionada por los alimentos e hígado) y por recaptación de colina a partir de la hidrólisis de acetilcolina. La ACh circula en el plasma y atraviesa la BHE por las terminales nerviosas colinérgicas a través de canales de absorción dependientes de sodio. Sin embargo, algo limitante es la disponibilidad de acetato derivado de la acetil-CoA mitocondrial. La colina acetiltransferasa (CAT) utiliza acetil-CoA y colina para sintetizar acetilcolina. Aunque la CAT se genera en el soma neuronal, se transporta hacia el terminal axónico mediante transporte axoplásmico a lo largo de los filamentos de actina. Una vez sintetizada la ACh, se almacena en vesículas acidificadas por una bomba dependiente de energía (H-ATPasa) que genera un gradiente a través del transportador de acetilcolina vesicular (VACHT), que intercambia un protón vesicular por una molécula de acetilcolina. (20)

La liberación de acetilcolina ocurre cuando un potencial de acción alcanza el terminal axónico; la despolarización activa canales de calcio dependientes de voltaje. La entrada de calcio resultante desencadena la fusión de vesículas con la membrana presináptica, a través de la interacción con los receptores de proteínas de fijación soluble de NSF (SNARE) que están en la membrana vesicular y en la membrana presináptica. El calcio se une a la sinaptotagmina y a la sinaptobrevina (SNARE “v” por estar presente en la membrana vesicular), que interactúa con el complejo de proteínas SNAP-25 y syntaxina (SNARE “t” por estar presentes en la membrana presináptica). Esta fusión de la vesícula con la membrana, mediada por la unión de la proteína citosólica Munc18 a la SNAP-25 y syntaxina-1, causa exocitosis y la liberación de gran cantidad de acetilcolina en la hendidura sináptica, para posteriormente unirse a receptores nicotínicos y muscarínicos. (20)

Los receptores colinérgicos muscarínicos, que se dividen en cinco subtipos (M1–M5), tienen funciones específicas según su localización. El subtipo M1 está involucrado en el funcionamiento cognitivo, la memoria y la secreción salival; M2 regula la frecuencia cardíaca, su variabilidad y la flexibilidad conductual; M3 participa en la contracción del músculo liso, la secreción glandular y la contracción del iris; M4 modula comportamientos dependientes de la dopamina en el cerebro; y M5 regula la liberación de dopamina, además de desempeñar un papel en procesos como el aprendizaje, la memoria, la atención, los ciclos de sueño-vigilia y la excitación. Por otro lado, los receptores nicotínicos, que se clasifican en musculares y neuronales, son esenciales para funciones biológicas como el aprendizaje, la memoria, la locomoción, la ansiedad y la atención. Los receptores musculares facilitan la comunicación en la unión neuromuscular, mientras que los neuronales están presentes tanto en el sistema nervioso periférico como en el central. (19)

Después del proceso de fusión, la Ca-ATPasa (PMCA) expulsa el calcio fuera de la neurona, y las mitocondrias lo absorben. Al disminuir la concentración de calcio, la sinaptotagmina se separa del complejo SNARE, lo que permite que nuevas proteínas SNARE desarmen y reciclen el complejo, preparando así el sistema para futuras fusiones de vesículas. La acetilcolina garantiza una señalización sináptica rápida pero fugaz debido a su rápida hidrólisis por parte de la acetilcolinesterasa. Los pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) presentan una deficiencia de colina acetiltransferasa (CAT), lo que reduce la producción de acetilcolina y deteriora la transmisión colinérgica. Esta reducción es más notable en la corteza cerebral, debido a la disminución de la actividad de la CAT, la cual se correlaciona con el número de placas seniles y el grado de demencia. Por lo tanto, los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) mejoran la transmisión colinérgica al bloquear la AChE en la hendidura sináptica, proporcionando así un beneficio sintomático. (20,21)

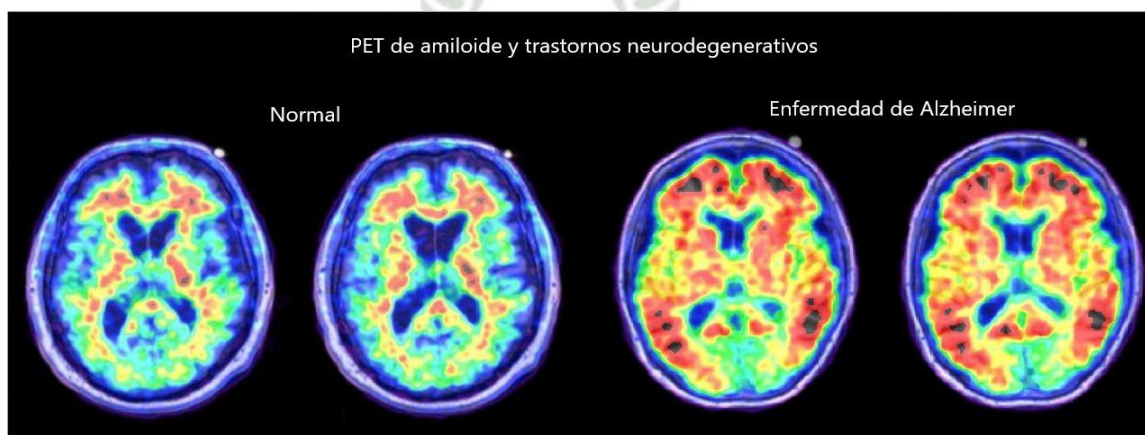
1.1.7. Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

El deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer (EA) varía desde dificultades leves hasta demencia, afectando principalmente la memoria, el lenguaje, las funciones visuoespaciales y las funciones ejecutivas. El deterioro cognitivo leve amnésico impacta de manera variable en el lenguaje, la cognición espacial y la memoria, interfiriendo con las actividades diarias. Este tipo de deterioro es más frecuente en personas mayores de 70 años, mientras que las formas no amnésicas son más comunes en pacientes más jóvenes. La EA también puede manifestarse de forma temprana con déficits no amnésicos, como la atrofia cortical posterior o la variante visual, que afectan la percepción visuoespacial, la lectura, el

reconocimiento facial o la interpretación de escenas complejas. Otra forma es la afasia logopénica, que se caracteriza por pausas en el habla y dificultades para nombrar y repetir, y se presenta en el 60% de los casos con EA subyacente. Ambos tipos de deterioro presentan depósitos de A β en diversas áreas del cerebro. El diagnóstico comienza con la evaluación del deterioro cognitivo, que incluye información proporcionada por el entorno del paciente, un examen médico especializado y pruebas neuropsicológicas, y se confirma posteriormente mediante biomarcadores. (14)

Las técnicas de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA) han avanzado considerablemente, pasando de confirmar los síntomas a identificar la enfermedad en sus etapas asintomáticas, gracias principalmente al uso de biomarcadores que permiten un diagnóstico temprano sin la necesidad de procedimientos invasivos. El diagnóstico puede realizarse mediante resonancia magnética (RM), tomografía por emisión de positrones (PET) y análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) en las etapas preclínicas y de deterioro cognitivo leve (DCL). Los biomarcadores clave del LCR incluyen tau total (t-tau), tau fosforilada (P-tau) y A β 42. Una disminución de A β 42 indica acumulación de placas amiloides, mientras que la relación A β 42/A β 40 es un indicador importante de la patología de la EA. Aunque esta relación también puede estar alterada en otras enfermedades neurodegenerativas, ayuda a diferenciar la EA de otras condiciones. Tanto la t-tau como la P-tau reflejan daño neuronal, pero deben analizarse junto con otros biomarcadores específicos para diferenciar la EA de otras tauopatías. La combinación de los biomarcadores de tau y amiloide mejora la precisión diagnóstica de la EA. (23)

Figura 3. Comparación de imágenes PET cerebrales: Cerebro normal vs. cerebro con enfermedad de Alzheimer.



* Figura adaptada de Chapleau y colaboradores. (22)

La Figura 3 presenta imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET) que ilustran la acumulación de beta-amiloide en el cerebro, una característica distintiva de los trastornos neurodegenerativos, especialmente la enfermedad de Alzheimer. La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica de medicina nuclear que emplea radiotrazadores marcados con isótopos radiactivos. Estos radiotrazadores emiten positrones que interactúan con los electrones del cuerpo, generando rayos gamma, los cuales son detectados por un escáner PET para producir imágenes detalladas. Estas imágenes muestran la distribución de los trazadores, permitiendo la evaluación de procesos fisiológicos y patológicos. Los trazadores PET-A β , como Florbetapir, Florbetaben y Flutemetamol, aprobados por la FDA y la EMA, permiten visualizar la acumulación de placas de A β , mejorando significativamente el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA). Los estudios realizados con PET-A β muestran que la acumulación de A β comienza entre 10 y 20 años antes del deterioro cognitivo, avanzando lentamente hasta llegar a la fase sintomática, momento en el que la patología tau se extiende más allá del lóbulo temporal medial. (23)

La introducción del PET-tau, aprobado por la FDA con el trazador F-flortaucipir, se detecta la acumulación de tau, la cual se correlaciona con el deterioro cognitivo. A diferencia del A β , la tau se acumula más cerca del inicio de los síntomas y avanza paralelamente con la enfermedad. Es muy poco común encontrar acumulación de tau fuera del lóbulo temporal medial sin deterioro cognitivo. (14)

1.2.Acetilcolinesterasa

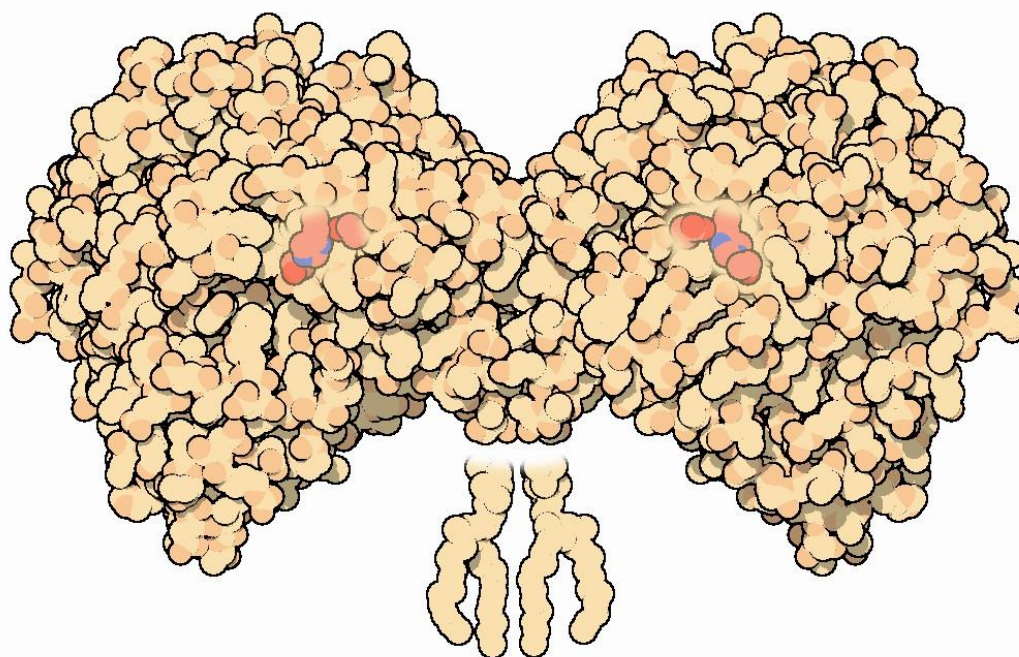
La acetilcolinesterasa (AChE) se encuentra principalmente en la membrana postsináptica de las neuronas. Su función principal es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina en colina y acetato, regulando así la transmisión de este neurotransmisor en la sinapsis.(3) La AChE constituye un blanco terapéutico clave para la enfermedad de Alzheimer (EA), ya que al inhibir su actividad se reduce la degradación de la acetilcolina, lo que permite mejorar los síntomas de la enfermedad. Los déficits cognitivos característicos de la EA están estrechamente relacionados con el deterioro de las neuronas colinérgicas y la disminución de la neurotransmisión en el cerebro. Debido a que la EA conlleva una producción insuficiente de acetilcolina, una estrategia terapéutica central consiste en elevar sus niveles cerebrales mediante la inhibición de la AChE. Sin embargo, la inhibición de la AChE puede provocar un exceso de acetilcolina en las sinapsis neuromusculares, causando parálisis, contracciones musculares, disfunción respiratoria grave e incluso la muerte. (24,25)

1.2.1. Función y estructura

La acetilcolinesterasa (AChE) forma parte de la familia de enzimas conocidas como colinesterasas, que se caracterizan por ser esterasas de serina capaces de hidrolizar diversos ésteres de colina, como la acetilcolina. (3) En la Figura 4 se muestra una representación tridimensional de la AChE. Esta enzima es heterogénea y se presenta en varias formas moleculares. Aunque las variantes varían en tamaño y estructura, todas comparten actividades catalíticas similares. Se dividen en dos grupos principales: las formas asimétricas (A) y globulares (G). Las formas asimétricas se componen de uno, dos o tres tetrámeros de subunidades catalíticas, conocidas como A4, A8 y A12. Por su parte, las formas globulares se presentan como monómeros, dímeros o tetrámeros, denominados G1, G2 y G4, respectivamente. En el cerebro de los mamíferos, predominan dos especies: una forma tetramérica unida a la membrana (G4) y una forma monomérica soluble (G1), ambas clasificadas como globulares, ya que consisten en subunidades catalíticas que no tienen una cola similar a la del colágeno. Las formas A, por otro lado, están asociadas a un polipéptido colagénico (ColQ) que forma una triple hélice de colágeno. Sin embargo, estas formas A son poco comunes en el cerebro (solo alrededor del 2%), ya que predominan en la unión neuromuscular, mientras que en el sistema nervioso central (SNC) están presentes en cantidades muy pequeñas. Así, la mayor parte de la AChE identificada en el cerebro corresponde a las formas globulares G4 y G1. (26)

La forma monomérica de AChE es una glucoproteína globular con un peso molecular de 70 a 80 kDa, que puede asociarse en dímeros y tetrámeros mediante enlaces disulfuro. La forma G2 (165 kDa) se ancla a la membrana plasmática a través de un enlace covalente con glicosilfosfatidilinositol (GPI). La forma G4 (331 kDa) es la variante funcional predominante en las sinapsis colinérgicas, tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP). Esta se ensambla, mediante puentes disulfuro, a un segmento proteico transmembranal hidrofóbico de 20 kDa conocido como la proteína PRiMA (Proline-rich membrane anchor, anclaje membranal rico en prolina), cuya región transmembrana fija el tetrámero a la membrana sináptica. (3,26,27)

Figura 4. Estructura tridimensional de AchE dimérica.

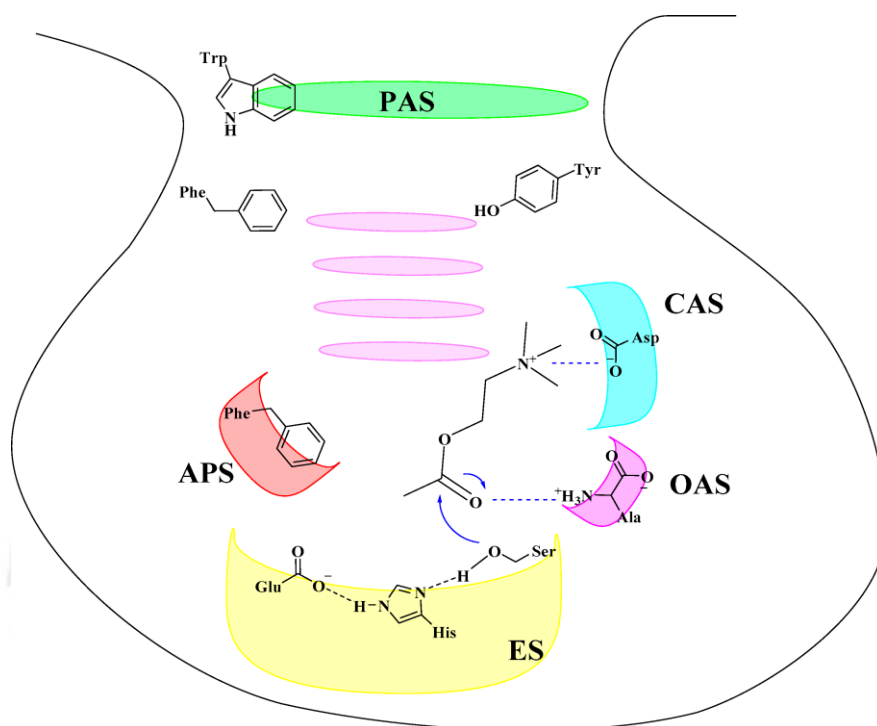


* Figura de Geis y colaboradores. (30)

La síntesis de AChE ocurre en el retículo endoplásmico, donde se glicosilan y ensamblan formas oligoméricas estables, principalmente dímeros y tetrameros. La mayoría de las nuevas moléculas de AChE se degradan rápidamente, mientras que las restantes pasan por modificaciones en el aparato de Golgi y, dependiendo de su destino, se modifican mediante la adición de glicofosfolípidos o se asocian con otras cadenas polipeptídicas hidrofóbicas. Luego, las moléculas de AChE se transportan a través de los microtúbulos hacia la superficie celular o son secretadas al medio extracelular, y cada forma molecular, una vez ensamblada, se mantiene estable. (3) La estructura química de la acetilcolinesterasa humana (hAChE) está formada por una lámina β mixta compuesta por 12 hebras, rodeada por 14 hélices α . (28) El dímero (Figura 1.4) G2 está unido mediante enlaces disulfuro y estabilizado por un conjunto de cuatro hélices. (29)

En un estudio se observó que las formas G1, G2 y G4 de la AChE promueven la agregación de los péptidos beta-amiloide; sin embargo, se destaca que la capacidad para acelerar esta agregación se encuentra principalmente en la estructura monomérica de la enzima, es decir, en la forma G1. Varios estudios sugieren que el sitio aniónico periférico de la AChE probablemente juega un papel en la formación de amiloide. Como dato importante, se ha observado que el donepezilo no interactúa con el centro activo de la enzima, sino con el sitio aniónico periférico. (31)

Figura 5. Sitio activo de la acetilcolinesterasa.



* Figura de Cavalcante y colaboradores. (32) (ES: sitio estérico ; PAS: sitio aniónico periférico; CAS: sitio aniónico catalítico; OAS: bolsillo de oxianión; APS: bolsillo del acilo. Ser: serina; His: histidina; Glu: glutamato; Phe: fenilalanina; Asp: a aspartato; Ala: alanina; Trp: triptófano; Tyr: tirosina).

El sitio activo de la acetilcolinesterasa humana (hAChE) es una cavidad estrecha de aproximadamente 20 Å de profundidad, orientada hacia el interior de la proteína, donde se localiza la tríada catalítica o sitio estérico (ES), compuesta por SER203, HIS447 y GLU334, responsables de la hidrólisis de la acetilcolina. Este sitio se complementa con otras regiones funcionales, como el sitio aniónico periférico (PAS), formado por residuos aromáticos como TRP286 y TYR72, el cual guía sustratos catiónicos hacia el sitio catalítico y está involucrado en la interacción con proteínas β -amiloides (A β 1–42), relacionadas con la enfermedad de Alzheimer. El sitio aniónico catalítico (CAS), que incluye TRP86 y TYR337, facilita el posicionamiento del grupo éster del sustrato, siendo TYR337 una "puerta oscilante" clave para la unión de sustratos e inhibidores. Además, el bolsillo de oxianión (OAS) estabiliza el estado de transición durante la hidrólisis, y el bolsillo del acilo (APS), compuesto por PHE295 y PHE297, contribuye a la especificidad de AChE frente a BChE, ya que su tamaño reducido limita los tipos de sustratos que puede hidrolizar (Figura 5). (32,33)

El sitio activo de la acetilcolinesterasa (AChE) participa en la degradación de la acetilcolina. Durante este proceso, la serina, asistida por los aminoácidos cercanos histidina y glutamato,

forma un enlace con el grupo acetilo de la acetilcolina y rompe la molécula. Posteriormente, una molécula de agua rompe rápidamente el enlace entre la serina y el grupo acetilo, liberando así a la enzima para que pueda degradar otra molécula de acetilcolina. (30)

1.2.2. Importancia de inhibir la acetilcolinesterasa en el Alzheimer

Actualmente, debido a que no existe una cura para la enfermedad de Alzheimer (EA), los tratamientos disponibles solo pueden aliviar los síntomas y retrasar el deterioro cognitivo. Los tratamientos farmacológicos aprobados se enfocan en corregir alteraciones bioquímicas, pero no modifican la neuropatología ni detienen la progresión de la enfermedad. La inhibición reversible de la acetilcolinesterasa (AChE) es una estrategia terapéutica de primera línea para la EA, ya que ayuda a ralentizar la progresión de los síntomas en las etapas iniciales. Al compensar el déficit de acetilcolina (ACh), se elevan sus niveles en el cerebro, lo que contribuye a mejorar la función cognitiva y la memoria. (24,34)

1.2.3. Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Desde la década de 1990, se ha observado que los inhibidores de la AChE ofrecen ciertos beneficios en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Su mecanismo de acción consiste en aumentar la transmisión colinérgica al inhibir la actividad de esta enzima, lo que reduce la descomposición de la acetilcolina, favoreciendo su acumulación y, a su vez, incrementando la estimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos. (13,35)

El primer inhibidor de la AChE fue la tacrina, utilizada para el tratamiento sintomático de la EA en estadios leves a moderados. Sin embargo, se informó que la tacrina está asociada a hepatotoxicidad. Debido a este efecto secundario, los inhibidores de segunda generación, como el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina, son ahora el tratamiento recomendado para la EA. (36)

1.2.3.1. Galantamina

La galantamina es un alcaloide de origen natural que tiene un efecto inhibidor débil; sin embargo, posee un mecanismo dual al actuar simultáneamente como inhibidor de la AChE y como modulador alostérico de los receptores nicotínicos. La activación de los receptores también se ha implicado en los procesos de memoria y aprendizaje. (32,37)

Interactúa con el sitio de unión de la colina y el bolsillo de unión de acilo. Inicialmente, se administra en dosis de 4 mg dos veces al día durante cuatro semanas, aumentando gradualmente hasta 8 mg dos veces al día durante otras 4 semanas. Si es tolerada, la dosis puede incrementarse

hasta 12 mg dos veces al día junto con los alimentos. Los efectos adversos de la galantamina son similares a los del donepezilo. (37,38)

1.2.3.2.Rivastigmina

La rivastigmina es un carbamato que actúa como un inhibidor no competitivo de la AChE y la BChE, con preferencia por la corteza y el hipocampo. (32) Se une al sitio aniónico y estérico de la enzima, provocando la carbamilación de su sitio activo, lo que impide que la AChE metabolice el neurotransmisor. Se clasifica como un agente pseudoirreversible debido a la reversibilidad extremadamente lenta de su acción, ya que inhibe la AChE durante un período aproximadamente 10 horas, aunque su vida media de eliminación es corta aproximadamente de 2 horas. Algunos estudios sugieren que la combinación de rivastigmina con memantina puede ser una estrategia más eficaz, dado que el daño glutamatérgico sigue al deterioro colinérgico. La dosis inicial recomendada es de 4,6 mg/día mediante parche transdérmico. Entre los efectos secundarios más comunes de la rivastigmina se incluyen vómitos, diarrea, náuseas y anorexia. (37,38)

1.2.3.3.Donepezilo

Es un derivado de la bencilpiperidina, un inhibidor no competitivo y reversible de la AChE. Puede actuar tanto en el sitio aniónico catalítico como en el sitio aniónico periférico de la AChE. Se considera que, además de su acción sobre el PAS, reduce la biosíntesis de oligopeptidos β -amiloides insolubles, que provocan una respuesta inflamatoria, la cual contribuye a la neurodegeneración característica de la enfermedad de Alzheimer. (32,37)

Alcanza una vida media de 70 horas y su concentración máxima se alcanza entre 3 y 5 horas, sin que su absorción se vea afectada por los alimentos. La dosis inicial recomendada es de 5 mg al día por la noche para minimizar los efectos secundarios. Después de cuatro semanas, la dosis puede aumentarse a 10 mg, siempre y cuando el paciente pueda tolerarla. En caso contrario, se reduce a 5 mg/día como dosis de mantenimiento. Los efectos adversos más comunes son de origen gastrointestinal, como náuseas, vómitos, diarrea y estreñimiento. (38,39)

Por otro lado, también se podría adicionar a los tratamientos enfoques no farmacológicos, que pueden ofrecer beneficios en las capacidades cognitivas, la autonomía y el bienestar del paciente, al tiempo que reducen la dependencia. Entre ellos se incluye eliminar estresores físicos y emocionales, mantener rutinas diarias y evitar cambios en el entorno. Además, resulta fundamental que los cuidadores adapten su actitud y comunicación, empleando un tono tranquilizador, otorgando suficiente tiempo de respuesta, reduciendo distracciones y

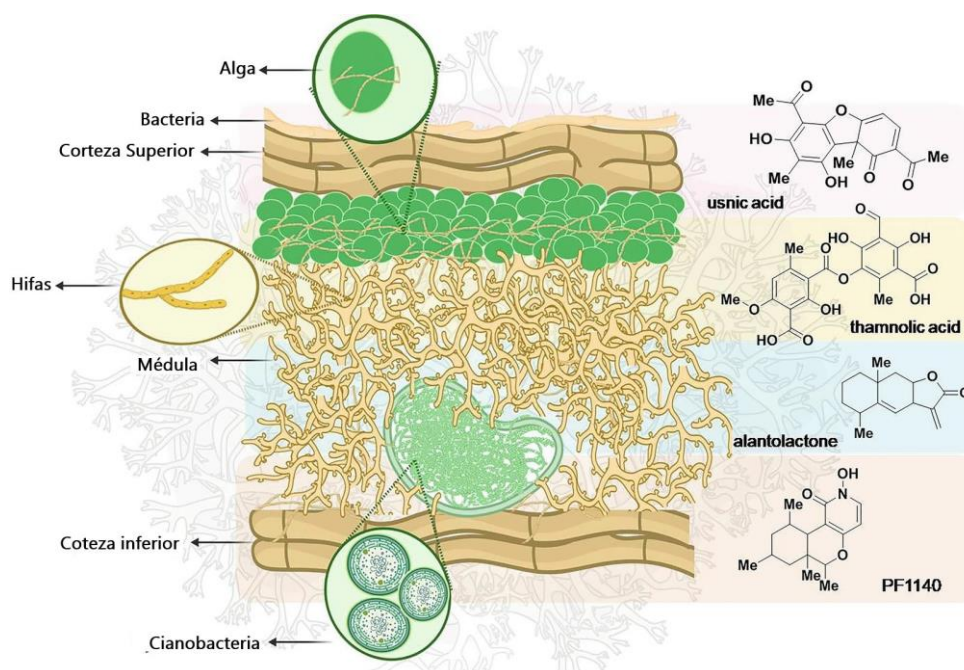
proponiendo actividades acordes a las habilidades preservadas. Estas intervenciones abarcan la estimulación cognitiva, sensorial (musicoterapia, aromaterapia, fototerapia), psicosocial (psicoterapia, arteterapia, orientación) y motora (marcha y entrenamiento físico), todas estas enfocadas a mejorar la calidad de vida, reducir síntomas como depresión, apatía, trastornos del sueño o ansiedad, y mantener mayor autonomía posible. (40)

Últimamente, se han llevado a cabo diversas investigaciones para identificar inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) de origen natural. En este contexto, los metabolitos secundarios de los líquenes han despertado un gran interés debido a su potencial bioactividad. En la enfermedad de Alzheimer, estos compuestos destacan por sus propiedades antioxidantes, lo que sugiere su posible aplicación en el tratamiento de la enfermedad. Además, su actividad farmacológica los posiciona como moléculas biológicas innovadoras con potencial terapéutico. (41)

1.3.Líquenes: asociaciones simbióticas

El término "liquen" fue utilizado por primera vez hace más de dos mil años por el filósofo griego *Theophrastus* para describir organismos no identificados que crecían en la corteza de árboles o rocas. Fue Frank, en 1876, quien describió la relación simbiótica entre los dos organismos involucrados en la formación de los líquenes, a la cual denominó "*symbiotismus*", que significa simbiosis. Debido a su particular estructura biológica y química, los líquenes resultan ser sujetos de estudio importantes en investigaciones científicas. En la actualidad, se considera que los líquenes son una asociación ecológica obligada, representando un mutualismo complejo, aunque su clasificación como simbiosis o parasitismo evolucionado sigue siendo tema de debate. A pesar de que la interacción entre los dos socios sigue siendo un misterio, los investigadores coinciden en que el micobionte, o el hongo que forma el liquen, juega un papel predominante en esta relación. Desde 1983, este hongo ha sido denominado "hongos formadores de líquenes" en lugar de "líquenes" en el contexto científico. (5) Los líquenes pueden adoptar tres formas diferentes de crecimiento con respecto a su talo (Figura 6): fruticoso, crustoso y folioso. El tipo fruticoso tiene una estructura tridimensional que se asemeja a un arbusto, el crustoso tiene una apariencia bidimensional similar a una costra adherida a superficies, y el folioso, que se encuentra entre los dos anteriores, presenta una clara diferencia entre las superficies superior e inferior. (42)

Figura 6. Organización compleja del talo del líquen. A la derecha se muestran ejemplos de metabolitos producidos por líquenes *Ophioparma ventrosa* y *Peltigera*.



* Figura adaptada de Harman y colaboradores. (43)

Los líquenes son asociaciones simbióticas entre un alga y/o cianobacteria (fotobionte) y un hongo (micobionte). El fotobionte se encuentra localizado en la capa medular, genera compuestos orgánicos a través de la fotosíntesis y está rodeado por hifas fúngicas del micobionte, las cuales le proporcionan estabilización mecánica y protección. Además, los metabolitos secundarios son producidos por el micobionte o por los hongos liquenícolas (42–44). El micobionte constituye aproximadamente el 90% de la masa total líquen, siendo la fuente principal de su forma, tamaño, estructura y color, mientras que el fotobionte aporta el 10% restante de su composición interna. (45)

El 98% de los líquenes pertenecen al grupo *Ascomycota*, mientras que el restante 2% se distribuye entre otras subdivisiones como *Basidiomycotina*, *Deuteromycotina* y *Mastigomycotina*. En cuanto a los fotobiontes, las algas involucradas en esta simbiosis provienen de los filos *Chlorophyta*, *Phaeophyta* y *Xanthophyta*, mientras que las cianobacterias pertenecen a géneros como *Nostoc*, *Scytonema*, *Gleocapsa*, *Stigonema*, *Hyella*, *Chroococcus*, *Calothrix* y *Dichotrix*. De todas las asociaciones simbióticas de los líquenes, aproximadamente el 80% están compuestas por algas verdes unicelulares eucariotas, un 10% son algas verdes filamentosas, y el otro 10% son cianobacterias procariotas. Además, el talo de los líquenes puede albergar bacterias no fotosintéticas, que se cree que juegan un rol en la generación de

nuevos compuestos. También es común encontrar hongos diferentes al hongo principal de la simbiosis, conocidos como hongos endoliquénicos, lo que dificulta ofrecer una definición precisa de los líquenes. Estos organismos sintetizan una amplia variedad de compuestos alifáticos y aromáticos de bajo peso molecular, que se originan tanto del metabolismo primario (como aminoácidos, polisacáridos, proteínas, lípidos, carotenoides y vitaminas) como del metabolismo secundario, este último predominante en los hongos liquenizados. Los metabolitos secundarios constituyen entre el 5% y el 10% del peso seco del líquen, y hasta un 20% en algunos casos. Además, los líquenes producen diversas moléculas bioactivas como ácido pulvínico, antraquinonas, xantonas, depsidonas y derivados del ácido shikímico, los cuales exhiben propiedades farmacológicas destacadas, tales como actividad antiinflamatoria, antiviral, antimicrobiana, antiproliferativa, antitumoral, fotoprotectora, inhibidora de enzimas y antiangiogénica. (5,43)

1.3.1. Metabolitos secundarios de Líquenes

Lo más destacado de los líquenes son sus moléculas derivadas, que corresponden a metabolitos secundarios y representan una fuente prometedora para la salud y el bienestar humanos. Hasta ahora se han identificado más de 1000 metabolitos secundarios, producidos principalmente por el micobionte, que se encuentran en la superficie de las hifas y son insolubles en agua, por lo que pueden extraerse con solventes orgánicos; además, son moléculas de bajo peso molecular. En la naturaleza, estos metabolitos se acumulan en la corteza o en la médula del líquen. La corteza suele contener derivados de antraquinona, ácido pulvínico, xantona, ácido úsnico y atranorina, los cuales son pigmentados, excepto la atranorina, que actúa como filtro de luz. Sin embargo, la mayoría de los metabolitos secundarios están en la médula, aunque sus funciones biológicas aún no están claras. Por otro lado, los extractos y metabolitos secundarios de varios líquenes han demostrado ser potentes inhibidores de varias enzimas metabólicas, como la tirosinasa, la monoaminoxidasa (MAO), la acetilcolinesterasa (AChE) y otras enzimas involucradas en la ruta de las poliaminas, como la ornitina descarboxilasa, la arginina descarboxilasa y la arginasa. En particular, la biruloquinona, un compuesto aislado de líquenes, ha mostrado actividad inhibitoria sobre la AChE y se ha evaluado como un posible candidato para el desarrollo de fármacos dirigidos al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. (5,46,47)

1.3.2. Tipos y características de los metabolitos secundarios de líquenes

Las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios se pueden determinar a partir de las vías fúngicas ya conocidas. En general, la mayoría de metabolitos secundarios se producen a través

de la vía del acetil-polimalonilo por que esta predominantemente conectada con la parte fúngica del líquen, aunque algunas también provienen de las vías del ácido mevalónico y del ácido shikímico. (45)

1.3.2.1. Derivados de las vías acetato-malonato, ácido mevalónico y ácido shikímico

Los líquenes producen una variedad de compuestos químicos a través de diversas rutas metabólicas, destacándose la vía acetato-malonato, la del ácido mevalónico y la del ácido shikímico. En la vía acetato-malonato, se sintetizan compuestos como depsidonas, xantonas y antraquinonas al unir unidades fenólicas de orcinol mediante enlaces éster, éter o carbono-carbono utilizando acetil-CoA y malonil-CoA. Otros compuestos como xantonas, antraquinonas y cromonas, se forman por la ciclización interna de una sola cadena policétida. También se forman para-dépsidos, tridepsidos y meta-dépsidos por esterificación y enlaces en posición meta. Además, se producen compuestos complejos como dibenzofurano y ácido úsnico mediante ciclodeshidrataciones. Por otro lado, en la vía del ácido mevalónico, los líquenes producen terpenos, esteroides y carotenos, compuestos también característicos de plantas superiores. Entre los terpenos más conocidos se encuentra la zeorina, así como dos diterpenos: 16α -hidroxikaurano y nefrina, siendo notable que no se han encontrado sesquiterpenos en estos organismos. En cuanto a la vía del ácido shikímico, esta produce pigmentos característicos como las terfenilquinonas y los ácidos pulvínicos, localizados generalmente en la corteza de los talos. Aunque estos compuestos son típicos de los líquenes, algunos, como el ácido polifórico y el ácido telefórico, también se encuentran en hongos libres. La biosíntesis de ácidos pulvínicos requiere nitrógeno, a pesar de que la mayoría de estos compuestos no lo contienen, lo que limita la actividad metabólica de los líquenes debido a la disponibilidad de nitrógeno. (5,44)

1.3.3. Aplicaciones farmacéuticas conocidas de los metabolitos secundarios de líquenes

La actividad farmacológica de los líquenes se debe principalmente a sus metabolitos secundarios, que presentan una variedad de propiedades biológicas, tales como actividad antimutagénica, antioxidante, antimicrobiana, antiviral, inhibición enzimática, anticancerígena y gastroprotectora. Compuestos como los ácidos fenólicos, depsidonas y policíclicos tienen la capacidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno, proteger el ADN y potenciar las enzimas antioxidantes. Ácidos como el úsnico, vulpínico y protecetrárico son efectivos contra bacterias, hongos y parásitos; el ácido sekikaico inhibe el virus respiratorio sincitial, y el ácido psorómico mejora el tratamiento contra el herpes simple. Además, algunos metabolitos inhiben enzimas

involucradas en infecciones, cáncer, diabetes y trastornos neurológicos. En el ámbito anticancerígeno, compuestos como los ácidos retigérico B y pulvínico inducen apoptosis en células tumorales. En cuanto a gastroprotección y hepatoprotección, sustancias como el alcohol rizolínico y el ácido úsnico ayudan a reducir el estrés oxidativo y restauran los tejidos dañados. Finalmente, la atranorina y el ácido perlatólico muestran propiedades neuroprotectoras y son eficaces contra glioblastomas. Aunque muchas de las moléculas derivadas de líquenes aún no se han desarrollado como fármacos, su estudio continúa siendo de gran importancia en la farmacognosia. (44,48)

1.4.Bioinformática

La bioinformática es un campo interdisciplinario cuyo objetivo es desarrollar y aplicar herramientas computacionales para recopilar, almacenar, analizar y difundir datos e información biológica. Aunque en sus inicios se centró en el análisis de secuencias de ADN, ARN y proteínas, como en el Proyecto Genoma Humano, transformando la biología en una ciencia impulsada por la información, actualmente abarca una amplia variedad de técnicas diseñadas para distintas modalidades de adquisición de datos, apoyándose en tecnologías avanzadas y enfoques como la inteligencia artificial y el aprendizaje estadístico. (49,50)

El objetivo principal de la bioinformática es desarrollar modelos computacionales que simulen moléculas y procesos biológicos, lo que acelera los descubrimientos científicos y reduce la necesidad de experimentos en laboratorio. Sus métodos incluyen el análisis de bases de datos, la modelización molecular, el análisis de secuencias, el desarrollo de fármacos, entre otros. (50)

1.4.1. Base de datos

Las bases de datos en bioinformática son repositorios organizados de información biológica que permiten almacenar, catalogar e interpretar grandes cantidades de datos obtenidos de diversas fuentes experimentales. Estas bases de datos contienen información sobre secuencias genéticas, proteínas, imágenes biomédicas, estructuras celulares y otros aspectos fundamentales para la investigación biológica y médica. (51) Por lo tanto, las bases de datos surgen como respuesta a la creciente necesidad de conservar y organizar la gran cantidad de información generada. Esto no solo resuelve el problema de almacenamiento, sino que también facilita el análisis de los datos y su reutilización para distintos fines. (52)

1.4.2. Cribado Virtual o virtual screening

Los métodos computacionales son ahora esenciales en el descubrimiento de fármacos, abarcando desde la identificación de candidatos hasta su optimización. Su objetivo principal es hacer el proceso más eficiente, reduciendo la necesidad de experimentos tradicionales y aumentando las probabilidades de éxito clínico, lo que da como resultado terapias más efectivas y con menos efectos secundarios.(53) Uno de los enfoques más importantes es el cribado virtual, que filtra la gran cantidad de compuestos disponibles en una base de datos virtual, enfocándose en aquellos con mayor probabilidad de interactuar eficazmente con una proteína diana específica.(54) El cribado virtual utiliza métodos computacionales para explorar bases de datos y seleccionar posibles candidatos con mayor probabilidad de éxito. Se divide principalmente en dos tipos: cribado basado en ligando y cribado basado en estructuras. El método elegido depende de la información disponible; si el conocimiento sobre el objetivo de la enfermedad es limitado, se utiliza el cribado basado en ligando. En cambio, si se conoce la estructura del objetivo, se aplican métodos como el acoplamiento ligando-proteína, lo que permite buscar compuestos similares en función de su estructura. (53,55)

1.4.2.1.Cribado virtual basado en ligando

Este enfoque analiza bases de datos de ligandos y fragmentos moleculares vinculados a una actividad biológica específica utilizando herramientas computacionales. Se basa en las propiedades estructurales y fisicoquímicas de los ligandos conocidos para identificar moléculas similares con actividad biológica. Al comenzar con la selección de compuestos frente a un objetivo, es posible observar su actividad y aprovechar su capacidad para unirse a múltiples blancos. Este método es útil para identificar fármacos, especialmente fragmentos moleculares pequeños. (54,55)

1.4.2.2.Cribado virtual basado en estructura

Este enfoque se fundamenta en la información conocida sobre la estructura de la proteína (estructura tridimensional, 3D) del objetivo terapéutico, utilizando el acoplamiento molecular como herramienta principal para identificar y clasificar nuevos candidatos a fármacos dirigidos a vías biológicas específicas. (55)

1.4.3. Acoplamiento molecular o molecular docking

El acoplamiento molecular es una técnica de código abierto que permite predecir cómo las moléculas pequeñas interactúan con los receptores biológicos, basándose en interacciones

electrostáticas. El conocimiento estructural de la proteína guía la selección de candidatos a fármacos al identificar interacciones clave con residuos de aminoácidos esenciales. Las funciones de puntuación, como la desviación cuadrática media (RMSD) y la energía de afinidad, ayudan a evaluar la calidad de las simulaciones y la afinidad entre el ligando y la proteína. (54)

Además, el acoplamiento molecular generalmente utiliza dos algoritmos: uno de muestreo, que genera diferentes conformaciones del ligando en el sitio activo de la proteína objetivo, y otro de puntuación, que calcula las energías de unión para cada configuración. Las conformaciones resultantes se clasifican según sus energías de unión, lo que permite filtrar compuestos en bases de datos grandes y seleccionar aquellos que podrían ser potenciales ligandos. Sin embargo, este enfoque asume que el blanco proteico es una estructura estática, lo que ignora su dinámica. (56)

1.4.4. Dinámica Molecular

La simulación de dinámica molecular es una técnica computacional que permite analizar el comportamiento dinámico de un complejo proteína-ligando a lo largo de diferentes escalas temporales. (57) Las simulaciones de dinámica molecular son ampliamente reconocidas como el enfoque más preciso para evaluar la estabilidad de un ligando en un sitio de unión. Estas simulaciones no solo reflejan la flexibilidad de la proteína objetivo, sino que también integran los efectos del solvente en el sistema. (56) La flexibilidad del receptor se refiere a la capacidad de una proteína para adoptar múltiples conformaciones que pueden influir en su interacción con un ligando. Esta flexibilidad puede ser estudiada mediante simulaciones de dinámica molecular que permiten observar cómo cambian las conformaciones en un entorno solvatado. Además, el comportamiento del agua juega un papel crucial: en un entorno fisiológico, tanto el ligando como la proteína están solvatados por agua antes y después de formar un complejo. El desplazamiento de estas moléculas de agua (la desolvatación) al unirse el ligando puede ser energéticamente favorable o desfavorable, dependiendo de las interacciones específicas. (58)

1.4.5. Ventajas del cribado virtual en la búsqueda de nuevos fármacos

Las ventajas del cribado virtual, especialmente desde el enfoque basado en el conocimiento previo de la estructura química de las proteínas, tienen un gran potencial para el diseño racional de fármacos. La prevalencia de esta estrategia en la literatura confirma su relevancia y utilidad en el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas, destacándose como una herramienta clave para identificar y optimizar posibles fármacos. Además, estas metodologías computacionales avanzadas en la innovación farmacéutica ayudan a mejorar los procesos de descubrimiento de

medicamentos fundamentados en modelos moleculares. El cribado virtual basado en estructura es particularmente importante para los estudios que comienzan con una proteína diana asociada a una enfermedad, ya que permite priorizar ligandos mediante evaluaciones energéticas y estadísticas, facilitando la selección de los candidatos más prometedores. (54)





CAPÍTULO II.
MÉTODOS Y DETALLES COMPUTACIONALES

2.1. Lugar de ejecución

La tesis fue realizada en el laboratorio de Bioinformática del grupo *Computational Biology and Chemistry Research Group* de la Universidad Católica de Santa María (UCSM), en la provincia de Arequipa, Perú.

2.2. Detalles Computaciones

2.2.1. Hardware

Workstation con procesador E7 de 3.0 GHz, 64 GB de memoria RAM, tres discos duros de 8 TB y 2 tarjetas aceleradoras de video NVIDIA GeForce RTX 4090.

2.2.2. Software

1. Gromacs 2024 – (GROningen Machine for Chemical Simulations):

Es un software diseñado para realizar simulaciones de dinámica molecular y para el análisis de las trayectorias generadas. Utiliza varios campos de fuerza para calcular la energía molecular y proporcionar información topológica, como las posiciones atómicas, las distancias entre enlaces, los ángulos y los diedros, entre otros. Además, se destaca por su alto rendimiento en comparación con otros programas de su categoría.(59)

2. Gnuplot v5.:

Es una herramienta que emplea comandos simples para graficar funciones matemáticas y datos. Es muy utilizada para visualizar y analizar datos, especialmente en estudios de dinámica molecular, permitiendo la creación de gráficos en 2D y 3D de alta calidad. Su versatilidad permite personalizar gráficos de líneas, dispersión, barras y superficies, y también permite automatizar tareas mediante scripts. (60)

3. UCSF Chimera 1.1.2:

Es un programa para visualizar e interactuar con la estructura de moléculas. Facilita el análisis estructural detallado, como la visualización de estructuras hidrofóbicas, interacciones de enlaces de hidrógeno y superficies de potencial electrostático. Además, permite realizar análisis de mapas de densidad, alineación de secuencias, resultados de docking, trayectorias y conformaciones. También tiene la capacidad de generar imágenes y animaciones de alta calidad. (61)

4. PyRx:

Es un software para la realización de cribado virtual (Virtual Screening) en la búsqueda de fármacos, permitiendo evaluar compuestos frente a dianas farmacológicas. PyRx

facilita todo el proceso, desde la preparación de datos hasta el análisis de los resultados, con una interfaz intuitiva para realizar docking. También ofrece herramientas de hoja de cálculo y un motor de visualización potente, fundamentales en el diseño de fármacos basado en estructuras. (62)

5. Avogadro 1.2.0:

Es un software avanzado para la visualización y edición de estructuras moleculares, utilizado en técnicas como la modelización molecular. Este programa permite crear modelos interactivos de moléculas en 3D y ofrece visualización de alta calidad, además de contar con una arquitectura flexible para agregar complementos. (63)

6. Datawarrior v06.04.01:

Es un software de código abierto para el análisis y visualización de datos químicos que integra gráficos dinámicos con inteligencia química. Permite la visualización de datos mediante diagramas de dispersión, gráficos de barras, circulares y más, identificando patrones y tendencias en estructuras moleculares. Utiliza descriptores químicos para evaluar similitudes entre moléculas y se aplica en tareas como el filtrado de datos y la personalización de vistas. Además, facilita la predicción del riesgo de toxicidad, incluyendo riesgos de irritación, mutagenicidad, tumorigenicidad y efectos reproductivos. (64)

7. Open Babel 3.1.1:

Es una herramienta química diseñada para trabajar con una amplia variedad de datos moleculares. Permite buscar, convertir, analizar y almacenar información en áreas como química, bioquímica y modelado molecular. Entre sus características, optimiza la conversión de datos estereoquímicos entre formatos de archivo. También proporciona funciones de mecánica molecular con campos de fuerza como MMFF94(s), UFF y GAFF, que se utilizan en la minimización de energía y evaluación de estructuras moleculares. Estos campos de fuerza permiten aplicar restricciones y realizar búsquedas de conformadores para la optimización y exploración de estructuras moleculares. (65,66)

8. Grace – (GRaphing, Advance Computation and Exploration of data):

Es un software que permite representar y analizar datos en dos dimensiones (2D) y examinar diversos tipos de información, como los resultados de simulaciones de dinámica molecular. Posee herramientas para evaluar parámetros fundamentales como RMSD, RMSF, SASA y RG, lo que posibilita un examen detallado de las características estructurales y dinámicas de las biomoléculas. (67)

9. VMD (Visual Molecular Dynamics):

Es un software para la visualización y análisis de sistemas moleculares. Permite manipular y analizar estructuras moleculares, así como animar y estudiar la trayectoria de simulaciones de dinámica molecular. VMD ofrece diversas formas de representar y colorear moléculas, como mediante caricaturas, esferas CPK o cilindros, entre otros. (68)

10. Schrödinger:

Schrödinger proporciona un conjunto de herramientas para la química computacional y el modelado molecular, utilizados en el estudio de interacciones entre péptidos y proteínas. (69) También facilita la visualización y el análisis de interacciones entre ligandos y proteínas a partir de simulaciones de dinámica molecular. Permite visualizar trayectorias, identificar interacciones clave y evaluar la estabilidad de complejos moleculares en condiciones fisiológicas. (70)

11. Python 3.10.12:

Es un lenguaje de programación que ofrece numerosas herramientas y bibliotecas para trabajar con datos. Permite realizar manipulaciones, análisis y visualización de información, generando gráficos como los de dispersión (scatter plot), los cuales son útiles para analizar la relación entre dos variables y detectar tendencias en grandes volúmenes de datos. (71)

2.2.3. Servidores en línea

1. PubChem:

Es una base de datos que almacena las estructuras moleculares de diversas sustancias de interés farmacéutico, biológico e industrial. Proporciona información detallada acerca de cada compuesto, incluyendo sus propiedades fisicoquímicas, actividades biológicas, seguridad, toxicidad y patentes, entre otros. Esta base de datos facilita la búsqueda de propiedades químicas y físicas de los compuestos y es una herramienta valiosa para la investigación y el análisis de sustancias químicas. (72)

2. CHARMM-GUI:

Es una herramienta ampliamente utilizada para la mecánica y dinámica macromolecular, que ofrece funcionalidades versátiles para analizar y manipular coordenadas atómicas y trayectorias dinámicas. CHARMM-GUI es esencial para la creación interactiva de sistemas moleculares complejos y la preparación de entradas para simulaciones avanzadas. Es compatible con diversos paquetes de simulación, como

CHARMM, NAMD, GROMACS y AMBER, entre otros. Su diseño se centra en la facilidad de uso, permitiendo realizar tareas específicas como la construcción de membranas o la solicitud de proteínas a través de una interfaz optimizada. (73)

3. Protein Data Bank (PDB):

Es un repositorio global y de acceso libre que almacena datos estructurales 3D de macromoléculas biológicas, como proteínas, ADN y ARN. El RCSB PDB permite explorar de manera interactiva las estructuras tridimensionales para analizar detalles estructurales, identificar interacciones moleculares, estudiar la conformación de las macromoléculas y comprender su función en los procesos biológicos. Esta herramienta es fundamental en la investigación y el desarrollo de fármacos, pues facilita la predicción de interacciones con otras moléculas, contribuyendo al diseño racional de nuevas terapias. (74)

4. SwissModel:

Es una plataforma automatizada para el modelado por homología de proteínas, que permite generar modelos 3D basados en estructuras comparativas. Incluye el repositorio SwissModel, que proporciona una base de datos de modelos anotados de proteomas de referencia, y el espacio de trabajo SwissModel, donde se pueden crear y evaluar modelos utilizando información de UniProtKB. Su funcionalidad facilita la predicción estructural de proteínas, apoyando la investigación en biología estructural y el diseño de fármacos. (75,76)

5. SwissADME:

Es una herramienta gratuita que permite calcular propiedades fisicoquímicas, predecir la farmacocinética, evaluar la similitud con fármacos y analizar la compatibilidad química de pequeñas moléculas. Es fundamental para el diseño y desarrollo de fármacos, ya que ayuda a estimar cómo se comportará una molécula en el organismo y si cumple con los criterios esenciales para ser un candidato a fármaco. (77)

6. PockDrug:

Es una herramienta computacional diseñada para predecir la capacidad de los bolsillos de unión de proteínas (pockets) para unirse a moléculas con potencial farmacológico. Permite evaluar la afinidad de unión de pequeñas moléculas a cavidades específicas en la proteína. Su utilidad es clave en la identificación de posibles objetivos para el descubrimiento de fármacos, permitiendo la evaluación de bolsillos en presencia o ausencia de un ligando. (78)

7. MolProbity:

Es un servidor web que valida la calidad estructural de modelos tridimensionales de proteínas, ácidos nucleicos y complejos biomoleculares. Su importancia radica en su capacidad para identificar errores en la geometría molecular mediante el análisis de contactos atómicos, ángulos diedros y distribuciones conformacionales. Ofrece una evaluación detallada de estructuras obtenidas tanto por cristalografía de rayos X como por resonancia magnética nuclear (RMN). Un aspecto clave de MolProbity es su uso de distribuciones de Ramachandran de alta precisión para evaluar la conformación de la cadena principal de las proteínas. (79)

2.3. Metodología

2.3.1. Preparación y optimización de metabolitos secundarios de líquenes

Los metabolitos secundarios de líquenes utilizados fueron de la base de datos Lichen DataBase (LDB), la cual fue desarrollada por Olivier-Jiménez y colaboradores (80), donde se proporciona una cobertura de la quimio-diversidad de los líquenes, que cubre el 23% de los metabolitos conocidos de líquenes, con enfoque en compuestos comunes y bien caracterizados por MS/MS. La información sobre estos compuestos, incluidos sus nombres y propiedades, fue extraída de la sección de información complementaria del artículo publicado. Posteriormente, se obtuvieron las estructuras tridimensionales de la base de datos PubChem en formato SDF y se convirtieron a formato PDB utilizando el software de Avogadro.

Luego, se realizó la optimización de las estructuras mediante minimización de energía con el siguiente comando en OpenBabel, y se les asignó un número identificador del 001 al 251.

```
obabel -ipdb compuesto.pdb -O numero_compuesto.pdb --minimize --steps  
300000 --sd --ff MMFF94
```

Donde:

- “-ipdb compuesto.pdb” especifica el archivo de entrada en formato PDB.
- “-O numero_compuesto.pdb” indica el nombre del archivo de salida.
- “--minimize” activa la minimización de energía.
- “--steps 300000” define el número de pasos para la minimización.
- “--sd” utiliza el algoritmo de descenso de gradiente para la minimización.
- “--ff MMFF94” aplica el campo de fuerza MMFF94 para el cálculo de energía.

2.3.2. Modelamiento estructural y optimización de la enzima acetilcolinesterasa

La proteína objetivo se obtuvo a partir de la base de datos Protein Data Bank - RSCB (PDB-RSCB) de estructuras cristalinas, donde se tuvo en cuenta el modelo estructural de la acetilcolinesterasa de *Homo sapiens*. Para la selección de la proteína, se evaluó la calidad del cristal y la última publicada hasta la fecha de elaboración de esta tesis, siendo la estructura de la acetilcolinesterasa (PDB ID: 7E3D).

La estructura proteica fue obtenida mediante la técnica de difracción de rayos X, la cual presentaba regiones faltantes. Para abordar esta situación, se utilizó SwissModel para predecir y modelar estas regiones ausentes, mediante modelado por homología utilizando la estructura del propio cristal y la secuencia lineal en su formato FASTA.

Previamente a la modelización, se realizó una limpieza del archivo PDB para eliminar residuos no esenciales, ligandos no relevantes y otras estructuras innecesarias que no forman parte del complejo de interés. Se identificó que el cristal presentaba dos subunidades proteicas (cadenas A y B) y se verificaron las regiones faltantes mediante visualización en el visualizador UCSF Chimera.

Para la predicción de las regiones faltantes, se ingresó en SwissModel a través de la opción "*User Template*", utilizando la estructura original como plantilla de referencia. La secuencia FASTA fue cargada como archivo de destino, mientras que el archivo de plantilla se subió en formato PDB. Se generaron modelos individuales para cada cadena, incorporando las regiones ausentes de acuerdo con la predicción de homología estructural.

Una vez reparada la proteína, se procedió con la identificación de bolsillos potencialmente drugables (Druggable pockets). Para ello, el archivo PDB generado fue cargado en el servidor PockDrug, donde se llevó a cabo el análisis de cavidades potenciales para la interacción con fármacos. Se utilizó la opción "*Druggability Prediction*", cargando la proteína generada en formato PDB en la opción "*Using protein(s)*", utilizando el método de estimación de bolsillo predeterminado sugerido por el servidor, con un umbral de proximidad de ligando de 5.50Å para el sitio activo.

Para evaluar la calidad de la proteína, se utilizó el servidor MolProbity, cargando el archivo PDB con la opción "*Analyze geometry without all-tom contacts*", lo que implica el análisis geométrico de la estructura proteica sin considerar las interacciones de contacto entre todos los átomos. Se emplearon todos los parámetros predeterminados proporcionados por el servidor. Este proceso permitió generar el diagrama de Ramachandran, utilizado para evaluar la

conformación de los ángulos ϕ (phi) y ψ (psi) de los residuos de la estructura de la proteína, proporcionando información sobre la calidad estructural del modelo generado.

2.3.3. Cribado virtual de proteína – ligando

Se utilizó el programa computacional PyRx para llevar a cabo los cribados virtuales basados en la estructura molecular mediante simulaciones de acoplamiento. Los metabolitos secundarios de líquenes optimizados fueron importados a OpenBabel a través de la herramienta de pantalla virtual por prescripción en Python. Posteriormente, la acetilcolinesterasa fue cargada como una macromolécula para realizar los análisis de acoplamiento utilizando la herramienta AutoDock Vina.

Para llevar a cabo la simulación, los compuestos y la proteína previamente fueron convertidos a formato PDBQT, compatible con el software, utilizando las herramientas del propio programa. Para definir los límites de la caja de acoplamiento molecular entre la proteína y los metabolitos, se realizó una delimitación preliminar en UCSF Chimera, empleando el mejor bolsillo druggable proporcionado por el servidor Pock-Drug. Además, se llevó a cabo una comparación entre la proteína generada y la misma proteína en presencia del ligando donepezilo (PDB ID: 7E3H) obtenida del (PDB - RCSB), con el objetivo de identificar diferencias de ubicación entre los sitios activos.

La cadena A de la acetilcolinesterasa está delimitada por una caja de dimensiones $24 \times 24 \times 24$, con coordenadas cartesianas de referencia X: 23.5376, Y: 123.464 y Z: 82.3621. De manera análoga, la cadena B de la misma enzima presenta una caja de idénticas dimensiones, con coordenadas X: -1.82476, Y: 107.853 y Z: 28.8084, estableciendo así un marco espacial uniforme para su caracterización estructural. La caja delimitada se realizó con el objetivo de que los ligandos interactuaran con el sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa, en el cual actúa el donepezilo (PDB ID: 7E3H), que está presente en la proteína y el ligando.

En la simulación de acoplamiento molecular, se utilizó la opción "*Vina Wizard*", en la cual se seleccionaron los metabolitos como ligando y la acetilcolinesterasa como macromolécula. Posteriormente, se definieron las delimitaciones de la caja de acoplamiento y ejecutaron cuatro corridas para calcular la energía de afinidad entre los ligandos y la AChE. Además de realizar la simulación con los metabolitos, se utilizó el donepezilo como control y la acetilcolina de referencia como ligando endógeno. Los mejores candidatos fueron seleccionados en función de aquellos que presentaron una mayor afinidad por la proteína en comparación con el donepezilo.

2.3.4. Análisis de propiedades moleculares y predicción de toxicidad

Los SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) de los metabolitos con mayor afinidad fueron obtenidos de la base de datos PubChem. Los compuestos, incluido el donepezilo, fueron cargados en el servidor SwissADME para calcular las propiedades fisicoquímicas de interés terapéutico, tales como: peso molecular (PM), coeficiente de partición octanol/agua (logP), número de átomos donadores de enlaces H (HBD, por sus siglas en inglés), número de átomos aceptores de enlaces H (HBA, por sus siglas en inglés), permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), absorción gastrointestinal (GI), área superficial polar topológica (TPSA Å²), logaritmo de solubilidad (log S), fracción csp3 y número de enlaces rotacionales (NrotB).

Asimismo, para la predicción de toxicidad de los compuestos seleccionados, los SMILES obtenidos de PubChem fueron copiados a la pantalla de visualización de Osiris DataWarrior. Primero, se accedió a la opción "*Chemistry*", luego a "*From Chemical Structure*" y finalmente a "*Calculate Properties*". A continuación, se seleccionó la opción "LE, Tox, Shape" y se marcaron las casillas correspondientes a "*Mutagenic*", "*Tumorigenic*", "*Reproductive Effective*" e "*Irritant*". Como resultado, se obtuvieron las calificaciones de toxicidad clasificadas en "*Slow*", "*None*" y "*High*".

Los compuestos que no presentaron predicciones de toxicidad y que pudieron atravesar la BHE fueron seleccionados para realizar la dinámica molecular. Para este paso, se descargaron previamente sus coordenadas del acoplamiento molecular en PyRx.

2.3.5. Análisis mediante dinámica molecular

La preparación de la simulación consistió, en primer lugar, en la preparación de las estructuras moleculares, que incluyeron tanto la proteína como los mejores ligandos que fueron seleccionados mediante el cribado virtual. Para ello, se empleó la herramienta "*Ligand Reader & Modeler*"; en este paso, se importó el ligando en archivos de formato PDB y se obtuvieron las topologías (archivo .tpr) y los parámetros (archivo .prm) específicos del ligando.

A continuación, se utilizó la herramienta "*PDB Reader & Manipulator*", donde se cargó el complejo proteína-ligando junto con los parámetros previamente generados para el ligando. Al sistema se le asignó un pH de 7.0. Posteriormente, se cargaron manualmente los archivos .rtf y .prm del ligando, ya que los parámetros fueron obtenidos con anterioridad. De este proceso, se obtuvieron las coordenadas (archivo .crd) y la topología molecular (archivo .psf), los cuales fueron utilizados posteriormente.

Para la preparación de los sistemas complejos, se utilizó la herramienta "*Multicomponent Assembler*", donde se prepararon los sistemas complejos para la simulación, combinando los componentes moleculares en una sola estructura topológica. Para ello, se cargaron los archivos .prm y .rtf generados en "*Ligand Reader & Modeler*", así como los archivos .crd y .psf obtenidos en "*PDB Reader & Manipulator*". Esta etapa consistió en 5 pasos para finalmente ejecutar los cálculos de dinámica molecular.

En el paso 1, se seleccionó la opción "*Box XYZ length*", donde se definió manualmente la longitud de la caja cúbica a 150Å por lado. CHARMM-GUI calculó automáticamente el volumen ocupado por la molécula, el volumen total de la caja y el espacio vacío restante, con el objetivo de determinar la fracción de volumen ocupado, lo cual es importante para establecer condiciones adecuadas de solvatación. Los componentes fueron clasificados como "*Solvated Component*", indicando que están rodeados por moléculas de agua en los pasos posteriores.

En el paso 2, se realizó la solvatación del sistema y la inclusión de iones para replicar un entorno acuoso fisiológico para los complejos. Se seleccionó la opción "*Include water*" para rodear completamente el complejo proteína-ligando con moléculas de agua. El modelo de agua utilizado y agregado por defecto fue el TIP3P, un modelo que incluye un átomo de oxígeno y dos átomos de hidrógeno, los cuales se organizaron con un ángulo de aproximadamente 104.5°. Posteriormente, se activó la opción "*Include Ions*", mediante la cual se añadieron iones de Na^{+1} , K^{+1} y Cl^{-1} a los sistemas para neutralizar la carga neta global y simular la condición fisiológica de 0.15 M. Además, la herramienta calculó automáticamente el número de moléculas de agua TIP3P y los iones.

En el paso 3, no se realizó ninguna modificación en los parámetros que vienen seleccionados por defecto por el servidor.

En el paso 4, se configuraron los parámetros de la simulación de dinámica molecular, seleccionando la opción "NPT ensemble" (número de moléculas, presión y temperatura constantes) para mantener condiciones termodinámicas constantes a lo largo del tiempo, con una temperatura de 309.65 K, que corresponde a condiciones fisiológicas típicas para sistemas biológicos. Como software de simulación se eligió GROMACS, uno de los paquetes más utilizados para simulaciones de dinámica molecular.

En el paso 5, se generaron y descargaron los archivos de entrada necesarios para ejecutar la simulación. Al seleccionar GROMACS, CHARMM-GUI generó los archivos de entrada compatibles con este software, como el archivo de configuración (.mdp), las estructuras del

sistema (.gro y .psf) y los parámetros de fuerza (.top), que permiten ejecutar la simulación de manera eficiente, asegurando que el sistema estuviera equilibrado. Con la información de las entradas obtenidas en CHARMM-GUI, se ejecutaron simulaciones de dinámica molecular de 100 ns con los parámetros obtenidos.

Finalmente, la evaluación de la estabilidad estructural y dinámica de las interacciones se verificó en los visualizadores VMD, GRACE y Schrödinger.



CAPÍTULO III.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los métodos computacionales han revolucionado el proceso de descubrimiento de fármacos, conocido como descubrimiento de fármacos asistido por computadora (CADD, por sus siglas en inglés), el cual es empleado para la exploración de nuevos compuestos candidatos a fármacos, reduciendo costos y el tiempo necesario para descubrir fármacos. El cribado virtual se ha convertido en una estrategia clave para encontrar terapias innovadoras y reducir costos en estos procesos. Esta técnica computacional busca identificar moléculas con potencial de unión a un sitio activo, explorando una amplia cantidad de compuestos para identificar aquellos que presenten características farmacológicas deseadas. (81)

Por otro lado, el CADD se encuentra dentro de los modelos informáticos que buscan ser una alternativa a la experimentación con animales. El bienestar animal en la investigación científica se basa en principios éticos establecidos de las 3Rs que significa reemplazar, reducir y refinar. Como ya se ha mencionado anteriormente, los modelos informáticos y programas ayudan a diseñar nuevos medicamentos. El CADD permite diseñar y evaluar compuestos sin necesidad de utilizar animales; reemplazando a la experimentación animal en las etapas iniciales del descubrimiento de fármacos; reduciendo el número de animales utilizados al identificar compuestos con alta probabilidad de éxito, y refinar los procedimientos al reducir el sufrimiento prediciendo la toxicidad de los compuestos, así disminuyendo los efectos adversos en los animales durante las pruebas. (82,83)

3.1. Análisis de los metabolitos de líquenes

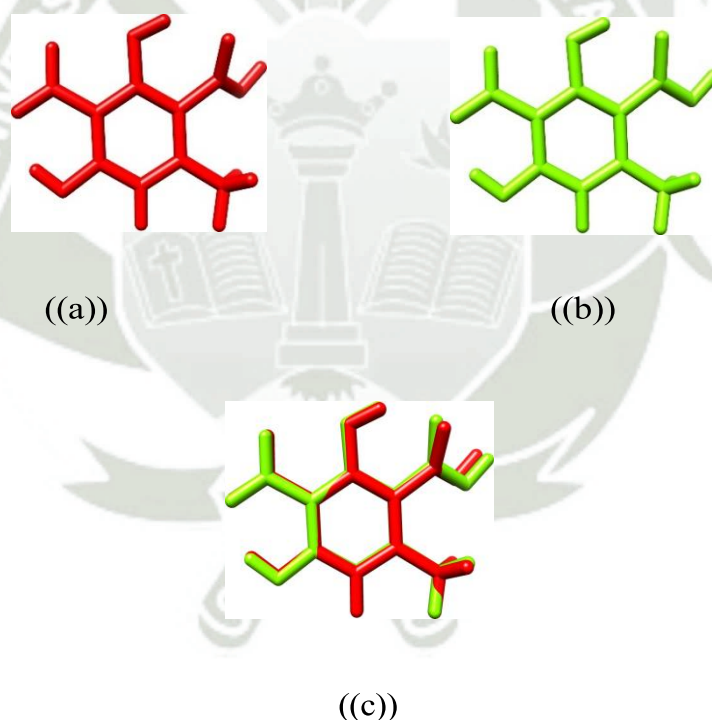
La lista de 251 metabolitos secundarios de líquenes utilizados en este estudio fue obtenida de la base de datos LDB. Este grupo de compuestos representa aproximadamente el 23% de los 1050 metabolitos actualmente conocidos en líquenes, ya que los autores caracterizaron aquellos que corresponden a las principales clases químicas reportadas en líquenes, como dépsidos, dibenzofuranos y terpenos.

Todos los metabolitos secundarios registrados en la base de datos LDB fueron optimizados con éxito. En el Anexo, Tabla A, se muestra una etiqueta para cada metabolito, el nombre de cada metabolito, la clase estructural, el peso molecular y el código de acceso de PubChem. Como ejemplo, se presentan las estructuras moleculares del Ácido hematómico (ID-043) en diferentes estados de optimización. La estructura descargada desde la base de datos PubChem (Figura 7 (a)) se muestra sin optimización geométrica. La estructura optimizada (Figura 7 (b)) ajustó la geometría para obtener una configuración más estable. La superposición de las estructuras (Figura 7 (c)) permite visualizar las diferencias entre la estructura descargada y la estructura

optimizada, mostrando la mejora en la configuración molecular después de la optimización geométrica.

La minimización de energía para los compuestos se realizó con OpenBabel, empleando el campo de fuerza MMFF94 (Merck Molecular Forcefield 94), el cual permitió optimizar la geometría de los compuestos para obtener estructuras estables. Como se describió en el trabajo de O'Boyle y colaboradores (66), la selección de los campos de fuerza implementados en OpenBabel permite trabajar con la mayoría de las estructuras moleculares. En particular, el campo de fuerza MMFF94 permite reducir la energía de la molécula ajustando su geometría, de manera que los átomos se ubiquen en posiciones más estables, alcanzando así una mejor configuración realista. Además, MMFF94 es muy conocido por ser aplicable a moléculas orgánicas o similares a fármacos, como se menciona en la tesis de Valerio Minero. (84)

Figura 7. Comparación de las conformaciones de Ácido hematómico (ID-043).



* (a) Estructura inicial (rojo). (b) Estructura minimizada (verde). (c) Superposición de las estructura inicial y final. Las estructuras fueron alineadas y representadas usando UCSF Chimera.

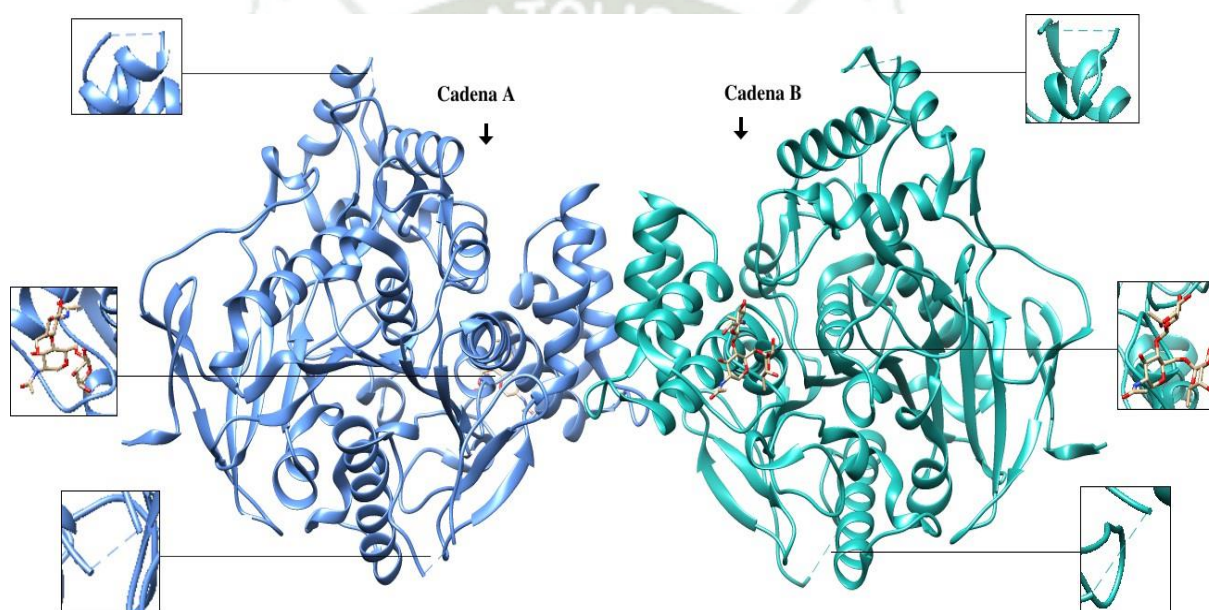
3.2. Análisis de la acetilcolinesterasa

Se seleccionó la estructura cristalográfica de la acetilcolinesterasa (PDB ID: 7E3D), determinada experimentalmente por difracción de rayos X, por ser la más actualizada al inicio

de este estudio y contar con una resolución de 2.50Å. Esta estructura proteica presentaba dos subunidades proteicas denominadas cadena A y cadena B, cada una con su propio sitio activo. Así, cada monómero posee un sitio activo funcionalmente independiente

Se identificaron ligandos no relevantes y regiones faltantes que se ubicaban en los bucles y en la superficie de la proteína, como se observa en la Figura 8. Estas regiones faltantes, fueron completadas mediante modelado por homología en el servidor SWISSMODEL.

Figura 8. Identificación de residuos no esenciales y regiones faltantes de la acetilcolinesterasa.



Una vez obtenida la proteína modelada y completa, se procedió a revisar el archivo PDB para verificar que las regiones faltantes fueron adecuadamente completadas con los residuos y átomos especificados, como se ve en el Anexo Figura B.1 y Figura B.2. En la Figura 9 se muestra que los residuos fueron incorporados correctamente completando la estructura tridimensional de la proteína. Las regiones modeladas corresponden a zonas de alta flexibilidad, como se observa especialmente en los bucles. Esto coincide con lo reportado en el estudio de Djinovic y colaboradores (85), quienes señalan que los residuos faltantes tienden a perderse debido a la flexibilidad estructural y la accesibilidad al solvente en condiciones experimentales de cristalización. Además, la intensidad de la radiación de difracción de rayos X puede dañar o romper estas regiones, dificultando su resolución precisa en el cristal.

Figura 9. Acetilcolinesterasa reparada por homología en SwissModel.

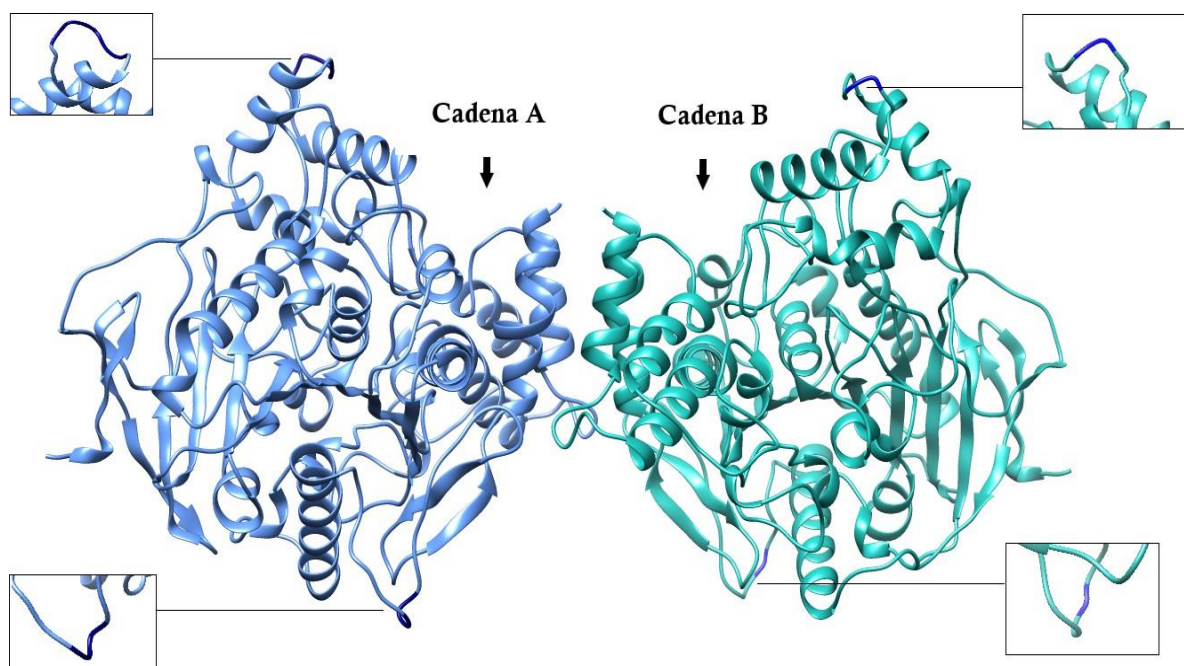
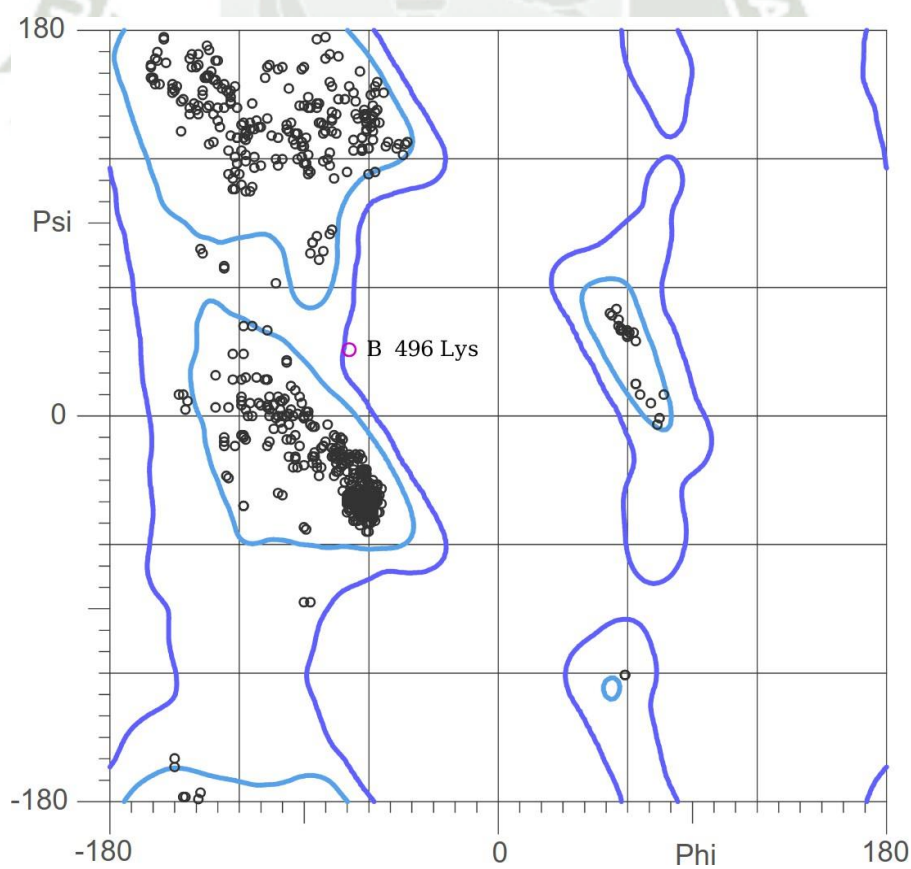


Figura 10. Diagrama de Ramachandran de AChE con MolProbity.



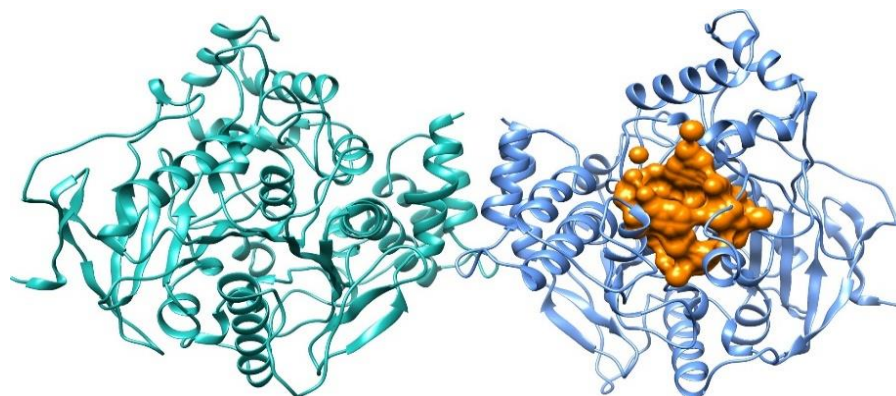
Para validar la estructura tridimensional, se realizó un análisis del diagrama de Ramachandran. La Figura 10 corresponde al diagrama de Ramachandran de la AChE obtenida. Este mostró un 96.6% (1038/1074) de residuos en regiones favorables, un 99.9% (1073/1074) de residuos en regiones permitidas, y un 0.1% (1/1074) de residuos en regiones atípicas. Este último residuo corresponde a la lisina 496 (LYS496) de la cadena B, la cual no presenta una disposición correcta de los ángulos ϕ (phi) y ψ (psi). Sin embargo, al ser un único residuo, no afecta significativamente la calidad de la proteína modelada.

Previamente, se debe considerar que se define como "pocket" o "sitio de unión" a la cavidad estructural que puede albergar ligandos endógenos o exógenos, mientras que el "sitio activo" corresponde a la cavidad donde se cataliza el ligando endógeno. Una vez definidos estos conceptos, la identificación de pockets se realizó en el servidor PockDrug, del cual también se pudo obtener el volumen de estos para determinar las dimensiones aproximadas de la caja para el acoplamiento molecular.

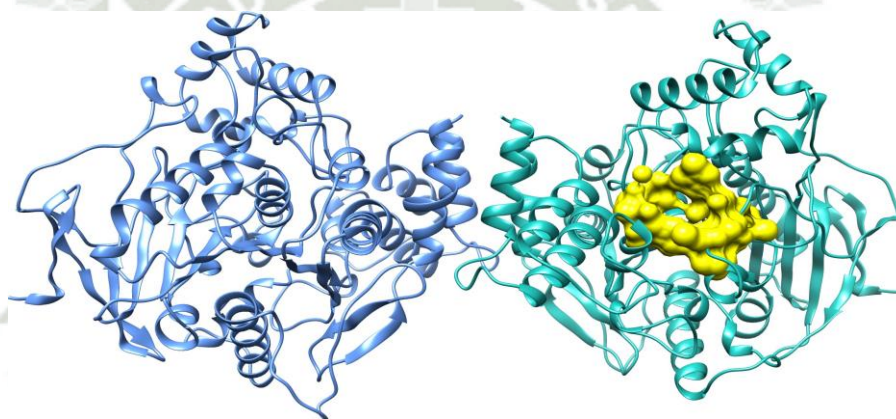
Utilizando el servidor PockDrug, se identificaron y evaluaron estos pockets en función de su volumen, accesibilidad y propiedades fisicoquímicas, con el fin de identificar aquellos con mayor probabilidad de albergar ligandos bioactivos, mediante una escala de 0 (0%) que indica baja probabilidad a 1 (100%) que representa la máxima probabilidad de drogabilidad. Se seleccionaron los tres pockets con mayores puntuaciones: uno para la cadena A y dos para la cadena B. El pocket N° 0 tuvo un valor de 0.71 con un volumen de 2154.19 Å³ (Figura 11(a)), el N° 1 tuvo un valor de 0.88 con un volumen de 1461.44 Å³ (Figura 11(b)), y el N° 3 tuvo un valor de 0.93 con un volumen de 708.65 Å³ (Figura 11(c)).

Tras identificar los pockets, se comparó su ubicación con el sitio activo de la acetilcolinesterasa. En la Figura 12(a) se muestran los residuos del sitio activo: SER203, HIS447, GLU334, TRP86, TYR337, TRP286, TYR72, PHE295 y PHE297 en la cadena A. El pocket N° 0 se muestra en la Figura 12(b), donde se observa que está ubicado en el sitio activo, de la cadena A. En la Figura 12(c), el donepezilo se encuentra dentro de este pocket. De manera similar, en la Figura 13(a) se identificaron los residuos que conforman el sitio activo, en la cadena B. Los pockets N° 1 y N° 3 se muestran en la Figura 13(b), y en la Figura 13(c), el donepezilo se encuentra en dichos pockets. Observar la localización del donepezilo dentro de estos pockets (ya incluida en la estructura proteica del archivo PDB:7E3H) que los mismos identificados por el servidor coinciden con los sitios activos reportados en la literatura. Esta correlación valida los resultados obtenidos mediante el análisis computacional.

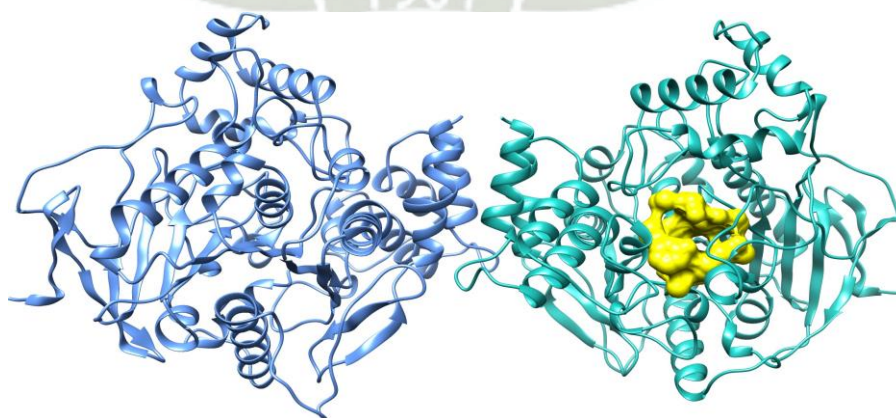
Figura 11. Identificación de los mejores pockets en el servidor PockDrug, visualizados desde una orientación frontal.



((a)) Pocket 0



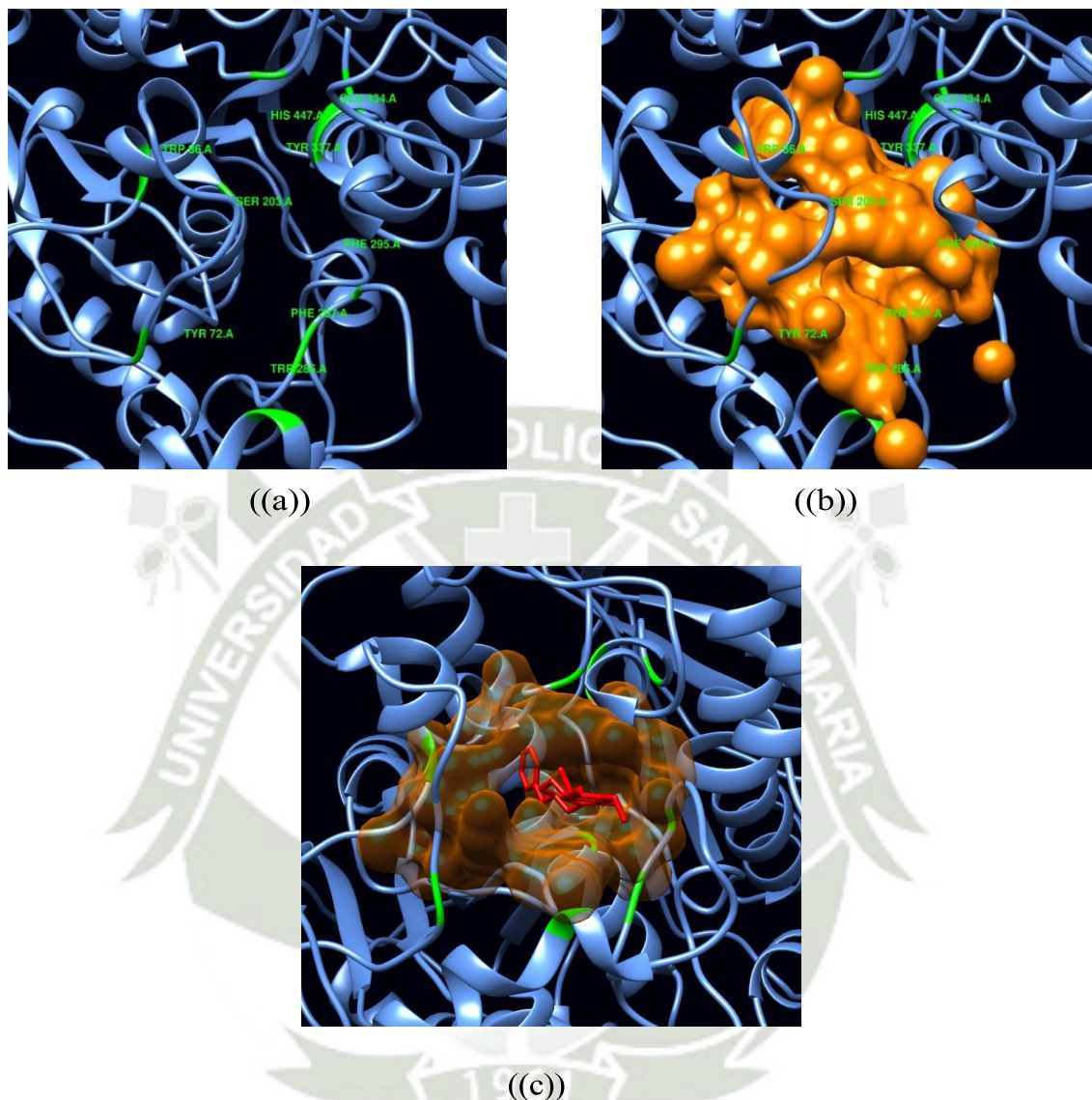
((b)) Pocket 1



((c)) Pocket 3

* (a) Representación en forma de superficie del pocket 0 de la cadena A. (b) y (c) Representación en forma de superficie del pocket 1 y 3 de la cadena B.

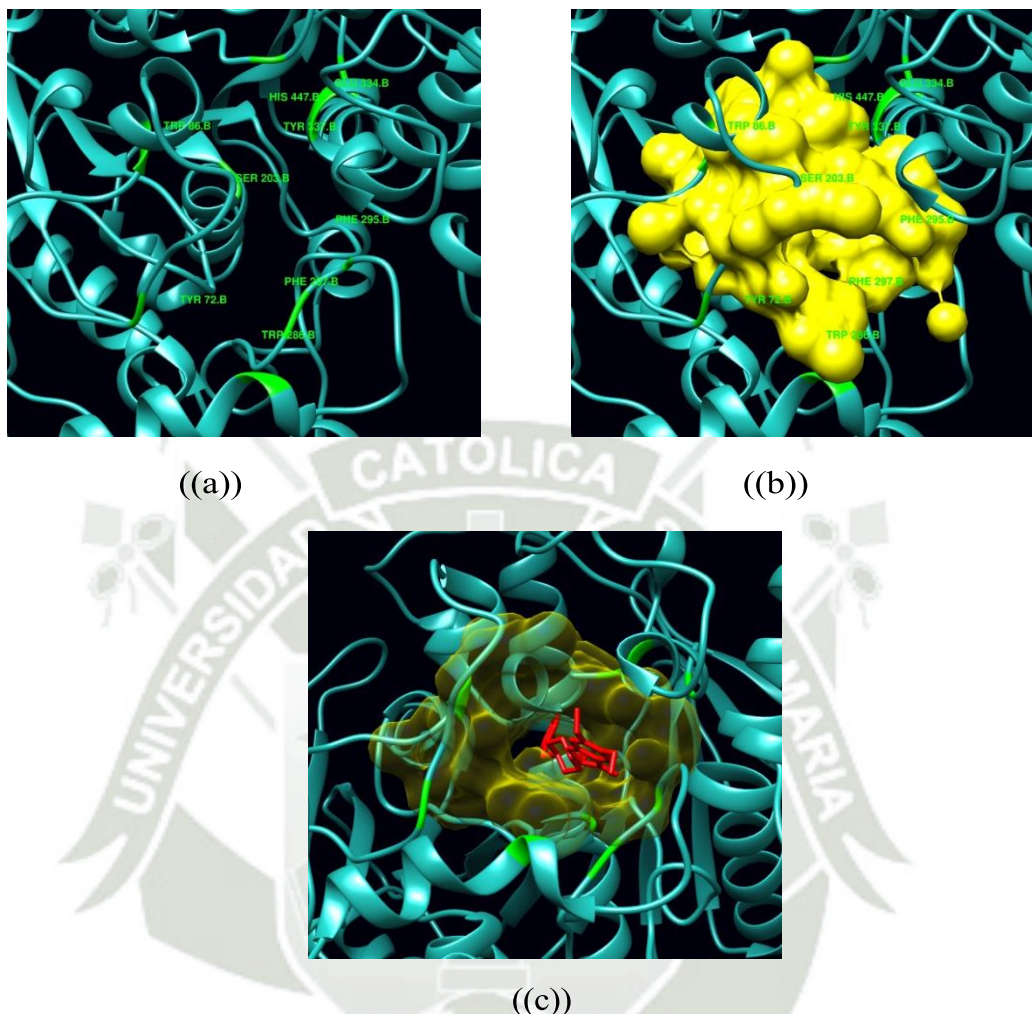
Figura 12. Identificación de aminoácidos que componen el sitio activo de la cadena A de AChE.



* (a) Residuos involucrados en la formación del pocket. (b) Representación en forma de superficie del pocket. (c) Localización del donepezilo en el pocket más drugable.

Finalmente, en la cadena B se consideraron dos pockets debido a sus volúmenes, los cuales se complementan para formar un volumen similar al obtenido con el pocket N° 0 de la cadena A. Asimismo, se pudo confirmar que estos residuos están distribuidos en los siguientes subsitios: el subsitio estérico o catalítico (SER203, HIS447 y GLU334), el subsitio aniónico o aromático (CAS) (TRP86 y TYR337), el sitio aniónico periférico (PAS) (TRP286 y TYR72), y el bolsillo acilo (PHE295 y PHE297), como se menciona en el estudio de Pitchai y colaboradores (86) y Dileep y colaboradores (33).

Figura 13. Identificación de aminoácidos que componen el sitio activo de la cadena B de AChE.



* (a) Residuos involucrados en la formación del pocket. (b) Representación en forma de superficie del pocket. (c) Localización del donepezilo en el pocket más drugable.

Finalmente, en la cadena B se consideraron dos pockets debido a sus volúmenes, los cuales se complementan para formar un volumen similar al obtenido con el pocket N° 0 de la cadena A. Asimismo, se pudo confirmar que estos residuos están distribuidos en los siguientes subsitios: el subsitio estérico o catalítico (SER203, HIS447 y GLU334), el subsitio aniónico o aromático (CAS) (TRP86 y TYR337), el sitio aniónico periférico (PAS) (TRP286 y TYR72), y el bolsillo acilo (PHE295 y PHE297), como se menciona en el estudio de Pitchai y colaboradores (86) y Dileep y colaboradores (33).

Además, el donepezilo se obtuvo del PDB ID: 7E3H, del mismo estudio realizado por Dileep y colaboradores (33), quienes cristalizaron la proteína junto al inhibidor, lo que permitió verificar la posición del fármaco en el sitio activo. Para validar la relevancia de

los pockets seleccionados, se comparó su ubicación con datos experimentales y se verificó su accesibilidad a los sitios activos de ambas cadenas, comprobando que el servidor PockDrug identificó correctamente los pockets en relación con los sitios activos.

3.3. Análisis del cribado virtual

Los 251 metabolitos secundarios derivados de líquenes, el donepezilo (fármaco inhibidor de referencia) y la acetilcolina (sustrato endógeno) fueron evaluados en el sitio activo de AChE utilizando PyRx/AutoDock Vina. Para esta investigación, se realizaron cuatro cálculos de cribado virtual, lo cual mostró una alta reproducibilidad, evidenciada por la baja variabilidad en las energías de afinidad obtenidas para la mayoría de los compuestos, como se ve en el Anexo Tabla C.1.

Tabla 1. Valores de energía de afinidad entre los mejores compuestos con igual o mejor desempeño que el donepezilo.

Complejo	Afinidad de Unión (kcal/mol)				
	Cálculo I	Cálculo II	Cálculo III	Cálculo IV	Promedio±DE
AChE_090	-10.7	-10.7	-10.7	-10.7	-10.70 ± 0.00
AChE_204	-10.6	-10.6	-10.6	-10.6	-10.60 ± 0.00
AChE_179	-10.4	-10.4	-10.3	-10.4	-10.38 ± 0.05
AChE_190	-10.2	-10.2	-10.2	-10.2	-10.20 ± 0.00
AChE_116	-10.0	-10.0	-10.0	-10.0	-10.00 ± 0.00
AChE_186	-9.9	-10.0	-10.0	-10.0	-9.98 ± 0.05
AChE_092	-9.9	-9.9	-10.0	-10.0	-9.95 ± 0.06
AChE_135	-9.9	-9.9	-9.9	-9.9	-9.90 ± 0.00
AChE_172	-9.9	-9.9	-9.9	-9.9	-9.90 ± 0.00
AChE_201	-9.9	-9.9	-9.9	-9.9	-9.90 ± 0.00
AChE_189	-9.8	-9.8	-9.8	-9.8	-9.80 ± 0.00
AChE_191	-9.8	-9.8	-9.8	-9.8	-9.80 ± 0.00
AChE_206	-9.8	-9.8	-9.8	-9.8	-9.80 ± 0.00

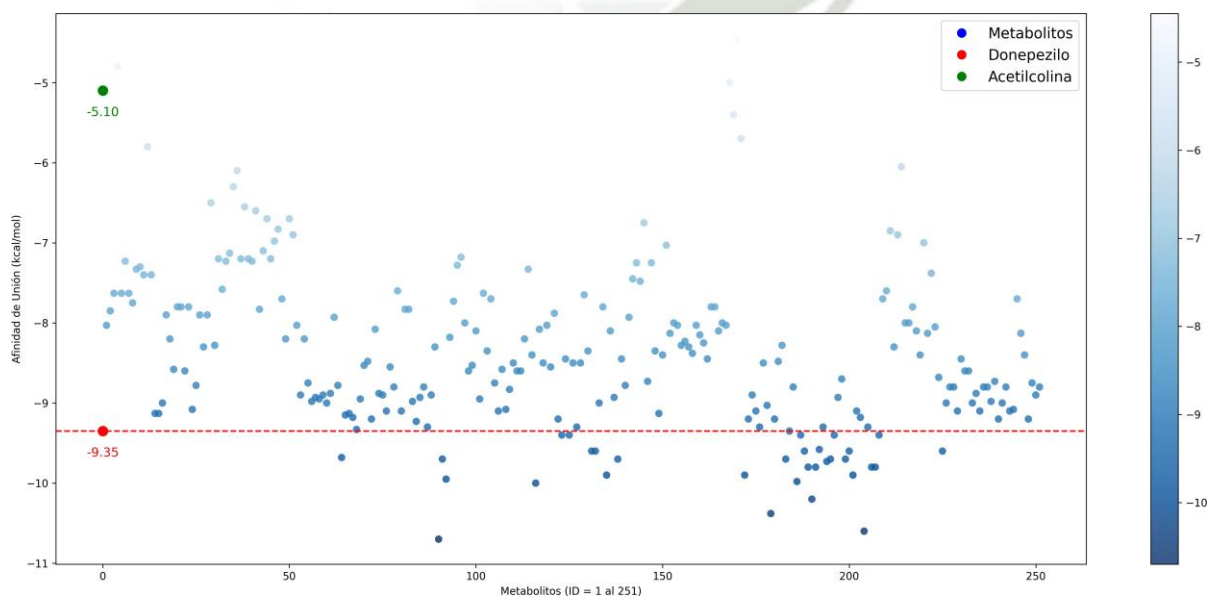
AChE_207	-9.8	-9.8	-9.8	-9.8	-9.80 ± 0.00
AChE_194	-9.7	-9.7	-9.7	-9.8	-9.73 ± 0.05
AChE_091	-9.7	-9.7	-9.7	-9.7	-9.70 ± 0.00
AChE_138	-9.7	-9.7	-9.7	-9.7	-9.70 ± 0.00
AChE_183	-9.7	-9.7	-9.7	-9.7	-9.70 ± 0.00
AChE_195	-9.7	-9.7	-9.7	-9.7	-9.70 ± 0.00
AChE_199	-9.7	-9.7	-9.7	-9.7	-9.70 ± 0.00
AChE_064	-9.7	-9.7	-9.6	-9.7	-9.68 ± 0.05
AChE_131	-9.6	-9.6	-9.6	-9.6	-9.60 ± 0.00
AChE_132	-9.6	-9.6	-9.6	-9.6	-9.60 ± 0.00
AChE_188	-9.6	-9.6	-9.6	-9.6	-9.60 ± 0.00
AChE_200	-9.6	-9.6	-9.6	-9.6	-9.60 ± 0.00
AChE_225	-9.6	-9.6	-9.6	-9.6	-9.60 ± 0.00
AChE_192	-9.6	-9.6	-9.6	-9.5	-9.58 ± 0.05
AChE_123	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.40 ± 0.00
AChE_125	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.40 ± 0.00
AChE_187	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.40 ± 0.00
AChE_196	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.40 ± 0.00
AChE_208	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.40 ± 0.00
AChE_184	-9.3	-9.3	-9.5	-9.3	-9.35 ± 0.10
AChE_Donepezilo	-9.6	-8.9	-9.2	-9.7	-9.35 ± 0.37

La Tabla 1 presenta los mejores compuestos con una afinidad mayor y/o igual al donepezilo. El análisis del cribado virtual y acoplamiento molecular reveló 33 compuestos con afinidad superior a la acetilcolinesterasa, evidenciada por energías de unión menores a -9.35 kcal/mol, valor de referencia del donepezilo. Esto indica que estos compuestos muestran una mayor afinidad por el sitio activo. En contraste, la acetilcolina presentó una energía de unión de -5.10 kcal/mol, mostrando su menor afinidad por el sitio activo en comparación con los compuestos identificados. Para trabajar con un único valor representativo de afinidad de unión, se calculó

el promedio y la desviación estándar (DE) de cada compuesto. Mientras que algunos compuestos mostraron una DE de 0, indicando resultados altamente consistentes, otros, como el compuesto 149, presentaron una DE ligeramente mayor (0.57 kcal/mol), reflejando una variabilidad moderada. Sin embargo, no existe un valor límite absoluto universal que deba cumplirse en el análisis de la desviación estándar de los resultados de energía de unión. No obstante, existen criterios prácticos y comparativos entre compuestos, así como verificar la coherencia de los resultados obtenidos a partir de diferentes corridas. Dado que las desviaciones estándar no son extremas, los resultados pueden considerarse confiables. Además, compararlos con el donepezilo nos ayuda a tener referencia de un fármaco que se une a la enzima.

En la Figura 14 se puede observar la representación en un scatter plot de los resultados de los 251 compuestos. En la variable X se encuentran los compuestos numerados del 001 al 251 (de izquierda a derecha) y en la variable Y se muestran los valores de afinidad de unión. Así mismo, se observa como un punto rojo el valor del donepezilo (-9.35 kcal/mol) y en color verde el de la acetilcolina (-5.10 kcal/mol), como referencia. Aquellos compuestos con valores iguales o menores al del donepezilo se encuentran en la parte inferior del gráfico (por debajo línea punteada roja), siendo 33 compuestos, junto al donepezilo, los que poseen mayor afinidad por la AChE. Además, se muestra una escala de colores, donde los tonos más azules corresponden a los valores más negativos, y los colores más claros indican valores mayores.

Figura 14. Scatter plot de las afinidades de unión de los 251 compuestos, incluyendo el donepezilo y la acetilcolina, generado en Python.



Estos resultados indicaron que los 33 compuestos tienen mayor afinidad por la proteína objetivo. Sin embargo, es importante considerar que, en el acoplamiento molecular realizado, la proteína se mantuvo en una conformación rígida, mientras que los ligandos tuvieron flexibilidad para adoptar distintas conformaciones. Por lo cual, los valores obtenidos se basaron en las mejores afinidades correspondientes a las poses más favorables generadas por el software.

3.4. Análisis de propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas

Una vez identificados los compuestos con mayor afinidad, se analizaron las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los 33 compuestos utilizando el servidor SwissADME, una herramienta que permite estimar diversas propiedades farmacocinéticas a partir de las características fisicoquímicas de las moléculas y evaluar, de manera cualitativa, su similitud con fármacos ya aprobados, con el fin de seleccionar los candidatos más prometedores. Los cuales pueden ser posteriormente evaluados mediante ensayos *in vitro* o *in vivo*. Además, se predijeron las propiedades de toxicidad utilizando el software DataWarrior, a partir de las cadenas SMILES correspondientes a los compuestos, como se muestra en el Anexo, Tabla E.1.

Las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos deben estar dentro de ciertos rangos para ser considerados candidatos a fármacos orales, conforme a los criterios establecidos por el servidor SwissADME. Estos criterios incluyen: la lipofilidad ($\log P_{ow}$) debe ser entre -0.7 y +6.0; el número de donantes de enlace de hidrógenos (HBD, por sus siglas en inglés) debe ser ≤ 5 ; el número de aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA, por sus siglas en inglés) debe ser ≤ 10 ; el peso molecular (PM) debe encontrarse entre 150 y 500 g/mol; la polaridad, que es el área superficial polar topológica (TPSA, por sus siglas en inglés), debe estar entre 20 y 130 Å²; la solubilidad (Log S-ESOL) debe oscilar entre -6 y 0; la saturación, representada por la fracción de carbonos con hibridación sp³ (Fracción Csp³), debe estar entre 0.25 y 1; y la flexibilidad, determinada por el número de enlaces rotables (NrotB, por sus siglas en inglés), no debe superar los 9 enlaces. (77,87) Los datos correspondientes a los 33 compuestos, incluyendo todas las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas obtenidas mediante SwissADME, se presentan en su totalidad en el Anexo, Tabla D.1 y Tabla D.2.

Primeramente, de todos los datos que el servidor nos proporciona, este nos indica una evaluación directa sobre la capacidad de los compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), indicando una respuesta binaria (SI/NO) respecto a su permeabilidad. Entre los compuestos analizados, se consideró como criterio principal la capacidad de atravesar

la BHE, un factor fundamental en el diseño de fármacos dirigidos al sistema nervioso central, dado que la BHE actúa como una barrera selectiva que limita el paso de muchas sustancias al cerebro. En base a este criterio, solo 5 de los 33 compuestos evaluados demostraron ser permeables a la BHE, al igual que el fármaco de referencia, donepezilo. A partir de estos resultados, se procederá a analizar sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de estos cinco compuestos (172, 179, 186, 201 y 225) en comparación con el donepezilo.

Generalmente, para que un compuesto sea considerado candidato a fármaco por vía oral, debe cumplir con la regla de los cinco de Lipinski, esta regla ayuda a predecir si una molécula activa posee propiedades necesarias para ser biodisponible por vía oral. Esta regla establece que un medicamento o compuesto con buena actividad oral no debe superar ciertos valores en peso molecular ($PM \leq 500$ g/mol), número de donadores ($HBD \leq 5$) y aceptores ($HBA \leq 10$) de enlaces de hidrógeno, así como en lipofilicidad ($LogP \leq 5$). Por lo tanto, los compuestos presentados en la Tabla 2 cumplen con estos criterios, lo que los convierte en buenos candidatos a fármacos para el blanco terapéutico. Además de contener otros valores como el NrotB, TPSA, solubilidad, puntuación de biodisponibilidad, absorción GI y permeabilidad a la BHE.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los compuestos que atraviesan la BHE.

Compuesto	PM g/mol	LogP	HBD	HBA	NrotB	TPSA Å ²	LogS	Puntuación de biodisponibilidad	Absorción GI	Permeabilidad BHE
Donepezilo	379.49	4	4	0	6	38.77	-4.81	0.55	ALTA	SI
172	306.27	2.61	5	1	1	72.83	-3.71	0.85	ALTA	SI
179	290.27	2.95	4	0	2	52.60	-3.79	0.85	ALTA	SI
186	254.24	2.38	4	2	0	74.60	-4.11	0.55	ALTA	SI
201	292.29	2.46	4	2	2	74.60	-3.82	0.85	ALTA	SI
225	256.25	2.76	4	2	0	70.67	-4.20	0.55	ALTA	SI

La representación gráfica de estos resultados se observa en la Figura 15, donde se puede observar la similitud en los perfiles de los compuestos seleccionados con respecto al donepezilo, especialmente en lo relativo a su capacidad para atravesar la BHE, que se observa en la Figura 16.

Figura 15. Representación gráfica de los valores de las propiedades fisicoquímicas.

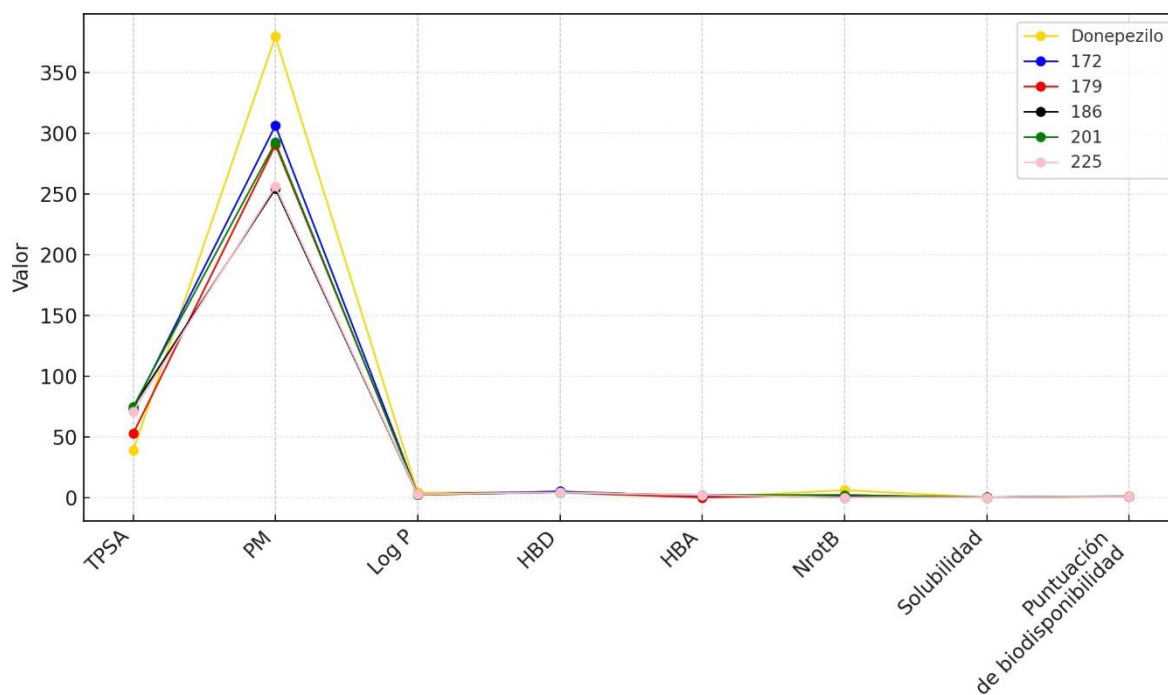
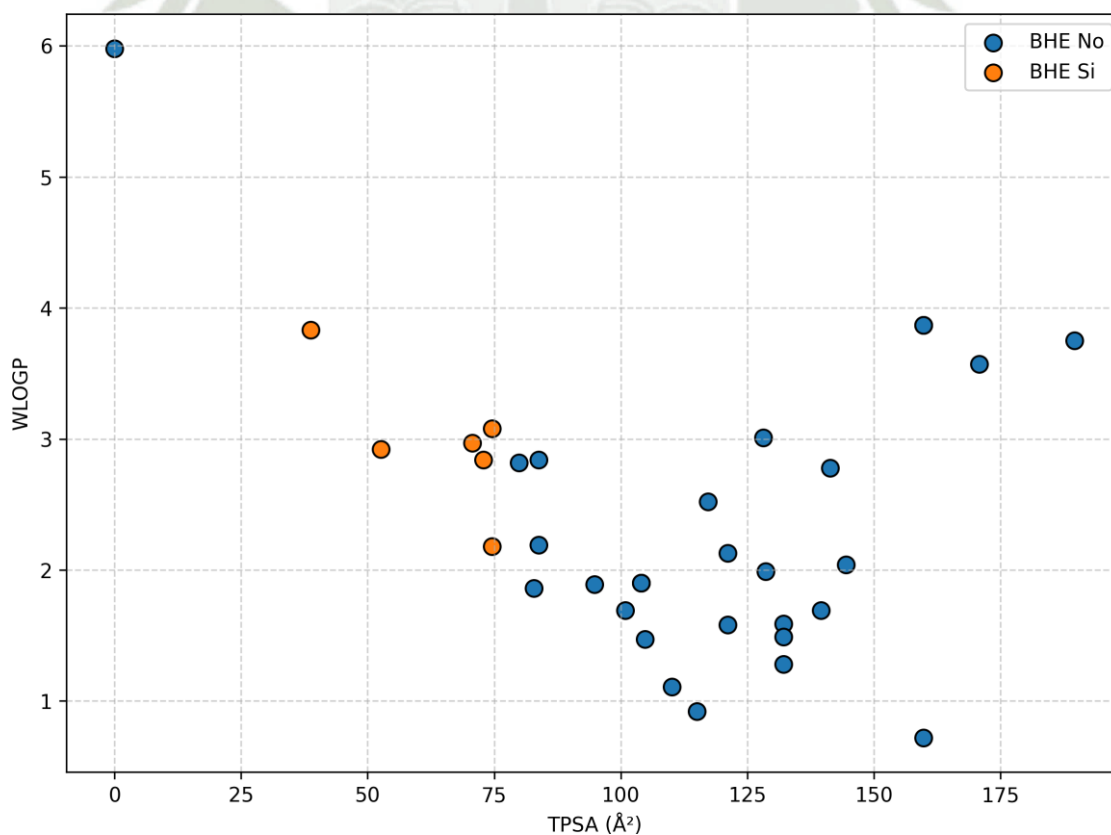


Figura 16. Comparación de WLogP y TPSA de 33 compuestos con mayor afinidad junto a donepezilo en Python.



En el estudio de Müller y colaboradores (88) se realizó un análisis comparativo de los criterios de TPSA para compuestos con actividad en el SNC, donde se muestran diferencias significativas entre fármacos y productos naturales. Según Waterbeem y colaboradores (89), se establece un límite de $TPSA < 90 \text{ \AA}^2$ para medicamentos activos, y Ghose y colaboradores (90) proponen un rango más estricto de $TPSA < 76 \text{ \AA}^2$ (óptimo de 25 - 60 $\text{ \AA}^2$). Sin embargo, en este estudio se analizaron compuestos esteroides que presentaron valores de TPSA superiores a 90 $\text{ \AA}^2$, lo cual coincide con lo reportado por Grabowski y colaboradores (91), donde el TPSA promedio en productos naturales es $< 113 \text{ \AA}^2$. Esta diferencia se debe a que los esteroides tienen una estructura molecular con más átomos de oxígeno, lo cual incrementa sustancialmente la polaridad superficial. Por otro lado, Fayed y colaboradores (92) indican que para que un compuesto atraviese la barrera hematoencefálica debe presentar un LogP entre 2 y 5, y un $TPSA \leq 70 \text{ \AA}^2$. Además, el LogP es un factor crucial para determinar la lipofilicidad de un compuesto. En el estudio de Mande y colaboradores (93), se indica que los valores de LogP oscilan entre 1.84 y 5.0. Este rango sugiere una permeabilidad moderada a alta a través de las membranas biológicas, lo cual se observa en los valores de LogP de los metabolitos analizados.

Con base en lo anterior, se consideraron los criterios del estudio de Fayed y lo mencionado por Ghose. Donde, todos los compuestos que atraviesan la BHE indicado por el servidor, presentaron un $TPSA \leq 76 \text{ \AA}^2$ y un LogP entre 2 y 5, lo cual se observa en la Figura 16. De este modo, cumplen con los criterios de permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), destacándose como los candidatos más prometedores. Aunque, los compuestos 172, 186 y 201, superan ligeramente el límite de TPSA (Fayed, $\leq 70 \text{ \AA}^2$), pueden considerarse válidos según los criterios indicados por Ghose y los umbrales establecidos por Grabowski para productos naturales.

Es importante destacar que la BHE protege a las neuronas de los factores presentes en el torrente sanguíneo, lo cual es importante para el correcto funcionamiento sináptico y neuronal. La BHE está conformada por células endoteliales, la lámina basal capilar, los pericitos y los pies perivasculares de los astrocitos. (94) Esta barrera posee mecanismos especializados que regulan el ingreso de moléculas esenciales al cerebro, tales como la difusión simple, el transporte mediado por transportadores y transporte activo de eflujo. Sin embargo, se ha visto que la integridad de la BHE está dañada en pacientes con EA por un defecto en sus componentes, produciendo una disrupción en la membrana permitiendo el paso de otros compuestos tóxicos al SNC. (95)

En el estudio realizado por Sweeney y colaboradores (96), se evidenció que los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentan una disrupción significativa de la barrera hematoencefálica (BHE), lo que permite el ingreso de moléculas neurotóxicas, células inflamatorias como macrófagos y neutrófilos, y compuestos de la sangre como trombina e inmunoglobulinas (IgG). Los mecanismos responsables de esta disrupción en la EA han sido identificados. Se observó una disminución en el número de pericitos, células esenciales para el mantenimiento de la integridad de la BHE, así como una reducción en la actividad de la glicoproteína P (P-gp), lo que impide la eliminación adecuada de $A\beta$. Además, se reportaron alteraciones estructurales como la pérdida de uniones estrechas entre células endoteliales (estudios en cerebros post mortem), la infiltración de células inmunes periféricas y la activación de células gliales, lo que conlleva a la liberación de citocinas proinflamatorias.

De este modo, la disrupción de la BHE va a permitir el ingreso de xenobióticos, y reducir la eliminación de $A\beta$ (este detalle se mencionará más adelante, cuando se hable específicamente de la P-gp). Sin embargo, la ruptura de la BHE también afecta la entrega de fármacos, ya que para esto se va a requerir de vasos sanguíneos funcionales y estructuras saludables. Los agentes terapéuticos probablemente pueden quedarse atrapados en el tejido alterado entre los espacios perivasculares agrandados, impidiendo que lleguen a sus objetivos. (96) Entonces, con base en esto, se podría deducir que los fármacos dirigidos no generarían toxicidad, ya que existe la posibilidad de que no ingresen completamente.

En la Tabla 2 y en la Tabla 3 se presentan las propiedades farmacocinéticas de los cinco compuestos con permeabilidad a la BHE. SwissADME permite estimar las propiedades farmacocinéticas clave sobre la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los compuestos. En cuanto a la absorción, se puede evaluar mediante absorción gastrointestinal (GI), así como mediante la determinación de si los compuestos son sustratos de la P-gp. La distribución se infiere a través de la precondición de la capacidad de atravesar la BHE, mientras que el metabolismo se analiza mediante la inhibición potencial de isoformas del citocromo P450 (CYP450). Estas predicciones del metabolismo pueden ofrecer una idea indirecta sobre su excreción, ya que un metabolismo reducido puede influir en la eliminación del fármaco. El análisis del resto de los metabolitos se encuentra en el Anexo, Tabla D.2, ya que estos parámetros son clave en el desarrollo de fármacos.

Tabla 3. Perfil de interacción con P-gp y enzimas CYP de los metabolitos con SwissADME.

ID	Sustrato P-gp	Inhibición CYP1A2	Inhibición CYP2C19	Inhibición CYP2C9	Inhibición CYP2D6	Inhibición CYP3A4
172	NO	SI	NO	SI	NO	NO
179	NO	SI	SI	SI	NO	NO
186	NO	SI	NO	NO	NO	SI
201	NO	SI	NO	SI	NO	SI
225	NO	SI	NO	NO	SI	SI
Donepezilo	SI	NO	NO	NO	SI	SI

Todos los compuestos mostraron una absorción GI alta y no ser sustratos de la P-gp, una proteína transmembrana que regula el eflujo activo de fármacos y compuestos xenobióticos. En el estudio de Sweeney y colaboradores (96), se señala que esta proteína también participa en la eliminación de A β a través de la BHE, pero este proceso requiere de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad tipo 1 (LRP1). En el estudio de Wang y colaboradores (97), se señala que la disfunción de la BHE altera el transporte normal de A β , y esto depende de transportadores que se encuentran en las células endoteliales, siendo la LRP1 y P-gp quienes eliminan los A β por eflujo al torrente sanguíneo, a diferencia del receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE), que ingresa A β circulantes al cerebro mediante influjo. Esto forma parte de la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, dado que los compuestos no son sustratos de la P-gp, es probable no tendrán dificultades para atravesar la BHE.

En el estudio de Mandé y colaboradores (93), se menciona que la P-gp también regula el transporte de fármacos en el lumen intestinal. A partir de esto, se comprende que la P-gp desempeña un doble papel. Por lo tanto, los compuestos que no son sustratos de este transportador tendrían mayor posibilidad de atravesar el lumen intestinal, aumentando así su biodisponibilidad.

Por otro lado, cada uno de los compuestos afecta de forma distinta a las isoenzimas involucradas en el metabolismo de fármacos: el compuesto 179 inhibe CYP1A2, CYP2C19 y CYP2C9; el 186 inhibe CYP1A2 y CYP3A4; el 172 inhibe CYP1A2 y CYP2C9; el 201 inhibe CYP1A2, CYP2C9 y CYP3A4; y el 225 inhibe CYP1A2, CYP2D6 y CYP3A4. Dado que estos compuestos no son sustratos de la P-gp, es posible que su excreción se lleve a cabo

predominantemente a través del metabolismo por enzimas de la familia del citocromo P450. En el estudio de Chennai y colaboradores (28), se menciona que, entre todas las enzimas de esta familia, la CYP3A4 es la isoforma más significativa, ya que más de la mitad de los medicamentos de uso clínico interactúan con ella. En el estudio de Khedraoui y colaboradores (98), destaca la importancia de las isoformas CYP3A4 y CYP2D6 en el metabolismo de fármacos. De manera complementaria, Hakkola y colaboradores (99) enfatizan el papel fundamental de la isoforma CYP3A4 en la oxidación y eliminación de una amplia variedad de xenobióticos, incluyendo remedios herbales y otros productos naturales.

Sin embargo, aunque la CYP3A4 tenga un rol predominante en el metabolismo de muchos xenobióticos, la eliminación de compuestos no depende solo de una única isoforma. Aun así, para evaluar si un compuesto puede ser un buen candidato a fármaco, es importante priorizar que no cause interacciones farmacológicas. Esto es especialmente relevante en el caso del Alzheimer, ya que afecta principalmente a personas adultas que suelen tomar varios medicamentos al mismo tiempo (polifarmacia). Por lo que, los compuestos 172 y 179 sobresalen al no inhibir al CYP3A4.

La biodisponibilidad oral es un parámetro crítico que determina la fracción de fármaco que alcanza la circulación sistémica. En este estudio, la mayoría de los compuestos presentaron una puntuación de biodisponibilidad de 0.55, igual o superior al del donepezilo. Este indicador definido por Martin (100), como la probabilidad de que la fracción absorbida (F) supere el 10% en ratas, que se basa en la superficie polar accesible (PSA) y el cumplimiento de las reglas de Lipinski. Las puntuaciones de biodisponibilidad fueron obtenidas del servidor SwissADME. Los resultados obtenidos en este estudio se alinean con lo reportado por Periyasamy y colaboradores (101), quienes establecen un rango óptimo entre 0.55 - 0.85, según el criterio de Martin. Adicionalmente, como señala Mande y colaboradores (93), la solubilidad depende de los grupos donadores/aceptores de enlaces de hidrógeno, parámetros que cumplen la Regla de Lipinski.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) categoriza fármacos según solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal para definir su elegibilidad para bioexención (exención de estudios *in vivo* al demostrar bioequivalencia *in vitro*). Para permeabilidad, el metoprolol es la referencia estándar, considerándose alta permeabilidad cuando el logP del compuesto supera su valor de referencia ($\log P = 2.15$). Respecto a la solubilidad, se clasifica como alta cuando el cociente entre la dosis máxima (mg) y la solubilidad (mg/mL) es < 250 mL. Los compuestos

que cumplen ambos criterios (alta solubilidad + alta permeabilidad) corresponden a Clase I y son candidatos a bioexención. En este análisis, los compuestos exhiben $\log P > 2.15$ (sugiriendo alta permeabilidad), pero su solubilidad varia. La solubilidad de los compuestos se clasifica en términos cualitativos según su valor $\log S$ de la siguiente manera: los valores menores a -10 se consideran insolubles, los que se encuentran entre -10 y -6 son poco solubles, los que oscilan entre -6 y -4 se clasifican como moderadamente solubles, los que están entre -4 y -2 se definen como solubles, los que tienen valores entre -2 y 0 son muy solubles, y finalmente, aquellos con valores iguales o superiores a 0 se denominan altamente solubles, como se describe en el servidor.

Sin embargo, la clasificación BCS requiere la dosis terapéutica para evaluar la solubilidad, dato no disponible para estos compuestos. Pese a esto, sus valores de $\log S$ (Tabla 2) de los compuestos 172, 179 y 201 muestran ser solubles, a diferencia del 186 y 225 que son moderadamente solubles, al igual que el donepezilo. Observando que ninguna presenta alta solubilidad, lo que los situaría tentativamente en Clase II (alta permeabilidad/baja solubilidad). Para el donepezilo, la literatura reporta ambigüedad: mientras algunos estudios lo clasifican como Clase I (aprovechando la alta solubilidad de su sal de clorhidrato), otros lo ubican en Clase II como menciona el estudio de De Campos y colaboradores (102).

Es fundamental que un posible candidato a fármaco no muestre un perfil tóxico, ya que la seguridad es un criterio esencial en el desarrollo farmacológico. La Tabla 4 presenta el riesgo de toxicidad de los compuestos analizados utilizando el software DataWarrior, el cual evalúa la mutagenicidad, tumorigenicidad, efectos reproductivos e irritantes. El programa posee una base de datos interna y las propiedades de toxicidad se predicen a partir de las estructuras químicas, utilizando similitud estructural. (64)

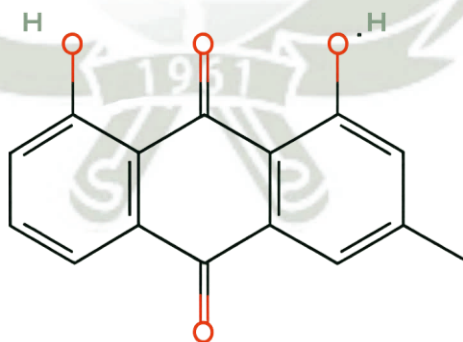
Tabla 4. Propiedades toxicas de los compuestos con Datawarrior.

ID	Mutagenicidad	Tumorigenicidad	Efecto reproductivo	Efecto irritante
172	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA
179	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA
186	ALTA	NINGUNA	NINGUNA	ALTA
201	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA
225	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA
Donepezilo	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA

Las alertas estructurales, o toxicóforos, son patrones cuya presencia puede asociarse con efectos adversos con un punto final tóxico. Al observar los datos, el compuesto 186 presenta un alto riesgo de mutagenicidad y efectos irritantes, lo cual podría limitar su viabilidad terapéutica, a diferencia de los demás compuestos, que no presentan ningún tipo de riesgo toxicológico según estos parámetros.

En la Figura 17 se muestra la estructura química del compuesto 186 (crisofanol). Se ha informado que este compuesto es mutagénico debido a la presencia de la subestructura 1,8-dihidroxiantraquinona, una característica mencionada por el estudio de Srinivas y colaboradores (103), donde señalan que dicha estructura está asociada con efectos mutagénicos. Numerosos estudios han demostrado la actividad mutagénica de las antraquinonas en ensayos con cepas de Salmonella. De hecho, el Grupo de Trabajo de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (104), describe que la carcinogenicidad de la 2-hidroxiantraquinona podría explicarse por un mecanismo mutagénico. Estos hallazgos provienen de estudios en cepas bacterianas y en ratas; sin embargo, aún no se dispone de datos en humanos. Así mismo, en otros estudios sobre alertas estructurales como el de Basan y colaboradores (105), mencionan que la antraquinona es una subestructura característica de compuestos potencialmente mutagénicos. Esta información respaldaría, el resultado que nos dio el programa.

Figura 17. Estructura bidimensional de Crisofanol.

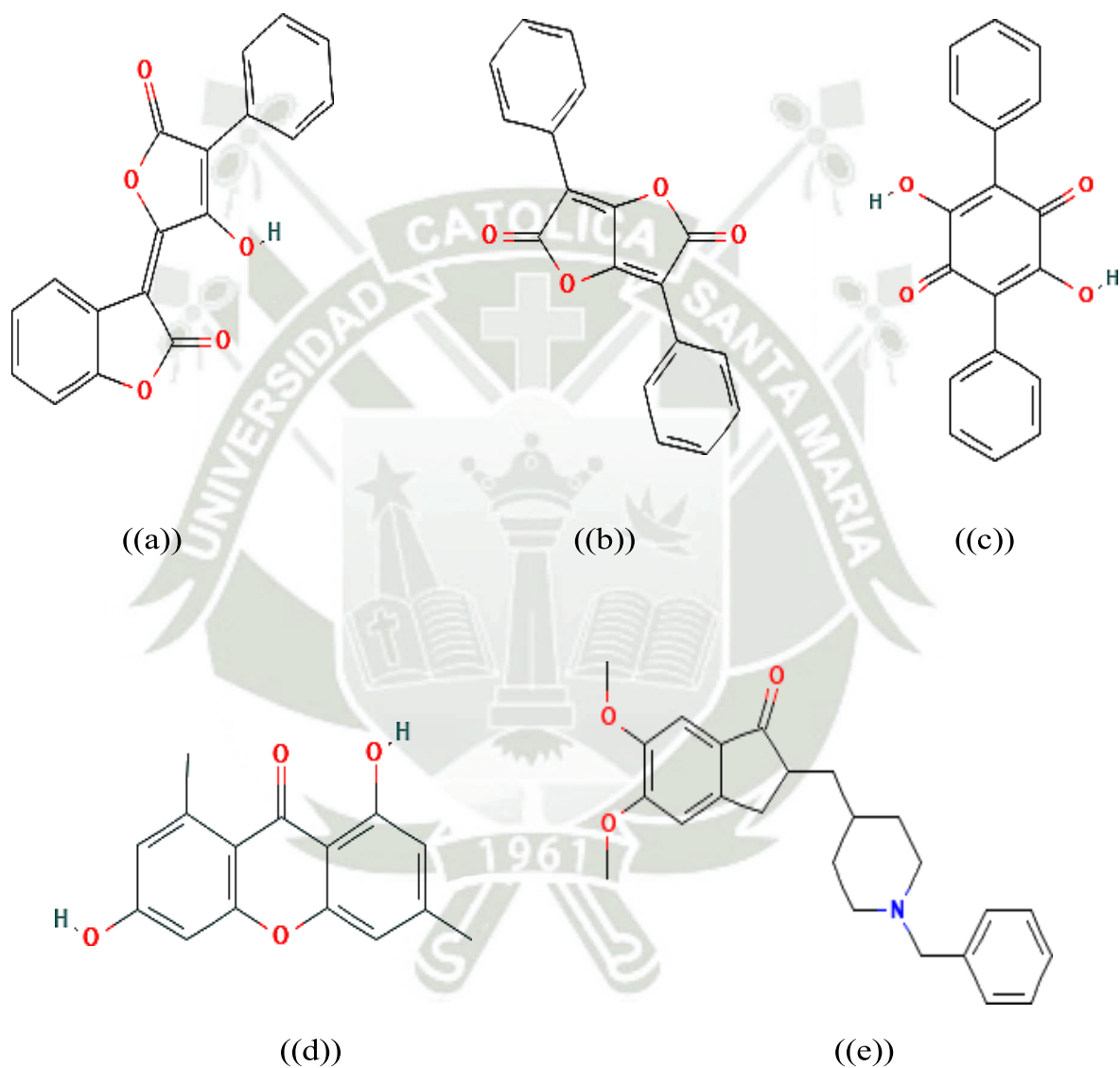


* Fuente: PubChem.

A su vez, los toxicóforos comúnmente asociados con la toxicidad incluyen, entre otros, epóxidos, haluros de alquilo, quinonas y grupos funcionales con nitrógeno. (106) Por lo tanto, únicamente cuatro compuestos: el 172 (calicina), 179 (dilactona de ácido pulvínico), 201 (ácido

polipórico) y 225 (1,6-dihidroxi-3,8-dimetilxantona), cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 18, junto con el donepezilo, no presentaron tales subestructuras generadoras de toxicidad.

Figura 18. Estructura bidimensional de los compuestos que atraviesan la BHE y no tóxicos.



* (a) 172. (b) 179. (c) 201. (d) 225. (e) donepezilo. Fuente: PubChem.

En un estudio realizado por Fernandes y colaboradores (107), se menciona que los derivados del ácido pulvínico, como la calicina (172) y la dilactona de ácido pulvínico (179), son fotoprotectores. Otro estudio de Murugan y colaboradores (108), detalla que la calicina tiene la

capacidad de absorber radiación ultravioleta (UV), tanto UV-A como UV-B, y prevenir el daño celular asociado con la exposición solar.

En el estudio de Kraft y colaboradores (109), identificaron al ácido polipórico (**201**) como inhibidor de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH), con actividad antitumoral al inhibir dicha enzima, importante en la proliferación celular en modelos animales. En ratas, se administraron dosis de 100 a 800 mg/kg por vía oral, lo que provocó disminución de la actividad locomotora, depresión de la respuesta visual y alteraciones en maniobras motoras, acompañada con insuficiencia hepatorrenal, acidosis metabólica, hipocalcemia e hipokalemia. En cultivos celulares de neuronas y glía de rata, se redujo la proliferación celular dependiente de la dosis, con una concentración inhibitoria media (IC₅₀) que osciló entre 10^{-4} y 10^{-3} M. En las células neuronales, la sensibilidad se observó a concentraciones de 0.1 mM y 1.0 mM, lo que produjo daño celular significativo, como necrosis. En células gliales, la toxicidad fue menor; a 0.1 mM no hubo efectos significativos, pero sí a 1.0 mM. Sin embargo, estas dosis y concentraciones son muy elevadas.

Por último, para el compuesto 1,6-dihidroxi-3,8-dimetilxanten-9-ona (**225**) no se han encontrado estudios que lo describan de forma específica.

La ausencia de investigaciones que evalúen la toxicidad de los compuestos 172, 179 y 225 en modelos in vitro o in vivo, abre nuevas posibilidades para futuras líneas de investigación. En contraste el compuesto 201 ya ha sido evaluado, aunque a dosis muy elevadas, lo que deja margen para investigaciones detalladas y con concentraciones más ajustadas.

Finalmente, al realizar una comparación estructural con toxicóforos ya descritos en otras investigaciones, no se identificaron grupos funcionales asociados a efectos tóxicos en los compuestos analizados, lo que podría evidenciar de manera preliminar que sean seguros. Estos compuestos además de tener alta afinidad por la acetilcolinesterasa, también presentan propiedades farmacocinéticas favorables compatibles con fármacos de administración oral según el análisis de perfil ADMET.

3.5. Análisis de la dinámica molecular AChE-Ligando

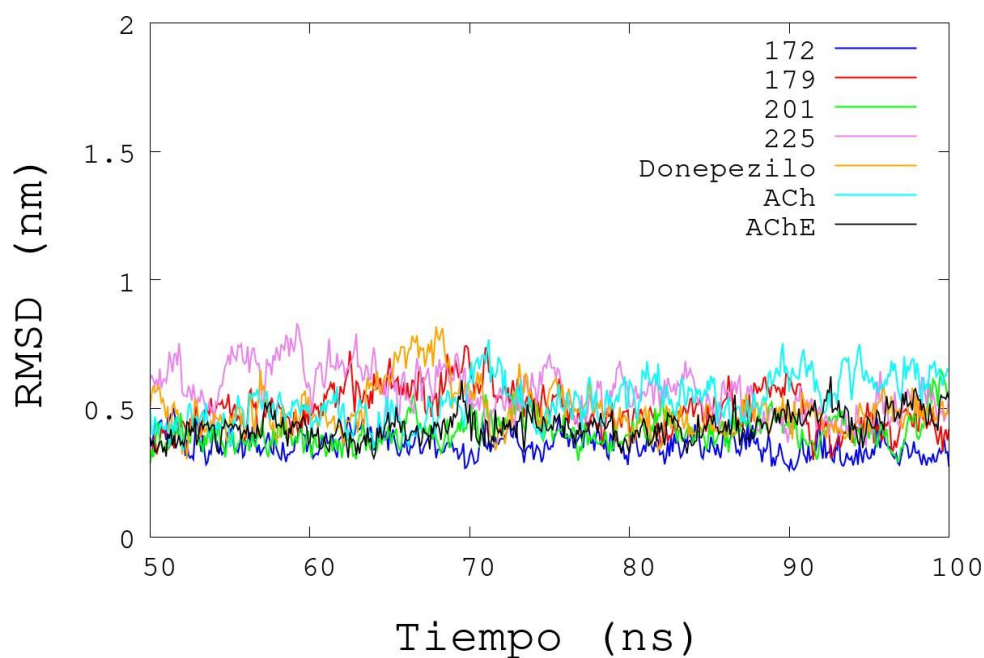
Los cuatro compuestos, junto con donepezilo, acetilcolina y la proteína sin ligando, se sometieron a simulaciones de dinámica molecular a 100 ns en GROMACS para evaluar la estabilidad del complejo proteína-ligando y la proteína sin ligando bajo condiciones fisiológicas.

Se analizó la estabilidad y flexibilidad de la proteína sin ligando y con los ligandos mediante la Desviación Cuadrática Media de la Raíz (RMSD, por sus siglas en inglés) y la Fluctuación Cuadrática Media de la Raíz (RMSF, por sus siglas en inglés). También se evaluó el radio de giro (RG, por sus siglas en inglés) para medir la compactación de la proteína. Además, se calculó el Área Superficial Accesible al Solvente (SASA, por sus siglas en inglés) para comprender los cambios conformacionales que afectan la exposición de residuos hidrofóbicos durante la unión con una molécula.

La Figura 19 muestra el análisis del RMSD durante el intervalo de 50 a 100 ns. Se observan fluctuaciones de los sistemas en el intervalo de 0.3 a 0.8 nm, y no hay desviaciones mayores a 1,0 nm, lo que indica que la estructura proteica permanece estable a pesar de la presencia de un ligando en cada cadena. El donepezilo presenta picos de hasta 0.75 nm cerca de los 70 ns; a partir de los 75 ns, su RMSD disminuye y oscila entre 0.45 y 0.50 nm, lo que denota una mayor movilidad. La acetilcolina, en cambio, muestra fluctuaciones superiores a las del donepezilo a partir de los 70 ns; esto se debe a que la ACh no mejora su estabilidad junto con la proteína, ya que en ese período uno de los sustratos se retira del sitio activo. Esto es comprensible, ya que el sustrato natural de la proteína es un compuesto que es catalizado por esta, y por ello no presenta una alta afinidad ni persiste en el sitio activo. El compuesto 225 presenta mayores fluctuaciones de hasta 0,80 nm, lo cual refleja que, al tener dos ligandos unidos, se generan movimientos diferentes en cada cadena, como se ve en el Anexo, Figura F.1 y Figura F.2. Por otro lado, los compuestos 172, 179 y 201 muestran comportamientos similares, con valores entre 0.40 y 0.70 nm; apenas presentan variaciones estructurales significativas y su estabilidad es comparable a la de la AChE.

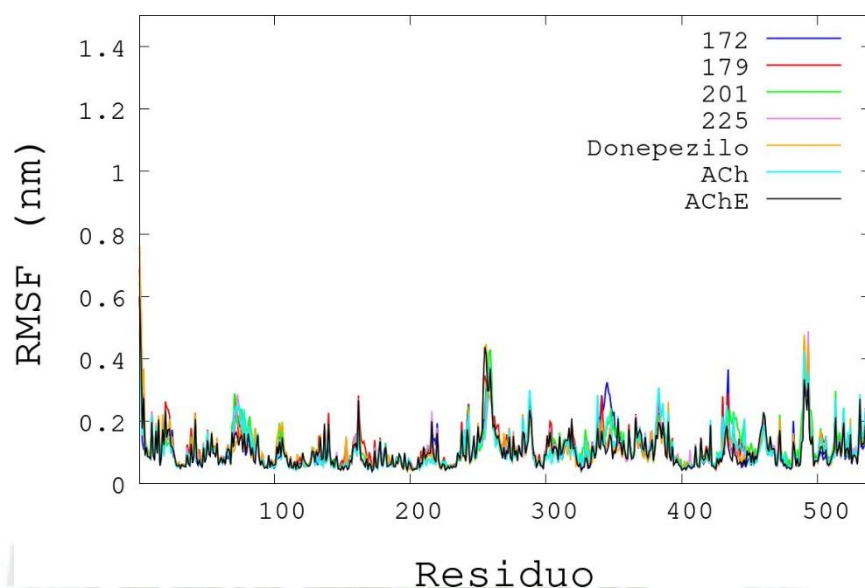
En la Figura 20 se muestra el análisis de RMSF, es decir, las fluctuaciones por residuo. La Figura 20(a) corresponde a la cadena A y la Figura 20(b) a la cadena B, ambas con un ligando unido. Las regiones con mayores fluctuaciones abarcan los residuos 68–82, 252–268, 298–321 y 486–496, los cuales presentan la máxima movilidad durante toda la simulación. Esto se debe a que los residuos correspondientes están ubicados en la superficie de la proteína, lo que explica su elevada flexibilidad. La variación observada entre los residuos 68–82 se puede atribuir a la presencia del denominado sitio aniónico catalítico, que establece interacción directa con los compuestos. En general, las fluctuaciones son consistentes entre las dos cadenas, aunque se pueden observar pequeñas variaciones. La ACh presenta mayor variación junto con el compuesto 201, a diferencia de los otros complejos, que muestran valores de RMSF bajos.

Figura 19. RMSD de la proteína con un ligando en ambas cadenas, desde los 50ns.

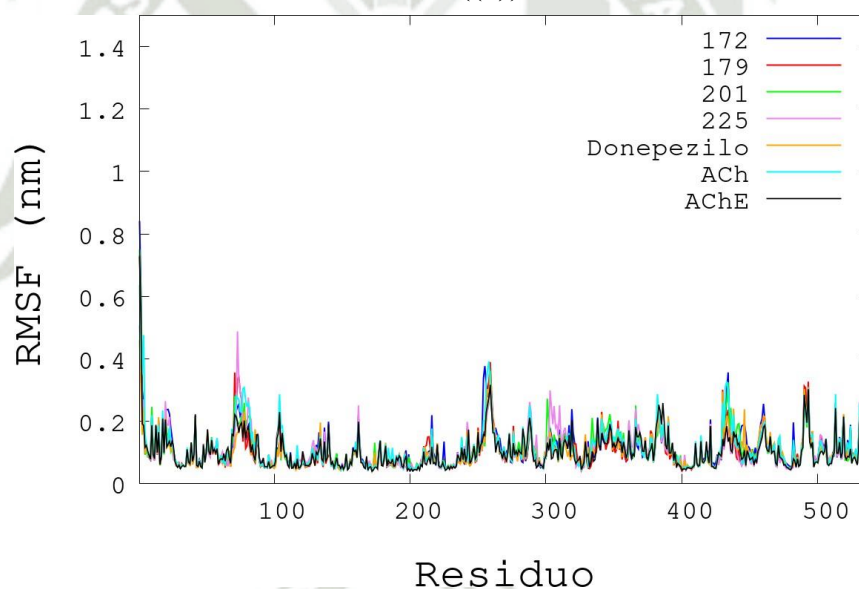


En la Figura 21 se observa el RG de la proteína con ligandos en ambas cadenas. La mayoría de los valores de RG se mantienen bastante estables durante toda la simulación, y el rango principal oscila entre 3.8 y 4.00 nm, por lo que no se observan expansiones drásticas de la proteína en la mayoría de los sistemas. El donepezilo y la ACh muestran fluctuaciones crecientes y decrecientes más marcadas, pero sin cambios drásticos que comprometan la estabilidad de la proteína. Particularmente, la ACh, cerca de los 70 ns, presenta un pico alto cerca de los 4 nm, lo que, como se había mencionado, se debió a que una molécula de acetilcolina se salió del sitio activo de una cadena. El compuesto 225 presentó variaciones más marcadas y más bajas, pero con mayores fluctuaciones. Por otro lado, los compuestos 172, 179 y 201 se mantienen cerca de la AChE sin ligando, con valores muy similares. La AChE muestra un comportamiento constante, y la presencia de dos ligandos no altera significativamente su compacidad en comparación con la AChE sin ligando.

Figura 20. RMSF de la proteína con un ligando en ambas cadenas, desde los 50ns.



((a))



((b))

* (a) RMSF de la cadena A y (b) RMSF de la cadena B.

En la Figura 22 se muestra cómo varía la superficie de la proteína expuesta al solvente. Los valores de SASA de todos los sistemas fluctúan entre 400 y 440 nm²; no se observan variaciones drásticas, lo que sugiere que la estructura de la proteína es estable. La ACh, de igual manera, presenta mayores fluctuaciones, mientras que el donepezilo se mantiene más estable. Los compuestos 172 y 201 presentan fluctuaciones más variables, lo que indica que producen mayores cambios conformacionales en la estructura proteica. Por otro lado, los compuestos 179

y 225 mantienen valores más cercanos a los de AChE, sin alterar significativamente la exposición al solvente.

Figura 21. RG de la proteína con un ligando en ambas cadenas, desde los 50ns.

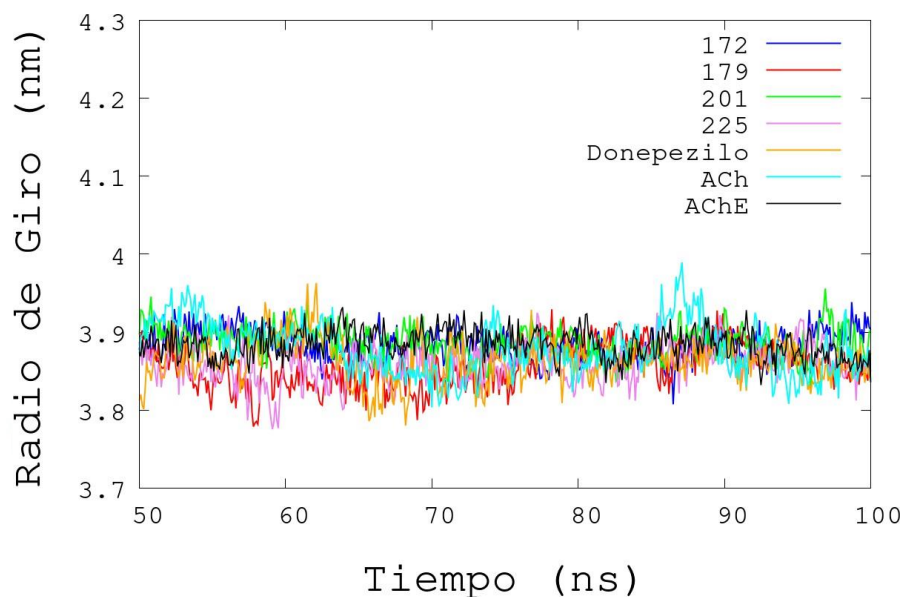
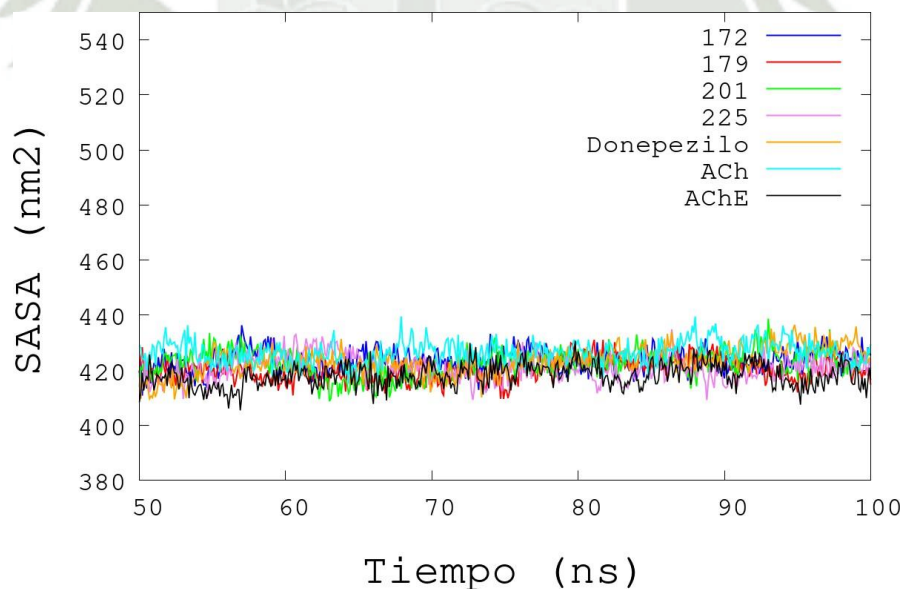


Figura 22. SASA de la proteína con un ligando en ambas cadenas, desde los 50ns.



Los análisis de los parámetros a partir de los 50 ns revelan que los complejos alcanzan su mayor estabilidad estructural. En la Tabla 5 se presentan los datos correspondientes a las cadenas que poseen un ligando unido en cada sitio activo. La acetilcolina y el compuesto 225 presentan los valores más altos de RMSD, con 0.53 ± 0.09 nm y 0.57 ± 0.09 nm, respectivamente. Sus

desviaciones estándar elevadas indican una mayor flexibilidad en la proteína, produciendo un movimiento estructural más notable. Seguidamente, el compuesto 179 (0.50 ± 0.08 nm) muestra un comportamiento flexible, comparable al de donepezilo (0.50 ± 0.09 nm). En contraste, los compuestos 172 (0.36 ± 0.05 nm) y 201 (0.41 ± 0.06 nm) revelan los valores más bajos de RMSD, lo que sugiere una mayor estabilidad estructural. Respecto al RG, todos los sistemas presentan valores similares, aunque el compuesto 201 muestra una ligera tendencia a una estructura más expandida (3.89 ± 0.02 nm). En cuanto al SASA, la ACh muestra la mayor exposición (426.43 ± 4.10 nm²), mientras que los compuestos 172, 179 y 225 mantienen valores cercanos a la AChE sin ligando (418.01 ± 4.17 nm²), lo que indica que son estructuras más compactas. En general, el compuesto 172 destaca como el más favorable, combinando una alta estabilidad estructural con una baja exposición al solvente, lo que lo posiciona como el mejor candidato entre los sistemas evaluados.

Tabla 5. Promedios y desviaciones estándar de RMSD, RG y SASA, con un ligando en ambas cadenas desde los 50ns.

Compuesto	RMSD (nm)	RG (nm)	SASA (nm ²)
	Promedio $\pm$ DE	Promedio $\pm$ DE	Promedio $\pm$ DE
172	0.36 ± 0.05	3.88 ± 0.02	423.55 ± 3.91
179	0.50 ± 0.08	3.86 ± 0.03	420.15 ± 3.97
201	0.41 ± 0.06	3.89 ± 0.02	422.23 ± 4.82
225	0.57 ± 0.09	3.86 ± 0.02	420.84 ± 4.48
Donepezilo	0.50 ± 0.09	3.86 ± 0.03	423.05 ± 4.99
ACh	0.53 ± 0.09	3.88 ± 0.03	426.43 ± 4.10
AChE	0.43 ± 0.05	3.88 ± 0.02	418.01 ± 4.17

Con estos valores, se puede comprender que el sitio activo de cada monómero es independiente, coincidiendo con lo reportado por Sussman y colaboradores (106), quienes mencionan que los sitios activos de cada cadena están separados por aproximadamente 60 Å, por lo que la actividad catalítica de una subunidad o cadena no afecta a la otra.

En la Figura 23 se muestra la representación en 2D de las interacciones de los compuestos con los residuos de la proteína en la cadena A, mientras que en la Figura 24 se presentan las interacciones correspondientes a la cadena B. En las Figuras 23(a) y 24(a), 23(b) y 24(b), 23(c) y 24(c), 23(d) y 24(d), 23(e) y 24(e), y 23(f) y 24(f), se visualizan las interacciones de los

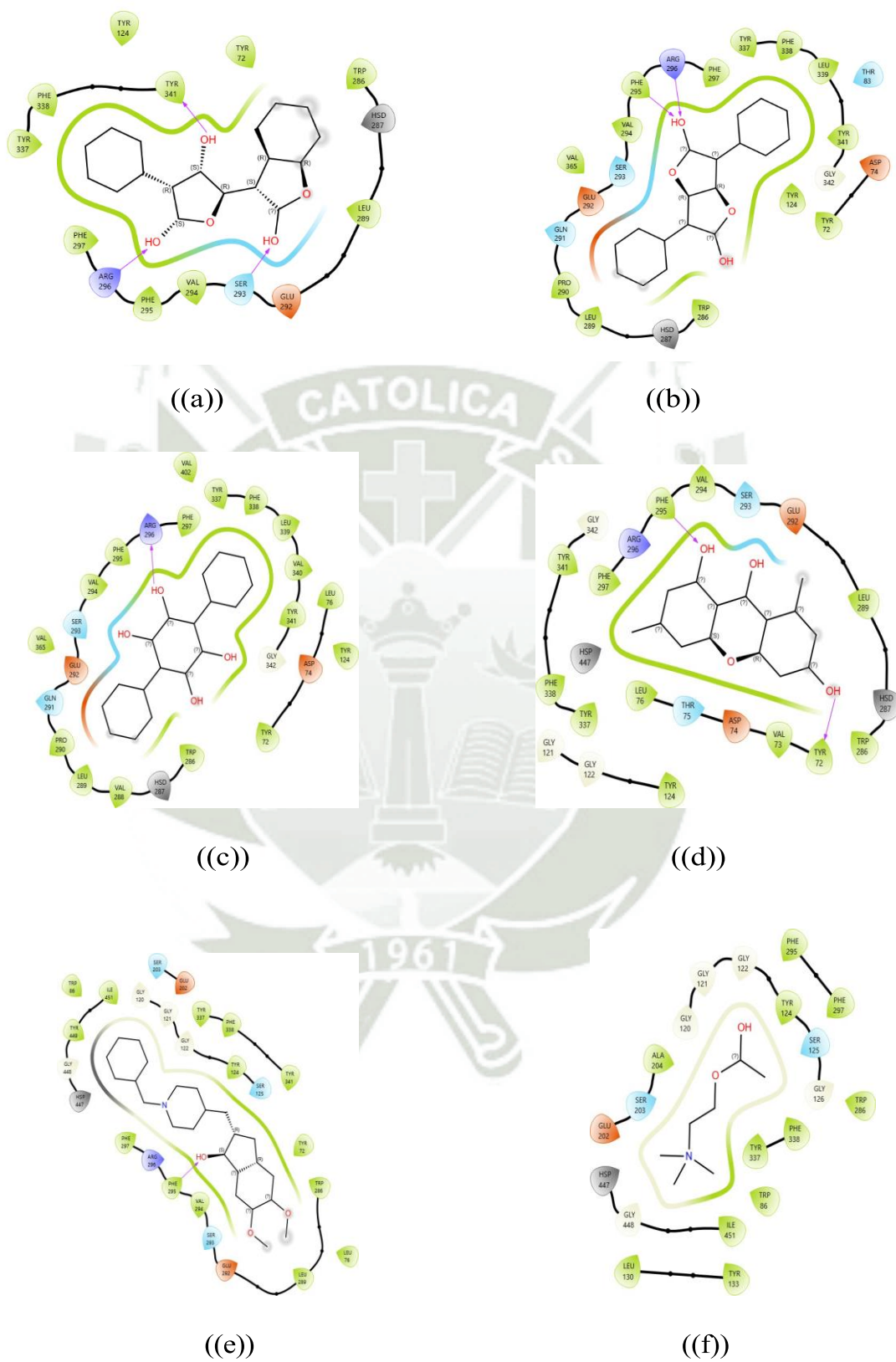
compuestos 172, 179, 201, 225, donepezilo y acetilcolina, respectivamente. En cada figura se observa cómo las moléculas se posicionan en el sitio activo y los diferentes tipos de interacciones que estabilizan su unión, tales como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas y contactos polares.

Al comparar las interacciones de ambas cadenas, se identificaron residuos comunes en los sitios de unión que participan en la fijación de cada compuesto, lo cual es esencial para comprender la interacción. En la Tabla 6 se muestran detalladamente los residuos dominantes en la unión del ligando a la proteína.

Al analizar las interacciones, se puede observar que los residuos con mayor presencia en las interacciones del tipo enlace de hidrógeno fueron PHE295 y ARG296, comprendiendo que estos tienen un rol fundamental en la interacción con ligandos en el sitio activo. Asimismo, se identificó que las interacciones electrostáticas estuvieron mediadas por GLU292 (carga negativa) y ARG296 (carga positiva), mientras que las interacciones hidrofóbicas involucraron a TYR337, TRP286, PHE297, TYR341, PHE338, VAL294 y LEU280.

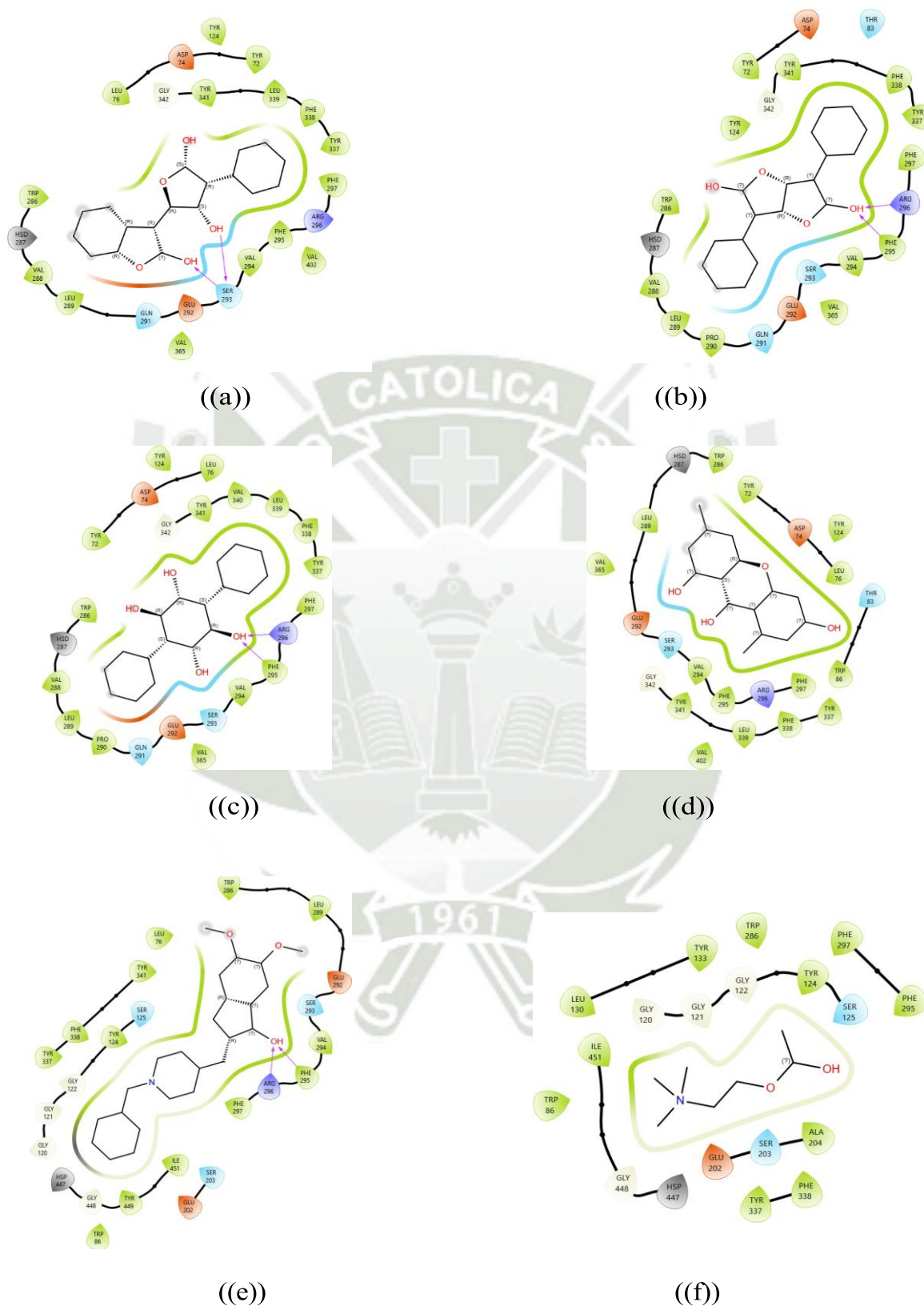
El compuesto 172 presenta puentes de hidrógeno con SER293 en ambas cadenas, donde el nitrógeno de la serina interactúa con los hidroxilos; además, muestra interacciones electrostáticas con GLU292 e interacciones hidrofóbicas con TYR337 y PHE295, los cuales se encuentran presentes en el sitio activo de la proteína. El compuesto 179 forma puentes de hidrógeno con PHE295 y ARG296, cuyos nitrógenos interactúan con uno de los oxígenos del ciclo, además de interacciones electrostáticas con ASP74 y GLU292 e interacciones hidrofóbicas con TYR337 y PHE297, que también son parte del sitio activo. El compuesto 201 formó enlaces de hidrógeno con ARG296, acompañado de interacciones electrostáticas con GLU292, e interacciones hidrofóbicas con TYR337, TRP86 y PHE297. El compuesto 225 mostró puentes de hidrógeno con PHE295 en una sola cadena; las interacciones electrostáticas se dieron con ARG296 y las interacciones hidrofóbicas con TYR337, PHE297 y TRP286. El donepezilo formó puentes de hidrógeno con PHE295 y mostró interacciones hidrofóbicas con TYR337, PHE297, TRP286 y TRP86, todos situados en el sitio activo. Finalmente, la acetilcolina no presentó enlaces puente de hidrógeno, pero interactuó electrostáticamente con GLU20 y formó interacciones hidrofóbicas con TYR337, PHE295, PHE297, HSP447 y SER203.

Figura 23. Identificación de las interacciones moleculares que componen el sitio activo de la cadena A de AChE.



* (a) 172. (b) 179. (c) 201. (d) 225. (e) donepezilo. (f) acetilcolina.

Figura 24. Identificación de las interacciones moleculares que componen el sitio activo de la cadena B de AChE.



* (a) 172. (b) 179. (c) 201. (d) 225. (e) donepezilo. (f) acetilcolina.

Para comprobar que las simulaciones se hayan realizado de forma correcta, los resultados obtenidos fueron consistentes con lo reportado por Makarian y colaboradores (107), quienes describieron que el donepezilo presenta una interacción cercana a TRP86, así como también interacciones con SER203 y HIS447, ambos de la triada catalítica. Asimismo, reportaron una interacción del grupo carbonilo del donepezilo con PHE295, que actúa como donante de hidrógeno. El anillo de indanona se encuentra cerca de TRP286, PHE295, PHE338 y TYR341, generando fuertes interacciones hidrofóbicas y estables.

Considerando que todos los compuestos formaron enlaces con residuos clave que se observan en la mayoría de las interacciones, y comparando con el donepezilo, se puede considerar que los cuatro metabolitos secundarios presentes en líquenes (172, calicina; 179, dilactona de ácido pulvínico; 201, ácido polipórico; y 225, 1,6-dihidroxi- 3,8-dimetilxantona) poseen propiedades con una alta afinidad por la acetilcolinesterasa.

La calicina y la dilactona de ácido pulvínico son derivados del ácido pulvínico, el cual pertenece a la ruta del ácido shikímico. Hidalgo y colaboradores (112) mencionan que la calicina se puede encontrar en varios líquenes, tales como: *Pseudocyphellaria berberia*, que se encuentra en regiones húmedas como Chile y Nueva Zelanda; *Lecanora somervellei*, un líquen alpino del Himalaya; y *Pseudocyphellaria crocata*, así como en otras especies del género *Pseudocyphellaria*. Por otro lado, Fernandes y colaboradores (113) identificaron la calicina y la dilactona de ácido pulvínico en *Candelariella fibrosa*, que es nativa de Brasil. Además, se ha reportado su presencia en *Acarospora spp.* y *Candelariella*, encontrados en el Desierto de Atacama, Chile, y en *Candelariella concolor*, que se encuentra en lava volcánica de Kilauea, Hawái.

En el estudio de Mansour (114), se menciona que el ácido polipórico se puede obtener del líquen *Pseudocyphellaria coronata*, que se encuentra comúnmente en árboles y arbustos de Nueva Zelanda. Por otro lado, no se ha encontrado información explícita que mencione de qué líquen se puede obtener el metabolito 1,6-dihidroxi-3,8- dimetilxantona. Sin embargo, según la base de datos LDB, este compuesto pertenece a las xantonas, por lo que se requiere más investigación para identificar específicamente las especies de líquenes que producen este metabolito.

Tabla 6. Interacciones moleculares entre los compuestos y los residuos de aminoácidos en las cadenas A y B de AChE.

Compuesto	Cadena A		Cadena B	
	Puentes de hidrogeno	Interacciones hidrofóbicas y electrostáticas	Puentes de Hidrogeno	Interacciones hidrofobicas y electrostaticas
172	TYR341, ARG296 y SER293	TRP286, TYR124, TYR341, TYR337, PHE338, PHE295, VAL294, LEU289, PHE297, GLU292, HSD287	SER293	TYR337, TYR341, VAL294, HSD 287, TRP286, TYR124, PHE338, PHE295, GLU292, ARG296
179	PHE295, ARG296	TYR341, TYR337, PHE338, VAL294, PHE297, LEU289, TRP286, TYR124, HSD287, ASP74, GLU292, SER293	PHE295, ARG296	LEU289, TRP286, PHE297, TYR124, TYR341, TYR337, PHE338, VAL294, LEU289, GLU292, ASP74, SER293
201	ARG296	TYR337, TYR341, PHE338, PHE295, VAL294, SER293, HSD287, TRP286, TYR124, PHE297, LEU289, GLU292	PHE295, ARG296	LEU289, TRP286, TYR124, TYR341, TYR337, PHE338, VAL294, SER293, GLU292, PHE297,
225	PHE295, TYR72	TYR337, TYR341, PHE338, VAL294, LEU289, PHE297, TRP286, TYR124, ARG296	No presenta	TYR337, TYR341, PHE338, PHE295, VAL294, TRP286, TYR72, TYR124, ARG296, ASP74, SER293
Donepezilo	PHE295	TYR337, TYR341, PHE338, VAL294, ARG296, LEU289, PHE297, TRP286, TYR124, TRP86, ILE451, HSP447, LEU76, GLU202, SER293, SER203	PHE295, ARG296	TRP86, LEU76, TYR341, TYR337, GLU292, VAL294, LEU289, TRP286, PHE297, TYR124, ILE451, HSP447, GLU202, SER293
Acetilcolina	No presenta	TYR337, HSP447, PHE338, PHE295, PHE297, TYR124, TYR133, TRP86, ILE451, GLU202, SER203	No presenta	PHE297, PHE295, TYR124, TYR133, TRP86, ILE451, TYR337, HSP447, PHE338, GLU202, SER203

* Los residuos de color verde son polares, los de color rojo tienen carga negativa, los de color azul tienen carga positiva y los de color negro son hidrofóbicos.

En general, con esta investigación se logró hacer un análisis mediante el descubrimiento de fármacos asistido por computadora, lo cual constituye una estrategia viable y un paso fundamental antes de llevar a cabo estudios experimentales en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.



CONCLUSIONES

PRIMERA. Se prepararon y optimizaron las estructuras tridimensionales de los metabolitos secundarios de LDB, extraídos de PubChem, mediante minimización de energía, llevándolos a un estado de estabilidad geométrica.

SEGUNDA. Se optimizo y analizo la acetilcolinesterasa, obtenida de la base de datos Protein Data Bank. Se eligió la estructura cristalizada más optima pudiendo modelar regiones faltantes por métodos *in silico* tales como el modelado por homología, el análisis del diagrama de Ramachandran y la identificación de los pockets.

TERCERA. Se determino la mejor afinidad de unión de los compuestos mediante cribado virtual y acoplamiento utilizando el software PyRx. Se seleccionaron 33 compuestos con mayor afinidad al fármaco de referencia, realizando cuatro cálculos de afinidad.

CUARTA. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y se predijo la toxicidad de los 33 compuestos con mayor afinidad, lo que permitió identificar los mejores ligandos, de los cuales 4 compuestos lograron atravesar la barrera hematoencefálica.

QUINTA. Se analizó la afinidad de la acetilcolinesterasa con los 4 compuestos que atravesaron la barrera hematoencefálica, mediante de simulación en dinámica molecular. Donde se identificó que el compuesto 172 proporciona mayor estabilidad a la proteína.

RECOMENDACIONES

PRIMERA. Se propone aumentar el tiempo de simulación de dinámica molecular, para observar a mayor tiempo el comportamiento de la interacción del complejo proteína-ligando.

SEGUNDA. Es recomendable analizar las simulaciones de dinámica molecular utilizando los métodos MMGBSA (Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area) y MMPBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area), los cuales permiten calcular la energía libre de unión entre la proteína y su ligando, proporcionando una estimación precisa de la afinidad de unión de los complejos proteína-ligando.

TERCERA. Se propone realizar pruebas in vitro con líneas celulares (por ejemplo, neuroblastomas humanos SH-SY5Y), muy utilizadas para estudios de la enfermedad de Alzheimer, además de agregar beta-amiloides sintéticos para inducir citotoxicidad, con el fin de identificar las concentraciones de inhibición de los compuestos y su citotoxicidad.

CUARTA. Por último, se propone realizar estudios in vivo para evaluar las capacidades inhibitorias de los cuatro mejores metabolitos secundarios, utilizando ratas transgénicas (por ejemplo, el modelo TgF344-AD) que presenten características patológicas y conductuales de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pan American Health Organization. Demencia. <https://www.paho.org/es/temas/demencia>, n.d. Consultado en: 25 de agosto de 2025.
2. EA Ennis and RD Blakely. Choline on the move: perspectives on the molecular physiology and pharmacology of the presynaptic choline transporter. *Advances in Pharmacology*, 76:175–213, 2016.
3. Gustavo Sánchez-Chávez and Rocío Salceda. Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2):44–51, 2008.
4. R Gajendra Reddy, Lenin Veeraval, Swati Maitra, Marylene Chollet-Krugler, Sophie Tomasi, Francoise Lohezic-Le Devehat, Joel Boustie, and Sumana Chakravarty. Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics. *Phytomedicine*, 23(12):1527–1534, 2016.
5. Mehmet Varol. Lichens as a promising source of unique and functional small molecules for human health and well-being. *Studies in natural products chemistry*, 60:425–458, 2019.
6. Miguel A Chávez-Fumagalli, Pallavi Shrivastava, Jorge A Aguilar-Pineda, Rita Nieto-Montesinos, Gonzalo Davila Del-Carpio, Antero Peralta-Mestas, Claudia Caracela-Zeballos, Guillermo Valdez-Lazo, Victor Fernandez-Macedo, Alejandro Pino-Figueroa, et al. Diagnosis of alzheimer's disease in developed and developing countries: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Journal of Alzheimer's disease reports*, 5(1):15–30, 2021.
7. Gabor G. Kovacs. Chapter 21 - concepts and classification of neurodegenerative diseases. In Gabor G. Kovacs and Irina Alafuzoff, editors, *Neuropathology*, volume 145 of *Handbook of Clinical Neurology*, pages 301–307. Elsevier, 2018.
8. Shelley L. Forrest and Gabor G. Kovacs. Current concepts and molecular pathology of neurodegenerative diseases. *Pathology*, 57(2):178–190, 2025. Neuropathology today: expertise, advancements and future considerations.
9. Liyuan Fan, Chengyuan Mao, Xinchao Hu, Shuo Zhang, Zhihua Yang, Zhengwei Hu, Huifang Sun, Yu Fan, Yali Dong, Jing Yang, et al. New insights into the

pathogenesis of alzheimer's disease. *Frontiers in neurology*, 10:1312, 2020.

10. Sathish Thandivel, Poovarasan Rajan, Tamizharasan Gunasekar, Abisek Arjunan, Sulekha Khute, Srinivasa Rao Kareti, and Subash Paranthaman. In silico molecular docking and dynamic simulation of anti-cholinesterase compounds from the extract of catunaregam spinosa for possible treatment of alzheimer's disease. *Heliyon*, 10(7), 2024.
11. Mahendra Rai, Alka Yadav, Avinsh P Ingle, Anatoly Reshetilov, María José Blanco-Prieto, and Chistiane M Feitosa. Neurodegenerative diseases: the real problem and nanobiotechnological solutions. *Nanobiotechnology in neurodegenerative diseases*, pages 1–17, 2019.
12. Mange Ram Yadav, Prashant R Murumkar, Rahul Barot, Rasana Yadav, Karan Joshi, and Monica Chauhan. Role of computational modeling in drug discovery for alzheimer's disease. In *Current trends in Computational modeling for Drug Discovery*, pages 57–107. Springer, 2023.
13. J Folch, M Ettcheto, D Petrov, S Abad, I Pedrós, M Marin, J Olloquequi, and A Camins. Review of the advances in treatment for alzheimer disease: strategies for combating β -amyloid protein. *Neurología (English Edition)*, 33(1):47–58, 2018.
14. David S Knopman, Helene Amieva, Ronald C Petersen, Gäel Chételat, David M Holtzman, Bradley T Hyman, Ralph A Nixon, and David T Jones. Alzheimer disease. *Nature reviews Disease primers*, 7(1):33, 2021.
15. Shabnam Shabir and Mahendra Pratap Singh. Unveiling the complexity of alzheimer's disease: Introduction and its pathophysiology. In *A New Era in Alzheimer's Research*, pages 1–15. Elsevier, 2025.
16. Christopher E Ramsden, Roy G Cutler, Xiufeng Li, and Gregory S Keyes. Hypothesis: Lipid-protecting disulfide bridges are the missing molecular link between apoe4 and sporadic alzheimer's disease in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 205:102681, 2025.
17. Zhi-Ru Chen, Jia-Bao Huang, Shu-Long Yang, and Fen-Fang Hong. Role of cholinergic signaling in alzheimer's disease. *Molecules*, 27(6), 2022.
18. B. Team. Pathology of alzheimer's disease. 2025. Accedido: 27 de enero de 2025.

19. Sarah Falah Kokaz, Pran Kishore Deb, Sara Nidal Abed, Amal Al-Aboudi, Nirupam Das, Fatimah Amin Younes, Ruba Anwar Salou, Yazan A Bataineh, Katharigatta N Venugopala, and Raghu Prasad Mailavaram. Pharmacology of acetylcholine and cholinergic receptors. *Frontiers in Pharmacology of Neurotransmitters*, pages 69–105, 2020.
20. Christian Sam and Bruno Bordoni. Physiology, acetylcholine. 2020.
21. MN Rossor, J Fahrenkrug, P Emson, CQ Mountjoy, L Iversen, and Martin Roth. Reduced cortical choline acetyltransferase activity in senile dementia of alzheimer type is not accompanied by changes in vasoactive intestinal polypeptide. *Brain Research*, 201(1):249–253, 1980.
22. Marianne Chapleau, Leonardo Iaccarino, David Soleimani-Meigooni, and Gil D. Rabinovici. The role of amyloid pet in imaging neurodegenerative disorders: A review. *Journal of Nuclear Medicine*, 63(Supplement 1):13S–19S, 2022.
23. Shailendra Kumar Mishra, Ritu Singh, Hung-Ming Chang, Ahmad A Obaid, and Sandeep Kumar Singh. Biomarkers used in alzheimer’s disease diagnosis. In *A New Era in Alzheimer’s Research*, pages 31–50. Elsevier, 2025.
24. Shirin Arjmandi-Rad, John D Vestergaard Nieland, Kathryn G Goozee, and Salar Vaseghi. The effects of different acetylcholinesterase inhibitors on eeg patterns in patients with alzheimer’s disease: A systematic review. *Neurological Sciences*, 45(2):417–430, 2024.
25. Khadija Khaled Alı, Serap Gürbüzdemir, Emrah Çakmakçı, and Ayşe Ogan. Immobilization of acetylcholinesterase onto pyrrole-containing photocured thermosets. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(1):95–102, 2023.
26. Israel Silman. The multiple biological roles of the cholinesterases. *Progress in biophysics and molecular biology*, 162:41–56, 2021.
27. Eric B Fishman, Gordon C Siek, Robert D MacCallum, Edward D Bird, Ladislav Volicer, and Judith K Marquis. Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the alzheimer type. *Annals of neurology*, 19(3):246–252, 1986.

28. Hind Yassmine Chennai, Salah Belaidi, Lotfi Bourougaa, Mebarka Ouassaf, Leena Sinha, Abdelouahid Samadi, and Samir Chtita. Identification of potent acetylcholinesterase inhibitors as new candidates for alzheimer disease via virtual screening, molecular docking, dynamic simulation, and molecular mechanics–poisson–boltzmann surface area calculations. *Molecules*, 29(6):1232, 2024.
29. Hay Dvir, Israel Silman, Michal Harel, Terrone L Rosenberry, and Joel L Sussman. Acetylcholinesterase: from 3d structure to function. *Chemico-biological interactions*, 187(1-3):10–22, 2010.
30. Coloring Books, Education Corner, Irving Geis, David Goodsell, and Irina Bezsonova. Molecule of the month: Acetylcholinesterase. 2004.
31. Vincenzo Nicola Talesa. Acetylcholinesterase in alzheimer’s disease. *Mechanisms of ageing and development*, 122(16):1961–1969, 2001.
32. Samir F de A Cavalcante, Alessandro BC Simas, Marcos C Barcellos, Victor GM de Oliveira, Roberto B Sousa, Paulo A de M Cabral, Kamil Kuča, and Tanos CC França. Acetylcholinesterase: the “hub” for neurodegenerative diseases and chemical weapons convention. *Biomolecules*, 10(3):414, 2020.
33. KV Dileep, Kentaro Ihara, Chiemi Mishima-Tsumagari, Mutsuko Kukimoto-Niino, Mayumi Yonemochi, Kazuharu Hanada, Mikako Shirouzu, and Kam YJ Zhang. Crystal structure of human acetylcholinesterase in complex with tacrine: Implications for drug discovery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 210:172–181, 2022.
34. Arun Jha, Kaushik Mukhopadhaya, Arun Jha, and Kaushik Mukhopadhaya. Supporting diagnosis and treatment. *Alzheimer’s Disease: Diagnosis and Treatment Guide*, pages 65–85, 2021.
35. Amy Trang and Paras B Khandhar. Physiology, acetylcholinesterase. 2019.
36. Sarah A Chau, Celina S Liu, Myuri Ruthirakuhan, Krista L Lanctôt, and Nathan Herrmann. Pharmacotherapy of dementia 19. *Mental Health and Illness of the Elderly*, page 455, 2017.
37. Willian Orlando Castillo-Ordoñez and Nohelia Cajas-Salazar. Acetylcholinesterase inhibitory agents in plants and their application to dementia:

- Alzheimer's disease. In *Diagnosis and Management in Dementia*, pages 631–645. Elsevier, 2020.
38. Gumpeny R Sridhar. Acetylcholinesterase inhibitors (galantamine, rivastigmine, and donepezil). *NeuroPsychopharmacotherapy*, pages 1–13, 2020.
 39. Manuel Fernández. Capítulo 12 - fármacos anti-alzheimer. In J.J. Zarranz, J. Meana, and J. González-Menacho, editors, *Neurofarmacología Contemporánea*, pages 273–300. Elsevier España, 2011.
 40. Dominique Bensamoun, Anne Mouton, Emilie Ettore, Philippe Robert, and Renaud David. (neurobiology of) dementia: Causes, presentation, and management. In Helen Chiu and Kenneth Shulman, editors, *Mental Health and Illness of the Elderly*, pages 85–104. Springer Science + Business Media, 2017.
 41. A Khadhri. Could lichens cure alzheimer's disease. *J. Bacteriol. Mycol.*, 8(7):1191, 2021.
 42. Gayathri Rethinavelu, Lavanya Manoharan, Srinivasan Krishnamoorthy, N Baskaran, and Vignesh Sivanandham. Edible lichens and its unique bioactivities: A review of its pharmacological and food applications. *Food and Humanity*, 1:1598–1609, 2023.
 43. Harman Gill, John L Sorensen, and Jérôme Collemare. Lichen fungal secondary metabolites: progress in the genomic era toward ecological roles in the interaction. In *Plant Relationships: Fungal-Plant Interactions*, pages 185–208. Springer, 2022.
 44. Meirong Ren, Shuhua Jiang, Yanyan Wang, Xinhua Pan, Feng Pan, and Xinli Wei. Discovery and excavation of lichen bioactive natural products. *Frontiers in Microbiology*, 14:1177123, 2023.
 45. Tanvir Ul Hassan Dar, Sajad Ahmad Dar, Shahid Ul Islam, Zahid Ahmed Mangral, Rubiya Dar, Bhim Pratap Singh, Pradeep Verma, and Shafiul Haque. Lichens as a repository of bioactive compounds: an open window for green therapy against diverse cancers. *Seminars in Cancer Biology*, 86:1120–1137, 2022.
 46. Heng Luo, Changtian Li, Jin Cheol Kim, Yanpeng Liu, Jae Sung Jung, Young Jin Koh, and Jae-Seoun Hur. Biruloquinone, an acetylcholinesterase inhibitor produced by lichen-forming fungus *Cladonia macilenta*. *Journal of microbiology and*

biotechnology, 23(2):161–166, 2013.

47. Yingshu Zhao, Mingfu Wang, and Baojun Xu. A comprehensive review on secondary metabolites and health-promoting effects of edible lichen. *Journal of Functional Foods*, 80:104283, 2021.
48. Yalçın Karagöz and Berna Öztürk Karagöz. Lichens in pharmacological action: What happened in the last decade? *The Eurasian Journal of Medicine*, 54(1):S195, 2022.
49. Zhang Zhang. Expanding bioinformatics: Toward a paradigm shift from data to theory. *Fundamental Research*, 2024.
50. S. Aron, C. V. Jongeneel, P. A. Chauke, M. Chaouch, J. Kumuthini, L. Zass, et al. Ten simple rules for developing bioinformatics capacity at an academic institution. *PLoS Computational Biology*, 17(12):e1009592, 2021.
51. National Center for Biotechnology Information. *Creating Databases - Bioinformatics*. NCBI Bookshelf, n.d. Accessed: 2025-03-03.
52. Álvaro Sebastián Yagüe, Alberto Pascual-García, Federico Abascal, Jacobo Aguirre, Djordje Bajić, Davide Baù, Juan A. Bueren-Calabuig, Álvaro Cortés Cabrera, Iván Dotú, José María Fernández, Helena G. Dos Santos, Beatriz García-Jiménez, Raúl Guantes, Iker Irisarri, Natalia Jiménez-Lozano, Javier Klett, Raul Mendez, Antonio Morreale, Almudena Perona, Michael Stich, Sonia Tarazona, Inmaculada Yruela Guerrero, Rafael Zardoya, and Eduardo Andrés-León. *"Bioinformática con Ñ v1.0": A Collaborative Project of Young Spanish Scientists to Write a Complete Book About Bioinformatics*, volume 1. 2014. Available online.
53. Vladimir Joseph Sykora. Automated virtual screening. In *High Performance Computing for Drug Discovery and Biomedicine*, pages 137–152. Springer, 2023.
54. Matheus Nunes da Rocha, Damião Sampaio de Sousa, Francisco Rogenio da Silva Mendes, Helcio Silva Dos Santos, Gabrielle Silva Marinho, Márcia Machado Marinho, and Emmanuel Silva Marinho. Ligand and structure-based virtual screening approaches in drug discovery: minireview. *Molecular Diversity*, pages 1–11, 2024.

55. Stephanie Kay Ashenden. Introduction to drug discovery. In *The Era of Artificial Intelligence, Machine Learning, and Data Science in the Pharmaceutical Industry*, pages 1–13. Elsevier, 2021.
56. Wendy Guadalupe Ballón Paucara and Ricardo Enrique Grados Torrez. Molecular docking: practical criteria for selection of biologically active ligands and identification of new therapeutic targets. *Revista CON-CIENCIA*, 7(2):55–72, 2019.
57. Rakesh Kumar Paul, Virendra Nath, and Vipin Kumar. Structure based virtual screening of natural compounds and molecular dynamics simulation: Butirosin as dipeptidyl peptidase (dpp-iv) inhibitor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35:102042, 2021.
58. Shome S Bhunia, Mridula Saxena, and Anil K Saxena. Ligand-and structure-based virtual screening in drug discovery. In *Biophysical and Computational Tools in Drug Discovery*, pages 281–339. Springer, 2021.
59. Mark James Abraham, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C Smith, Berk Hess, and Erik Lindahl. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1:19–25, 2015.
60. Philipp K Janert. *Gnuplot in action: understanding data with graphs*. Simon and Schuster, 2016.
61. Eric F Pettersen, Thomas D Goddard, Conrad C Huang, Gregory S Couch, Daniel M Greenblatt, Elaine C Meng, and Thomas E Ferrin. Ucsf chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13):1605–1612, 2004.
62. Sargis Dallakyan and Arthur J Olson. Small-molecule library screening by docking with pyrx. In *Chemical biology: methods and protocols*, pages 243–250. Springer, 2014.
63. Henry David Snyder and Tugba G Kucukkal. Computational chemistry activities with avogadro and orca, 2021.
64. Thomas Sander, Joel Freyss, Modest Von Korff, and Christian Rufener. Datawarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis.

Journal of chemical information and modeling, 55(2):460–473, 2015.

65. Geoffrey R Hutchison, Chris Morley, Craig James, Chris Swain, Hans De Winter, Tim Vandermeersch, and Noel M O’Boyle. Open babel documentation. *Journal of Cheminformatics*, 2011.
66. Noel M O’Boyle, Michael Banck, Craig A James, Chris Morley, Tim Vandermeersch, and Geoffrey R Hutchison. Open babel: An open chemical toolbox. *Journal of cheminformatics*, 3:1–14, 2011.
67. UCM-Proyecto de Innovación Software libre para ciencias e ingenierías. Software libre para ciencias e ingenierías. <https://www.ucm.es/pimcd2014-free-software/grace>, s.f. Universidad Complutense de Madrid.
68. William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. Vmd: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1):33–38, 1996.
69. Jas Bhachoo and Thijs Beuming. Investigating protein–peptide interactions using the schrödinger computational suite. *Modeling peptide-protein interactions: methods and protocols*, pages 235–254, 2017.
70. Kannan Sankar, Kyle Trainor, Levi L Blazer, Jarrett J Adams, Sachdev S Sidhu, Tyler Day, Elizabeth Meiering, and Johannes KX Maier. A descriptor set for quantitative structure-property relationship prediction in biologics. *Molecular Informatics*, 41(9):2100240, 2022.
71. Ivet Challenger-Pérez, Yanet Díaz-Ricardo, and Roberto Antonio Becerra- García. El lenguaje de programación python. *Ciencias Holguín*, 20(2):1–13, 2014.
72. Sunghwan Kim, Jie Chen, Tiejun Cheng, Asta Gindulyte, Jia He, Siqian He, Qingliang Li, Benjamin A Shoemaker, Paul A Thiessen, Bo Yu, et al. Pubchem 2023 update. *Nucleic acids research*, 51(D1):D1373–D1380, 2023.
73. Sunhwan Jo, Taehoon Kim, Vidyashankara G Iyer, and Wonpil Im. Charmm- gui: a web-based graphical user interface for charmm. *Journal of computational chemistry*, 29(11):1859–1865, 2008.
74. Stephen K Burley, Charmi Bhikadiya, Chunxiao Bi, Sebastian Bittrich, Henry Chao, Li Chen, Paul A Craig, Gregg V Crichlow, Kenneth Dalenberg, Jose M

- Duarte, et al. Rcsb protein data bank (rcsb. org): delivery of experimentally-determined pdb structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. *Nucleic acids research*, 51(D1):D488–D508, 2023.
75. Torsten Schwede, Jorgen Kopp, Nicolas Guex, and Manuel C Peitsch. Swiss- model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, 31(13):3381–3385, 2003.
76. Andrew Waterhouse, Martino Bertoni, Stefan Bienert, Gabriel Studer, Gerardo Tauriello, Rafal Gumieny, Florian T Heer, Tjaart A P de Beer, Christine Rempfer, Lorenza Bordoli, et al. Swiss-model: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1):W296–W303, 2018.
77. Antoine Daina, Olivier Michielin, and Vincent Zoete. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7(1):42717, 2017.
78. Hiba Abi Hussein, Alexandre Borrel, Colette Geneix, Michel Petitjean, Leslie Regad, and Anne-Claude Camproux. Pockdrug-server: a new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins. *Nucleic acids research*, 43(W1):W436–W442, 2015.
79. Ian W. Davis, Andrew Leaver-Fay, Victor B. Chen, Jason N. Block, Gary J. Kapral, Xiaoping Wang, Lisanne W. Murray, W. Bryan Arendall, Jack Snoeyink, David C. Richardson, and Jane S. Richardson. Molprobit: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl₂): W375 – –W383, 2007.
80. Damien Olivier-Jimenez, Marylène Chollet-Krugler, David Rondeau, Mehdi A Benidir, Solenn Ferron, Thomas Delhay, Pierre-Marie Allard, Jean-Luc Wolfender, Harrie JM Sipman, Robert Lücking, et al. A database of high-resolution ms/ms spectra for lichen metabolites. *Scientific data*, 6(1):294, 2019.
81. Divya Gupta and Asad U Khan. Advances in docking-based drug design for microbial and cancer drug targets. In *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design*, pages 407–424. Elsevier, 2021.

82. Sonali K Doke and Shashikant C Dhawale. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3):223–229, 2015.
83. Eleonore Fröhlich and George D Loizou. 3rs—strategies for reduction and refinement of animal studies, 2023.
84. Omar Valerio Minero. *Acceleration of the MMFF94 routines within OpenBabel using Eigen and OpenCL*. PhD thesis, Master's thesis, The University of Edinburgh, 2012.
85. Kristina Djinovic-Carugo and Oliviero Carugo. Missing strings of residues in protein crystal structures. *Intrinsically disordered proteins*, 3(1):e1095697, 2015.
86. Arjun Pitchai, Rajesh Kannan Rajaretinam, Rajasekar Mani, and Nagasundaram Na- garajan. Molecular interaction of human acetylcholinesterase with trans- tephrostachin and derivatives for alzheimer's disease. *Heliyon*, 6(9), 2020.
87. Ghazaleh Zarrinzadeh, Mahmood Tajbakhsh, Rahman Hosseinzadeh, Zahra Ghanbari- masir, Maryam Roudbary, Mojtaba Mohseni, and Hamid Nadri. Design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking of euparin and 2- hydroxy acetophenone hydrazone derivatives as potential ache inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1293:136284, 2023.
88. Judit Müller, Ana Martins, József Csábi, Ferenc Fenyvesi, Árpád Könczöl, Attila Hun- yadi, and György T Balogh. Bbb penetration-targeting physicochemical lead selection: Ecdysteroids as chemo-sensitizers against cns tumors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96:571–577, 2017.
89. Han van de Waterbeemd, Gian Camenisch, Gerd Folkers, Jacques R Chretien, and Oleg A Raevsky. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and h-bonding descriptors. *Journal of drug targeting*, 6(2):151–165, 1998.
90. Arup K Ghose, Torsten Herbertz, Robert L Hudkins, Bruce D Dorsey, and John P Mallamo. Knowledge-based, central nervous system (cns) lead selection and lead opti- mization for cns drug discovery. *ACS chemical neuroscience*, 3(1):50–68, 2012.
91. Kristina Grabowski, Karl-Heinz Baringhaus, and Gisbert Schneider. Scaffold

- diversity of natural products: inspiration for combinatorial library design. *Natural product reports*, 25(5):892–904, 2008.
92. Eman A Fayed, Samiha Ahmed El-Sebaey, Maha A Ebrahim, Karema Abu-Elfotuh, Reda El-Sayed Mansour, Ehsan Khedre Mohamed, Ahmed ME Hamdan, Faleh Turki Al-Subaie, Gharam Saad Albalawi, Tariq Mohammed Albalawi, et al. Discovery of novel bicyclic and tricyclic cyclohepta [b] thiophene derivatives as multipotent ache and bche inhibitors, in-vivo and in-vitro assays, admet and molecular docking simulation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 284:117201, 2025.
 93. Srinivasarao Mande, Lalitha Repudi, Sanchari Goswami, Nadia Psalms Gangavarapu, Hamid Ghaffoori Hasan, and Kumaraswamy Gandla. Computational design and molecular insights into acetylcholinesterase inhibitors from aristolochia indica for alzheimer's disease therapy. *Discover Chemistry*, 2(1):126, 2025.
 94. Kanika Verma, Devesh Kapoor, Smita Jain, Ritu Singh, and Swapnil Sharma. Trans- porter systems and metabolism at the blood–brain barrier and blood–csf barrier. In *Drug Delivery Strategies in Neurological Disorders: Challenges and Opportunities*, pages 47–73. Springer, 2024.
 95. Özkan İş, Xue Wang, Joseph S Reddy, Yuhao Min, Elanur Yilmaz, Prabesh Bhattarai, Tulsi Patel, Jeremiah Bergman, Zachary Quicksall, Michael G Heckman, et al. Gliovas- cular transcriptional perturbations in alzheimer's disease reveal molecular mechanisms of blood brain barrier dysfunction. *Nature communications*, 15(1):4758, 2024.
 96. Melanie D Sweeney, Abhay P Sagare, and Berislav V Zlokovic. Blood–brain barrier breakdown in alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, 14(3):133–150, 2018.
 97. Dong Wang, Fanglian Chen, Zhaoli Han, Zhenyu Yin, Xintong Ge, and Ping Lei. Relationship between amyloid- β deposition and blood–brain barrier dysfunction in alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15:695479, 2021.
 98. Meriem Khedraoui, Fatima Zahra Guerguer, Abdelkbir Errougui, Samir Chtita, et al. In silico exploration of aloe vera leaf compounds as dual ache and bche

- inhibitors for alzheimer's disease therapy. *Current Pharmaceutical Analysis*, 21(4):238–248, 2025.
99. Jukka Hakkola, Janne Hukkanen, Miia Turpeinen, and Olavi Pelkonen. Inhibition and induction of cyp enzymes in humans: an update. *Archives of Toxicology*, 94(11):3671– 3722, 2020.
 100. Yvonne C Martin. A bioavailability score. *Journal of medicinal chemistry*, 48(9):3164– 3170, 2005.
 101. Tamilarasi Sambu Periyasamy, Ajay Kasivishwanathan, Gilbert Roy, Nishu Sekar, and Hariprasath Lakshmanan. Phytocompounds of senecio candicans as potential acetylcholinesterase inhibitors targeting alzheimer's disease: A structure-based virtual screening and molecular dynamics simulation study. *Computational Biology and Chemistry*, 117:108396, 2025.
 102. Débora Priscila de Campos, Neila Márcia Silva-Barcellos, Tamires Guedes Caldeira, Wagner da Nova Mussel, Virgínia Silveira, and Jacqueline de Souza. Donepezil hydrochloride bcs class ambiguity: relevant aspects to be considered in drug classification. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111(11):3064–3074, 2022.
 103. Gopal Srinivas, Suboj Babykutty, Priya Prasanna Sathiadevan, and Priya Srinivas. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Medicinal research reviews*, 27(5):591–608, 2007.
 104. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Anthraquinone*, volume 101 of *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK373184/>.
 105. Arianna Bassan, Manuela Pavan, and Elena Lo Piparo. Mutagenic potential and structural alerts of phytotoxins. *Food and Chemical Toxicology*, 173:113562, 2023.
 106. Bhanushee Sharma, Vijil Chenthamarakshan, Amit Dhurandhar, Shiranee

- Pereira, James A Hendler, Jonathan S Dordick, and Payel Das. Accurate clinical toxicity prediction using multi-task deep neural nets and contrastive molecular explanations. *Scientific Reports*, 13(1):4908, 2023.
107. Rafaella F Fernandes, Arthur B Porto, Leonã S Flores, Lenize F Maia, Charlane C Corrêa, Adriano S Spielmann, Howell GM Edwards, and Luiz Fernando C de Oliveira. Nature of light-absorbing pigments from brazilian lichens identified by raman spec- troscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 99:59–66, 2018.
 108. Mariraj Murugan, Shenbagam Muthu, Kalidoss Rajendran, and Ponnuragan Pon- nusamy. Uv protection and anticancer properties of lichen secondary metabolites. *Sci. Acad.*, 2:1–29, 2021.
 109. Jeanette Kraft, Siegfried Bauer, Gerburg Keilhoff, Jürgen Miersch, Detlef Wend, Dag- mar Riemann, Rolf Hirschelmann, Hans-Jürgen Holzhausen, and Jürgen Langner. Bi- ological effects of the dihydroorotate dehydrogenase inhibitor polyporic acid, a toxic constituent of the mushroom hapalopilus rutilans, in rats and humans. *Archives of toxicology*, 72(11):711–721, 1998.
 110. Joel L Sussman, Michal Harel, Felix Frolow, Christian Oefner, Adrian Goldman, Lilly Toker, and Israel Silman. Atomic structure of acetylcholinesterase from torpedo cali- fornica: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022):872–879, 1991.
 111. Makar Makarian, Michael Gonzalez, Stephanie M Salvador, Shahrokh Lorzadeh, Paula K Hudson, and Stevan Pecic. Synthesis, kinetic evaluation and molecular dock- ing studies of donepezil-based acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of molecular structure*, 1247:131425, 2022.
 112. M.E Hidalgo, E Fernández, M Ponce, C Rubio, and W Quilhot. Photophysical, pho- tochemical, and thermodynamic properties of shikimic acid derivatives: calycin and rhizocarpic acid (lichens). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(3):213–217, 2002.
 113. Rafaella F. Fernandes, Gilson R. Ferreira, Adriano A. Spielmann, Howell G.M. Ed- wards, and Luiz Fernando C. de Oliveira. Ft-raman spectroscopy of the candelaria and pyxine lichen species: A new molecular structural study. *Journal of Molecular Structure*, 1102:57–62, 2015.

114. Heba F Mansour. Environment and energy efficient dyeing of woollen fabric with sticta coronata. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 12:571–578, 2010.
115. Branislav Ranković and Marijana Kosanić. Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. In *Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential*, pages 1–29. Springer, 2019.
116. Ayda Khadhri, Mohammed Mendili, Maria Eduarda M Araújo, and Mark RD Sea-ward. Comparative study of secondary metabolites and bioactive properties of the lichen cladonia foliacea with and without the lichenicolous fungus heterocephalacria bachmannii. *Symbiosis*, 79(1):25–31, 2019.
117. Beatriz Díaz-Reinoso, Ismael Rodríguez-González, and Herminia Domínguez. Towards greener approaches in the extraction of bioactives from lichens. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(4):917–942, 2021.
118. Pierre Le Pogam, Gaëtan Herbette, and Joël Boustie. Analysis of lichen metabolites, a variety of approaches. In *Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Biomonitoring and Bioprospection, Volume 1*, pages 229–261. Springer, 2014.
119. B. Team. Pathology of alzheimer’s disease. 2025. Accedido: 27 de enero de 2025



ANEXOS

**ANEXO A. Relación de los metabolitos secundarios de líquenes que constituyen la
Lichen DataBase**

Tabla A. Relación de los metabolitos secundarios de líquenes que constituyen la Lichen DataBase.

ID	Nombre del metabolito	Clase estructural	PM	PubChem CID
001	Ácido acaránico	Ácido alifático (115)	298.2144	101967122
002	Ácido bourgeánico	Ácido alifático (116)	386.3032	10905154
003	Ácido caperático	Ácido alifático (115)	402.2618	193112
004	Ácido fumárico	Ácido alifático (117)	116.011	444972
005	Ácido isorangifórmico	Ácido alifático (115)	386.2668	138756211
006	Ácido lichestérico	Ácido alifático (118)	298.2508	5312903
007	Ácido norrangifórmico	Ácido alifático (115)	372.2512	138756220
008	Ácido rangifórmico	Ácido alifático (115)	386.2668	101939806
009	Ácido rocelico	Ácido alifático (115)	300.2301	11449446
010	Acetilportentol	Compuestos alifáticos y cicloalifáticos	352.1886	101282317
011	Aspicilina	Compuestos alifáticos y cicloalifáticos	328.225	5364531
012	Leprantina	Compuestos alifáticos y cicloalifáticos	660.3357	139291812
013	Portentol	Compuestos alifáticos y cicloalifáticos	310.178	21580164
014	Ácido alectorialico	Benzildépsidos	376.0794	21678673
015	Ácido barbatólico	Benzildépsidos	390.0587	12299981
016	2,4-Dicloro-1,3,6-tri-O- metilnorlichexantona	Cromanos y cromonas	368.0218	129682016
017	2,8-Dimetil-5,7- dimetoxicromona	Cromanos y cromonas	234.0892	102315686
018	5,7-Dihidroxi-2,6,8- trimetilcromona	Cromanos y cromonas	220.0736	179520

019	Acetilboridina	Cromanos y cromonas	536.153	138756197
020	Eugenitina	Cromanos y cromonas	220.0736	3083581
021	Eugenitol	Cromanos y cromonas	206.0579	5036604
022	Galapagina	Cromanos y cromonas	424.1369	138756207
023	Isoeugenitol	Cromanos y cromonas	206.0579	5318562
024	Ácido leprárico	Cromanos y cromonas	362.1002	12304992
025	Lobodirina	Cromanos y cromonas	494.1424	101048642
026	Mollina	Cromanos y cromonas	410.1213	138756172
027	Roccelina	Cromanos y cromonas	452.1319	138756223
028	Rupicolina (sordidona)	Cromanos y cromonas	240.0189	54147394
029	2.4.6-Trihidroxiacetofenona	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	168.0423	68073
030	2.4-Di-O-metilolivetónido	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	276.1362	13636694
031	Ácido 3.5-diclororselínico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	235.9643	89414482
032	Ácido 4-O- metilolivetolcarboxílico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	238.1205	14749100
033	Ácido 5-clorodivaratinínico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	244.0502	129671086
034	Ácido 5-clororselínico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	202.0033	11206471
035	Atranol	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	152.0473	458186
036	Beta-orcinol	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	138.0681	68103
037	Ácido b-orcinolcarboxílico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	182.0579	736228

038	Cloratranol	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	186.0084	6426722
039	Ácido divárico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	196.0736	20834
040	Ácido divaratinínico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	210.0892	15595747
041	Divarinol	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	152.0837	3083600
042	Glomelina	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	234.0892	14505122
043	Ácido hematómico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	196.0372	6710680
044	Ácido isoevérnico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	182.0579	12310988
045	Metil beta-orcinolcarboxilato	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	196.0736	78435
046	Metil hematommato	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	210.0528	591773
047	Metil orselincarboxilato	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	182.0579	*
048	Ácido olivetolcarboxílico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	224.1049	2826719
049	Olivetónido	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	248.1049	13636701
050	Ácido orselínico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	168.0423	68072
051	Ácido rizónico	Productos de escisión de dépsidos y depsidonas	196.0736	3083580
052	Ácido 3.5-dicloro-2-O- metilanzáico	Dépsidos (Didépsidos)	512.1369	602882
053	Ácido 3-clorodivarático	Dépsidos (Didépsidos)	422.1132	138756189
054	Ácido 5-clorodivarático	Dépsidos (Didépsidos)	422.1132	138756193

055	Ácido anziáico	Dépsidos (Didépsidos)	430.1992	12306720
056	Ácido artoniáico	Dépsidos (Didépsidos)	528.2359	6710684
057	Atranorina	Dépsidos (Didépsidos)	374.1002	68066
058	Ácido beomicésico	Dépsidos (Didépsidos)	374.1002	5321461
059	Ácido barbático	Dépsidos (Didépsidos)	360.1209	167666
060	Cloroatranorina	Dépsidos (Didépsidos)	408.0612	68065
061	Ácido confluéntico	Dépsidos (Didépsidos)	500.241	99614
062	Ácido criptocloroféico	Dépsidos (Didépsidos)	460.2097	613480
063	Ácido difractáico	Dépsidos (Didépsidos)	374.1366	94870
064	Ácido diplosquistésico	Dépsidos (Didépsidos)	334.0689	12309260
065	Ácido divaricático	Dépsidos (Didépsidos)	388.1522	371610
066	Eritrina	Dépsidos (Didépsidos)	422.1213	72946996
067	Ácido evérnico	Dépsidos (Didépsidos)	332.0896	10829
068	Ácido glomélico	Dépsidos (Didépsidos)	472.1733	13940683
069	Ácido glomeliférico	Dépsidos (Didépsidos)	458.1941	15560187
070	Ácido hematamnólico	Dépsidos (Didépsidos)	404.0743	15559606
071	Ácido imbricárico	Dépsidos (Didépsidos)	416.1835	15559746
072	Ácido lecanórico	Dépsidos (Didépsidos)	318.074	99613
073	Ácido merocloroféico	Dépsidos (Didépsidos)	446.1941	71436664
074	Ácido miriquídico	Dépsidos (Didépsidos)	458.1941	90471729
075	Nefroarctina	Dépsidos (Didépsidos)	372.1209	597224
076	Ácido obtusático	Dépsidos (Didépsidos)	346.1053	5320886
077	Ácido olivetórico	Dépsidos (Didépsidos)	472.2097	591238
078	Ácido perlatólico	Dépsidos (Didépsidos)	444.2148	174857
079	Ácido planáico	Dépsidos (Didépsidos)	472.2461	12314357

080	Pseudocifelarina A	Dépsidos (Didépsidos)	402.1315	13964292
081	Escrobiculina	Dépsidos (Didépsidos)	418.1628	86302585
082	Ácido sekikáico	Dépsidos (Didépsidos)	418.1628	12315460
083	Esferoforina	Dépsidos (Didépsidos)	416.1835	371611
084	Ácido squamatic	Dépsidos (Didépsidos)	390.0951	5321482
085	Ácido estenospórico	Dépsidos (Didépsidos)	416.1835	101967025
086	Ácido tamnólico	Dépsidos (Didépsidos)	420.0693	4316933
087	Ácido descarboxitamnológico	Dépsidos (Didépsidos)	376.0794	13387679
088	Tumidulina	Dépsidos (Didépsidos)	400.0117	317010
089	Ácido crustínico	Dépsidos (Didépsidos)	484.1006	102318064
090	Ácido giráforico	Dépsidos (Didépsidos)	468.1056	135728
091	Ácido ovóico	Dépsidos (Didépsidos)	482.1213	14647824
092	Ácido umbilicárico	Dépsidos (Didépsidos)	482.1213	12444590
093	3-Descloro-4-O- metildiploicina	Depsidonas	401.9829	138756190
094	Ácido 3-hidroxicolelénsico	Depsidonas	458.1941	71439067
095	Ácido 3-hidroxifisódico	Depsidonas	486.189	171308
096	Ácido 3-metoxicolelénsico	Depsidonas	472.2097	138756191
097	Ácido 9'-metilprotocetrárico	Depsidonas	388.0794	138756195
098	Ácido alfa-alectorónico	Depsidonas	512.2046	15558610
099	Ácido alfa-colatólico	Depsidonas	526.2203	10650
100	Argopsina	Depsidonas	396.0167	162698
101	Caloploicina	Depsidonas	401.9829	12302268
102	Ácido cetrárico	Depsidonas	402.0951	5464155

103	Ácido clorovirensico	Depsidonas	392.0299	138756200
104	Ácido colensóico	Depsidonas	442.1992	57357939
105	Ácido constíctico	Depsidonas	402.0587	71436827
106	Desclorodiploicina	Depsidonas	387.9672	14607376
107	Diploicina	Depsidonas	421.9282	68244
108	Eriodermina	Depsidonas	382.0011	138756206
109	Ácido fumarprotocetrárico	Depsidonas	472.0642	5317419
110	Gangaleoidina	Depsidonas	412.0117	4565183
111	Ácido hipoprotocetrárico	Depsidonas	344.0896	627044
112	Leoidina	Depsidonas	412.0117	3503223
113	Ácido livídico	Depsidonas	500.2046	90473752
114	Ácido lobárico	Depsidonas	456.1784	73157
115	Ácido nornotático	Depsidonas	330.074	138756219
116	Ácido norstíctico	Depsidonas	372.0481	5379540
117	Ácido notático	Depsidonas	344.0896	542116
118	Pannarina	Depsidonas	362.0557	162780
119	Ácido fisodálico	Depsidonas	416.0743	5489369
120	Ácido fisódico	Depsidonas	470.1941	65751
121	Ácido protocetrárico	Depsidonas	374.0638	5489486
122	Ácido psorómico	Depsidonas	358.0689	23725
123	Ácido salazínico	Depsidonas	388.043	5320418
124	Scensidina	Depsidonas	368.0218	14805248
125	Ácido stíctico	Depsidonas	386.0638	73677
126	Ácido succinprotocetrárico	Depsidonas	474.0798	102239721
127	Ácido variolárico	Depsidonas	314.0427	12444681

128	Ácido virenseico	Depsidonas	358.0689	5315245
129	Ácido picrolíquénico	Depsonas	442.1992	238794
130	Ácido didímico	Dibenzofuranos	370.178	15558736
131	Ácido isousnico	Dibenzofuranos	344.0896	621371
132	Ácido pannárico	Dibenzofuranos	316.0583	12313948
133	Pannarol	Dibenzofuranos	228.0786	12313947
134	Ácido placodiólico	Dibenzofuranos	376.1158	12314419
135	Ácido porfirílico	Dibenzofuranos	314.0427	238793
136	Ácido pseudoplacodiólico	Dibenzofuranos	376.1158	322494
137	Ácido esquizopéltico	Dibenzofuranos	358.1053	101967024
138	Strepsilina	Dibenzofuranos	270.0528	12443050
139	Ácido úsnico	Dibenzofuranos	344.0896	5646
140	Ácido beta-colatólico	Difeniléteres	526.2203	12303790
141	Buellin	Difeniléteres	434.0091	44614015
	Ácido lobariolcarboxílico	Difeniléteres	474.189	56960992
142	(Lobarina)			
143	Micosporina glutamicola	Micosporinas	303.1318	9882880
144	Micosporina glutaminol	Micosporinas	302.1478	138756215
145	Micosporina serinol	Micosporinas	261.1212	442866
146	Simonyellina	Naftopiranos	274.0477	138756224
147	Artotonina	Compuestos nitrogenados	424.2362	11101959
148	Hipotalina	Compuestos nitrogenados	472.2362	138756208
149	Isoartotonina	Compuestos nitrogenados	424.2362	73824231
150	Roccania	Compuestos nitrogenados	488.2424	12315006
151	Solorinina	Compuestos nitrogenados	297.1576	139291810

152	Ácido alopertusárico	Ácidos paracónicos	366.2406	23250951
153	Ácido aloprotolichesterínico	Ácidos paracónicos	324.2301	71443326
154	Ácido dihidroprotolichesterínico	Ácidos paracónicos	326.2457	138756203
155	Ácido dihidromurónico	Ácidos paracónicos	368.2563	138756204
156	Dihidropertusárico	Ácidos paracónicos	368.2563	138756205
157	Ácido isomurólico	Ácidos paracónicos	368.2563	138756209
158	Ácido isomurónico	Ácidos paracónicos	366.2406	138756210
159	Ácido lichesterínico	Ácidos paracónicos	324.2301	89841
160	Ácido murólico	Ácidos paracónicos	368.2563	194349
161	Ácido murónico	Ácidos paracónicos	366.2406	138756214
162	Ácido neodihidroprotolichesterínico	Ácidos paracónicos	326.2457	138756216
163	Ácido nefromópsico	Ácidos paracónicos	326.2457	101289694
164	Ácido nefrosteránico	Ácidos paracónicos	298.2144	138756217
165	Ácido pertusárico	Ácidos paracónicos	366.2406	435925
166	Ácido protolichesterínico	Ácidos paracónicos	324.2301	221373
167	Ácido roccelárico	Ácidos paracónicos	326.2457	10019295
168	Arabitol	Polioles. Monosacáridos. Carbohidratos	152.0685	94154
169	D-Manitol	Polioles. Monosacáridos. Carbohidratos	182.079	6251
170	Mesoeritritol	Polioles. Monosacáridos. Carbohidratos	122.0579	*
171	Volemitol	Polioles. Monosacáridos. Carbohidratos	212.0896	441439
172	Calicina	Derivados del Ácido Pulvínico	306.0528	54694371

173	Epanorina	Derivados del Ácido Pulvínico	435.1682	101710315
174	Ácido leprapínico	Derivados del Ácido Pulvínico	352.0947	54707104
175	Norepanorina	Derivados del Ácido Pulvínico	421.1525	138756218
176	Ácido norrizocárpico	Derivados del Ácido Pulvínico	455.1369	139292154
177	Ácido pinástrico	Derivados del Ácido Pulvínico	352.0947	54679633
178	Ácido pulvínico	Derivados del Ácido Pulvínico	308.0685	54682513
179	Dilactona de ácido pulvínico	Derivados del Ácido Pulvínico	290.0579	72617
180	Ácido rizocárpico	Derivados del Ácido Pulvínico	469.1525	54693697
181	Ácido vulpínico	Derivados del Ácido Pulvínico	322.0841	54690323
182	Acetilhematoventosina	Quinonas	346.0689	138756196
183	Canariona	Quinonas	272.0321	53483342
184	Dimetiléter de canariona	Quinonas	300.0634	138756198
185	Ácido quiodectónico	Quinonas	334.0325	138756199
186	Crisofanol	Quinonas	254.0579	10208
187	Citreorroseína	Quinonas	286.0477	361512
188	Ácido emódico	Quinonas	300.027	361510
189	Emodina	Quinonas	270.0528	3220
190	Endocrocina	Quinonas	314.0427	160483
191	Eritroglauquina	Quinonas	300.0634	10152
192	Fallacinal	Quinonas	298.0477	15559229
193	Fallacinol (Telosquistina)	Quinonas	300.0634	3083633
194	Fragilina	Quinonas	318.0295	15559331
195	Hematomona	Quinonas	314.0427	11066989
196	Hematoventosina	Quinonas	304.0583	101064754
197	Hidroxihematoventosina	Quinonas	320.0532	132520046

198	Metoxihematoventosina	Quinonas	334.0689	132520043
199	Parietina	Quinonas	284.0685	10639
200	Ácido parietínico	Quinonas	314.0427	11507907
201	Ácido polipórico	Quinonas	292.0736	11056
202	Ácido rodocladónico	Quinonas	318.0376	135403806
203	Rugulosina	Quinonas	542.1213	62769
204	Skirina	Quinonas	538.09	73071
205	Ácido solorínico	Quinonas	384.1209	99653
206	Ácido telefórico	Quinonas	352.0219	135464206
207	Xantorina	Quinonas	300.0634	12444971
208	Isocaurano	Terpenoides: Diterpenos	272.2504	521318
209	Caurano	Terpenoides: Diterpenos	272.2504	65390
210	12-Desoxidiacetilpixinol	Terpenoides: Diterpenos	544.4128	138756177
211	17(21)-Hopen-3-ona	Terpenoides: Diterpenos	424.3705	138756178
212	17(21)-Hopen-6-ona	Terpenoides: Diterpenos	424.3705	138756179
213	21-Hopen-3-ona	Terpenoides: Diterpenos	424.3705	138756178
214	22a-Acetoxi-3-stictanona	Terpenoides: Diterpenos	484.3916	138756181
215	22-Hidroxi-2-hopen-1-ona	Terpenoides: Diterpenos	440.3654	138756182
216	22-Hidroxi-1-hopanona	Terpenoides: Diterpenos	442.3811	138756183
217	22-hidroxi-6-hopanona	Terpenoides: Diterpenos	442.3811	138756184
218	22-hidroxi-7-hopanona	Terpenoides: Diterpenos	442.3811	138756185
	25-Acetoxi-3b-hidroxi-			
	20(S).24(R)-	Terpenoides: Diterpenos	502.4022	138756186
219	epoxidammarano			
220	2a-Acetoxi-3.22-stictandiona	Terpenoides: Diterpenos	498.3709	138756187

221	6a-Acetoxi-17(21)-hopeno	Terpenoides: Diterpenos	468.3967	138756194
222	Diacetilpixinol	Terpenoides: Diterpenos	560.4077	138756202
223	Ácido ursólico	Terpenoides: Diterpenos	456.3603	64945
224	1,3,6-tri-O-metilartotelina	Xantonas y bis-Xantonas	401.9829	12564453
225	1,6-Dihidroxi-3.8-dimetilxantona	Xantonas y bis-Xantonas	256.0736	138756176
226	2,4,5-Tricloronorlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	354.0062	5359039
227	2,4-Dicloro-3,6-di-O-metilnorlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	354.0062	*
228	2.4-Diclorolichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	325.9749	53440779
229	2.4-Dicloronorlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	387.9672	101293602
230	2.5.7-triclorolichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	368.0218	14992094
231	2.5-Dicloro-1.3.6-tri-O-metilnorlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	354.0062	12564445
232	2.5-Diclorolichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	325.9749	330628
233	2.5-Dicloronorlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	306.0295	71374324
234	2-Cloro-6-O-metilnorlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	292.0139	138756188
235	2-Cloronorlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	306.0295	5378394
236	4-Cloro-6-O-metilnorlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	320.0452	85931570
237	4-Clorolichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	292.0139	85931584
238	4-Cloronorlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	373.9516	5359040
239	6-O-Metilartotelina	Xantonas y bis-Xantonas	292.0139	14703291

240	7-Cloronorlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	359.9359	*
241	Artotelina	Xantonas y bis-Xantonas	286.0841	5359039
242	Lichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	258.0528	5358904
243	Norlichexantona	Xantonas y bis-Xantonas	638.1636	5281657
244	Ácido secalónico A	Xantonas y bis-Xantonas	638.1636	169680
245	Ácido secalónico B	Xantonas y bis-Xantonas	638.1636	182227
246	Ácido secalónico D	Xantonas y bis-Xantonas	638.1636	73431
247	Ácido secalónico F	Xantonas y bis-Xantonas	393.8969	185991
248	Ácido tiofánico	Xantonas y bis-Xantonas	339.9905	325789
249	Ácido tiofanínico	Xantonas y bis-Xantonas	373.9516	12444298
250	Turingiona	Xantonas y bis-Xantonas	306.0295	12564457
251	Vinetorina	Xantonas y bis-Xantonas	298.2144	5384285

* Compuestos dibujados en avogadro

**ANEXO B. Listado completo de residuos y átomos faltantes en la estructura PDB
(7E3D)**

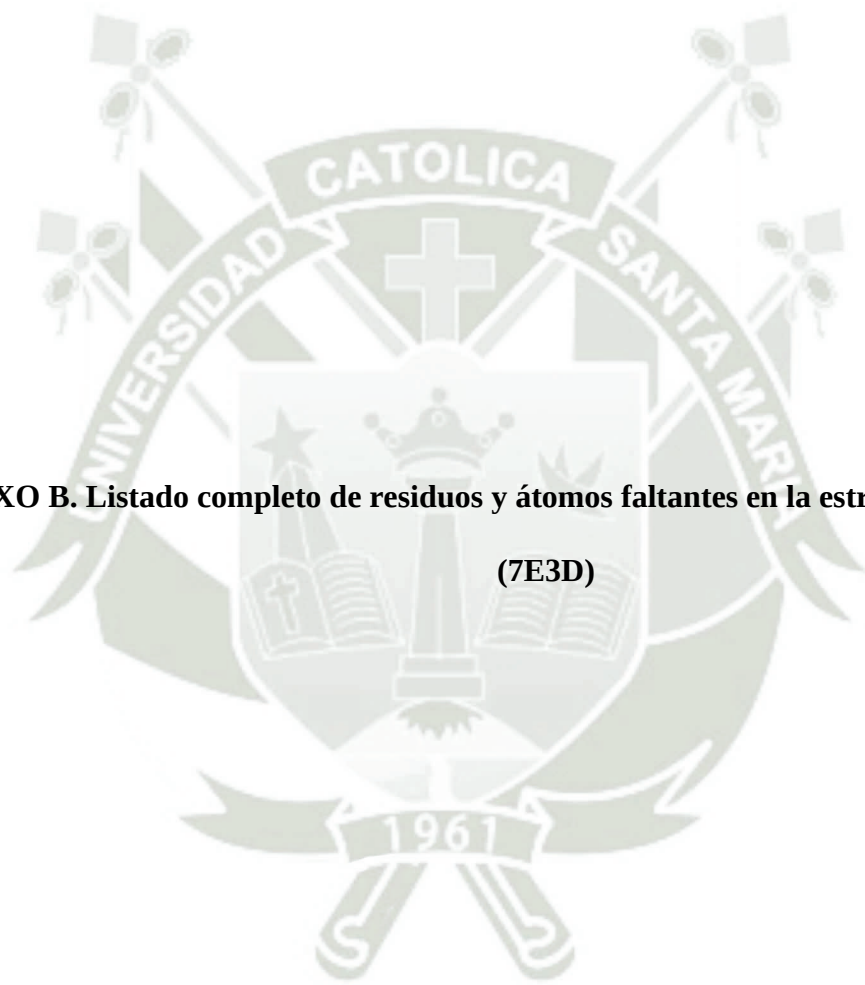


Figura B.1. Datos extraídos de la sección REMARK 465 del archivo PDB.

MISSING RESIDUES

THE FOLLOWING RESIDUES WERE NOT LOCATED IN
THE EXPERIMENT. (M=MODEL NUMBER; RES=RESIDUE
NAME; C=CHAIN IDENTIFIER; SSSEQ=SEQUENCE
NUMBER; I=INSERTION CODE.)

M RES C SSSEQI

PRO A 259

GLY A 260

GLY A 261

THR A 262

GLY A 263

GLY A 264

PRO A 495

LYS A 496

ALA A 497

THR A 543

GLY B 260

GLY B 261

ARG B 493

ASP B 494

THR B 543

Figura B.2: Datos extraídos de la sección REMARK 470. Átomos listados en notación estándar PDB.

MISSING ATOM

THE FOLLOWING RESIDUES HAVE MISSING ATOMS

(M=MODEL NUMBER; RES=RESIDUE NAME; C=CHAIN

IDENTIFIER; SSEQ=SEQUENCE NUMBER; I=INSERTION

CODE) :

M RES CSSEQI ATOMS

GLU A 4 CG CD OE1 OE2

ARG A 165 CG CD NE CZ NH1 NH2

GLU A 491 CG CD OE1 OE2

ARG A 493 CG CD NE CZ NH1 NH2

LYS B 23 CE NZ

GLU B 81 CG CD OE1 OE2

GLU B 491 CG CD OE1 OE2

LYS B 496 CG CD CE NZ



ANEXO C. Tabla de afinidades de unión (kcal/mol)

Tabla C. Tabla de afinidades de unión (kcal/mol).

Complejo	Afinidad de Unión (kcal/mol)				
	Cálculo I	Cálculo II	Cálculo III	Cálculo IV	Promedio $\pm$ DE
AChE_090	-10.70	-10.70	-10.70	-10.70	-10.70 $\pm$ 0.00
AChE_204	-10.60	-10.60	-10.60	-10.60	-10.60 $\pm$ 0.00
AChE_179	-10.40	-10.40	-10.30	-10.40	-10.38 $\pm$ 0.05
AChE_190	-10.20	-10.20	-10.20	-10.20	-10.20 $\pm$ 0.00
AChE_116	-10.00	-10.00	-10.00	-10.00	-10.00 $\pm$ 0.00
AChE_186	-9.90	-10.00	-10.00	-10.00	-9.98 $\pm$ 0.05
AChE_092	-9.90	-9.90	-10.00	-10.00	-9.95 $\pm$ 0.06
AChE_135	-9.90	-9.90	-9.90	-9.90	-9.90 $\pm$ 0.00
AChE_172	-9.90	-9.90	-9.90	-9.90	-9.90 $\pm$ 0.00
AChE_201	-9.90	-9.90	-9.90	-9.90	-9.90 $\pm$ 0.00
AChE_189	-9.80	-9.80	-9.80	-9.80	-9.80 $\pm$ 0.00
AChE_191	-9.80	-9.80	-9.80	-9.80	-9.80 $\pm$ 0.00
AChE_206	-9.80	-9.80	-9.80	-9.80	-9.80 $\pm$ 0.00
AChE_207	-9.80	-9.80	-9.80	-9.80	-9.80 $\pm$ 0.00
AChE_194	-9.70	-9.70	-9.70	-9.80	-9.73 $\pm$ 0.05
AChE_091	-9.70	-9.70	-9.70	-9.70	-9.70 $\pm$ 0.00
AChE_138	-9.70	-9.70	-9.70	-9.70	-9.70 $\pm$ 0.00
AChE_183	-9.70	-9.70	-9.70	-9.70	-9.70 $\pm$ 0.00
AChE_195	-9.70	-9.70	-9.70	-9.70	-9.70 $\pm$ 0.00
AChE_199	-9.70	-9.70	-9.70	-9.70	-9.70 $\pm$ 0.00
AChE_064	-9.70	-9.70	-9.60	-9.70	-9.68 $\pm$ 0.05
AChE_131	-9.60	-9.60	-9.60	-9.60	-9.60 $\pm$ 0.00
AChE_132	-9.60	-9.60	-9.60	-9.60	-9.60 $\pm$ 0.00
AChE_188	-9.60	-9.60	-9.60	-9.60	-9.60 $\pm$ 0.00
AChE_200	-9.60	-9.60	-9.60	-9.60	-9.60 $\pm$ 0.00
AChE_225	-9.60	-9.60	-9.60	-9.60	-9.60 $\pm$ 0.00

AChE_192	-9.60	-9.60	-9.60	-9.50	-9.58 ± 0.05
AChE_123	-9.40	-9.40	-9.40	-9.40	-9.40 ± 0.00
AChE_125	-9.40	-9.40	-9.40	-9.40	-9.40 ± 0.00
AChE_187	-9.40	-9.40	-9.40	-9.40	-9.40 ± 0.00
AChE_196	-9.40	-9.40	-9.40	-9.40	-9.40 ± 0.00
AChE_208	-9.40	-9.40	-9.40	-9.40	-9.40 ± 0.00
AChE_184	-9.30	-9.30	-9.50	-9.30	-9.35 ± 0.10
AChE_Donepezilo	-9.60	-8.90	-9.20	-9.70	-9.35 ± 0.37
AChE_068	-9.30	-9.30	-9.40	-9.30	-9.33 ± 0.05
AChE_087	-9.30	-9.30	-9.30	-9.30	-9.30 ± 0.00
AChE_127	-9.30	-9.30	-9.30	-9.30	-9.30 ± 0.00
AChE_176	-9.30	-9.30	-9.30	-9.30	-9.30 ± 0.00
AChE_193	-9.30	-9.30	-9.30	-9.30	-9.30 ± 0.00
AChE_205	-9.30	-9.30	-9.30	-9.30	-9.30 ± 0.00
AChE_084	-9.20	-9.30	-9.20	-9.20	-9.23 ± 0.05
AChE_072	-9.20	-9.20	-9.20	-9.20	-9.20 ± 0.00
AChE_122	-9.20	-9.20	-9.20	-9.20	-9.20 ± 0.00
AChE_173	-9.20	-9.30	-9.30	-9.00	-9.20 ± 0.14
AChE_180	-9.40	-9.40	-9.30	-8.70	-9.20 ± 0.34
AChE_240	-9.20	-9.20	-9.20	-9.20	-9.20 ± 0.00
AChE_248	-9.20	-9.20	-9.20	-9.20	-9.20 ± 0.00
AChE_203	-8.80	-9.30	-9.30	-9.30	-9.18 ± 0.25
AChE_067	-9.20	-9.10	-9.20	-9.20	-9.18 ± 0.05
AChE_065	-9.20	-9.10	-9.20	-9.10	-9.15 ± 0.06
AChE_014	-9.10	-9.10	-9.10	-9.20	-9.13 ± 0.05
AChE_015	-9.10	-9.10	-9.20	-9.10	-9.13 ± 0.05
AChE_066	-9.20	-9.20	-9.20	-8.90	-9.13 ± 0.15
AChE_149	-9.60	-8.30	-9.40	-9.20	-9.13 ± 0.57
AChE_076	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10 ± 0.00

AChE_080	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10 ± 0.00
AChE_106	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10 ± 0.00
AChE_175	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10 ± 0.00
AChE_202	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10 ± 0.00
AChE_229	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10 ± 0.00
AChE_235	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10 ± 0.00
AChE_243	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10	-9.10 ± 0.00
AChE_024	-9.10	-9.00	-9.10	-9.10	-9.08 ± 0.05
AChE_244	-9.10	-9.00	-9.10	-9.10	-9.08 ± 0.05
AChE_108	-9.10	-9.10	-9.10	-9.00	-9.08 ± 0.05
AChE_178	-9.00	-9.00	-9.10	-9.00	-9.03 ± 0.05
AChE_016	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00 ± 0.00
AChE_060	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00 ± 0.00
AChE_133	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00 ± 0.00
AChE_226	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00 ± 0.00
AChE_233	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00 ± 0.00
AChE_241	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00	-9.00 ± 0.00
AChE_056	-9.10	-8.90	-9.10	-8.80	-8.98 ± 0.15
AChE_083	-9.10	-8.80	-9.00	-9.00	-8.98 ± 0.13
AChE_238	-9.00	-9.00	-8.90	-9.00	-8.98 ± 0.05
AChE_058	-8.90	-9.00	-8.90	-9.00	-8.95 ± 0.06
AChE_069	-9.10	-8.80	-8.80	-9.10	-8.95 ± 0.17
AChE_101	-9.00	-9.00	-8.90	-8.90	-8.95 ± 0.06
AChE_057	-8.80	-8.90	-9.00	-9.00	-8.93 ± 0.10
AChE_085	-8.90	-8.90	-9.00	-8.90	-8.93 ± 0.05
AChE_197	-8.90	-8.90	-9.00	-8.90	-8.93 ± 0.05
AChE_137	-9.00	-8.90	-8.90	-8.90	-8.93 ± 0.05
AChE_053	-8.30	-9.10	-9.10	-9.10	-8.90 ± 0.39
AChE_059	-8.90	-8.90	-8.90	-8.90	-8.90 ± 0.00

AChE_075	-8.90	-8.90	-8.90	-8.90	-8.90 ± 0.00
AChE_088	-8.90	-8.90	-8.90	-8.90	-8.90 ± 0.00
AChE_174	-8.90	-8.90	-8.90	-8.90	-8.90 ± 0.00
AChE_250	-8.90	-8.90	-8.90	-8.90	-8.90 ± 0.00
AChE_061	-8.90	-8.80	-8.90	-8.90	-8.88 ± 0.05
AChE_074	-8.90	-8.80	-8.90	-8.90	-8.88 ± 0.05
AChE_234	-8.90	-8.90	-8.90	-8.80	-8.88 ± 0.05
AChE_109	-8.90	-8.80	-8.80	-8.80	-8.83 ± 0.05
AChE_078	-8.90	-8.80	-8.70	-8.80	-8.80 ± 0.08
AChE_086	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80 ± 0.00
AChE_185	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80 ± 0.00
AChE_227	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80 ± 0.00
AChE_228	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80 ± 0.00
AChE_236	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80 ± 0.00
AChE_237	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80 ± 0.00
AChE_242	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80 ± 0.00
AChE_251	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80	-8.80 ± 0.00
AChE_025	-8.80	-8.80	-8.70	-8.80	-8.78 ± 0.05
AChE_063	-8.80	-8.80	-8.70	-8.80	-8.78 ± 0.05
AChE_140	-8.80	-8.80	-9.00	-8.50	-8.78 ± 0.21
AChE_055	-8.80	-8.70	-8.80	-8.70	-8.75 ± 0.06
AChE_105	-8.70	-8.70	-8.80	-8.80	-8.75 ± 0.06
AChE_249	-8.70	-8.80	-8.80	-8.70	-8.75 ± 0.06
AChE_146	-8.70	-8.70	-8.80	-8.70	-8.73 ± 0.05
AChE_239	-8.70	-8.80	-8.70	-8.70	-8.73 ± 0.05
AChE_198	-8.70	-8.70	-8.70	-8.70	-8.70 ± 0.00
AChE_224	-8.70	-8.70	-8.60	-8.70	-8.68 ± 0.05
AChE_022	-8.60	-8.60	-8.60	-8.60	-8.60 ± 0.00
AChE_111	-8.60	-8.60	-8.60	-8.60	-8.60 ± 0.00

AChE_112	-8.60	-8.60	-8.60	-8.60	-8.60 ± 0.00
AChE_231	-8.60	-8.60	-8.60	-8.60	-8.60 ± 0.00
AChE_232	-8.60	-8.60	-8.60	-8.60	-8.60 ± 0.00
AChE_098	-8.70	-8.60	-8.40	-8.70	-8.60 ± 0.14
AChE_019	-8.60	-8.50	-8.60	-8.60	-8.58 ± 0.05
AChE_107	-8.80	-8.80	-8.80	-7.90	-8.58 ± 0.45
AChE_077	-8.90	-8.70	-8.00	-8.60	-8.55 ± 0.39
AChE_120	-8.70	-8.60	-8.50	-8.40	-8.55 ± 0.13
AChE_070	-8.50	-8.50	-8.50	-8.60	-8.53 ± 0.05
AChE_099	-8.40	-8.60	-8.70	-8.40	-8.53 ± 0.15
AChE_110	-8.50	-8.50	-8.50	-8.50	-8.50 ± 0.00
AChE_118	-8.50	-8.50	-8.50	-8.50	-8.50 ± 0.00
AChE_126	-8.50	-8.50	-8.50	-8.50	-8.50 ± 0.00
AChE_128	-8.50	-8.50	-8.50	-8.50	-8.50 ± 0.00
AChE_177	-8.60	-8.60	-8.20	-8.60	-8.50 ± 0.20
AChE_071	-8.50	-8.50	-8.50	-8.40	-8.48 ± 0.05
AChE_181	-8.50	-8.40	-8.50	-8.50	-8.48 ± 0.05
AChE_124	-8.40	-8.50	-8.40	-8.50	-8.45 ± 0.06
AChE_139	-8.40	-8.40	-8.50	-8.50	-8.45 ± 0.06
AChE_162	-8.40	-8.40	-8.50	-8.50	-8.45 ± 0.06
AChE_230	-8.40	-8.50	-8.40	-8.50	-8.45 ± 0.06
AChE_115	-8.40	-8.40	-8.40	-8.40	-8.40 ± 0.00
AChE_150	-8.40	-8.40	-8.40	-8.40	-8.40 ± 0.00
AChE_219	-8.40	-8.40	-8.40	-8.40	-8.40 ± 0.00
AChE_247	-8.40	-8.40	-8.40	-8.40	-8.40 ± 0.00
AChE_158	-8.40	-8.30	-8.40	-8.40	-8.38 ± 0.05
AChE_103	-8.30	-8.40	-8.30	-8.40	-8.35 ± 0.06
AChE_130	-8.40	-8.40	-8.40	-8.20	-8.35 ± 0.10
AChE_148	-8.40	-8.30	-8.40	-8.30	-8.35 ± 0.06

AChE_027	-8.30	-8.30	-8.30	-8.30	-8.30 ± 0.00
AChE_089	-8.30	-8.30	-8.30	-8.30	-8.30 ± 0.00
AChE_157	-8.00	-8.60	-8.20	-8.40	-8.30 ± 0.26
AChE_212	-8.30	-8.20	-8.40	-8.30	-8.30 ± 0.08
AChE_030	-8.30	-8.30	-8.20	-8.30	-8.28 ± 0.05
AChE_155	-8.20	-8.30	-8.30	-8.30	-8.28 ± 0.05
AChE_182	-8.20	-8.30	-8.30	-8.30	-8.28 ± 0.05
AChE_161	-8.40	-8.10	-8.30	-8.20	-8.25 ± 0.13
AChE_156	-8.10	-8.30	-8.30	-8.20	-8.23 ± 0.10
AChE_018	-8.20	-8.20	-8.20	-8.20	-8.20 ± 0.00
AChE_049	-8.20	-8.20	-8.20	-8.20	-8.20 ± 0.00
AChE_054	-8.20	-8.20	-8.20	-8.20	-8.20 ± 0.00
AChE_113	-8.20	-8.20	-8.30	-8.10	-8.20 ± 0.08
AChE_093	-8.20	-8.10	-8.20	-8.20	-8.18 ± 0.05
AChE_160	-8.20	-8.20	-8.10	-8.10	-8.15 ± 0.06
AChE_152	-8.20	-8.20	-8.00	-8.10	-8.13 ± 0.10
AChE_221	-8.40	-7.40	-8.40	-8.30	-8.13 ± 0.49
AChE_246	-8.60	-8.50	-7.70	-7.70	-8.13 ± 0.49
AChE_165	-8.10	-8.00	-8.00	-8.30	-8.10 ± 0.14
AChE_100	-8.10	-8.10	-8.10	-8.10	-8.10 ± 0.00
AChE_136	-8.10	-8.10	-8.10	-8.10	-8.10 ± 0.00
AChE_218	-8.10	-8.10	-8.10	-8.10	-8.10 ± 0.00
AChE_073	-8.10	-8.10	-8.20	-7.90	-8.08 ± 0.13
AChE_117	-8.10	-8.10	-8.10	-8.00	-8.08 ± 0.05
AChE_223	-8.00	-8.10	-8.10	-8.00	-8.05 ± 0.06
AChE_001	-7.90	-8.10	-8.10	-8.00	-8.03 ± 0.10
AChE_052	-8.00	-8.00	-8.00	-8.10	-8.03 ± 0.05
AChE_119	-8.00	-8.10	-8.00	-8.00	-8.03 ± 0.05
AChE_154	-8.00	-7.80	-8.30	-8.00	-8.03 ± 0.21

AChE_167	-8.20	-7.60	-8.20	-8.10	-8.03 ± 0.29
AChE_159	-8.00	-7.70	-8.10	-8.30	-8.03 ± 0.25
AChE_097	-8.00	-8.00	-8.00	-8.00	-8.00 ± 0.00
AChE_153	-8.10	-8.00	-8.00	-7.90	-8.00 ± 0.08
AChE_166	-8.10	-8.00	-8.00	-7.90	-8.00 ± 0.08
AChE_215	-8.00	-8.00	-8.00	-8.00	-8.00 ± 0.00
AChE_216	-8.00	-8.00	-8.00	-8.00	-8.00 ± 0.00
AChE_141	-8.00	-7.90	-7.90	-7.90	-7.93 ± 0.05
AChE_062	-7.80	-7.90	-7.80	-8.20	-7.93 ± 0.19
AChE_017	-7.90	-7.90	-7.90	-7.90	-7.90 ± 0.00
AChE_026	-8.00	-7.80	-7.80	-8.00	-7.90 ± 0.12
AChE_028	-7.90	-7.90	-7.90	-7.90	-7.90 ± 0.00
AChE_121	-7.90	-7.80	-7.90	-7.90	-7.88 ± 0.05
AChE_002	-7.90	-7.90	-7.70	-7.90	-7.85 ± 0.10
AChE_042	-7.80	-7.90	-7.80	-7.80	-7.83 ± 0.05
AChE_081	-7.90	-7.80	-7.70	-7.90	-7.83 ± 0.10
AChE_082	-7.80	-7.80	-7.80	-7.90	-7.83 ± 0.05
AChE_020	-7.80	-7.80	-7.80	-7.80	-7.80 ± 0.00
AChE_021	-7.80	-7.80	-7.80	-7.80	-7.80 ± 0.00
AChE_023	-7.80	-7.80	-7.80	-7.80	-7.80 ± 0.00
AChE_134	-7.80	-7.80	-7.80	-7.80	-7.80 ± 0.00
AChE_163	-7.70	-7.80	-7.90	-7.80	-7.80 ± 0.08
AChE_164	-7.90	-7.80	-7.80	-7.70	-7.80 ± 0.08
AChE_217	-7.90	-7.90	-7.70	-7.70	-7.80 ± 0.12
AChE_008	-7.70	-7.80	-7.80	-7.70	-7.75 ± 0.06
AChE_094	-7.70	-7.80	-7.70	-7.70	-7.73 ± 0.05
AChE_048	-7.70	-7.70	-7.70	-7.70	-7.70 ± 0.00
AChE_209	-7.70	-7.70	-7.70	-7.70	-7.70 ± 0.00
AChE_245	-7.70	-7.70	-7.70	-7.70	-7.70 ± 0.00

AChE_104	-7.80	-7.60	-7.70	-7.70	-7.70 ± 0.08
AChE_129	-7.60	-7.70	-7.70	-7.60	-7.65 ± 0.06
AChE_003	-7.50	-7.70	-7.70	-7.60	-7.63 ± 0.10
AChE_005	-7.60	-7.60	-7.70	-7.60	-7.63 ± 0.05
AChE_007	-7.70	-7.70	-7.40	-7.70	-7.63 ± 0.15
AChE_102	-7.60	-7.70	-7.60	-7.60	-7.63 ± 0.05
AChE_079	-7.40	-7.60	-7.70	-7.70	-7.60 ± 0.14
AChE_210	-7.60	-7.60	-7.60	-7.60	-7.60 ± 0.00
AChE_032	-7.50	-7.60	-7.60	-7.60	-7.58 ± 0.05
AChE_144	-7.50	-7.50	-7.50	-7.40	-7.48 ± 0.05
AChE_142	-7.50	-7.50	-7.40	-7.40	-7.45 ± 0.06
AChE_011	-7.40	-7.40	-7.40	-7.40	-7.40 ± 0.00
AChE_013	-7.40	-7.40	-7.40	-7.40	-7.40 ± 0.00
AChE_222	-7.30	-7.40	-7.40	-7.40	-7.38 ± 0.05
AChE_009	-7.40	-7.30	-7.30	-7.30	-7.33 ± 0.05
AChE_114	-7.30	-7.30	-7.30	-7.40	-7.33 ± 0.05
AChE_010	-7.30	-7.30	-7.30	-7.30	-7.30 ± 0.00
AChE_095	-7.20	-7.10	-7.40	-7.40	-7.28 ± 0.15
AChE_143	-7.30	-7.30	-7.20	-7.20	-7.25 ± 0.06
AChE_147	-7.20	-7.60	-7.30	-6.90	-7.25 ± 0.29
AChE_040	-7.20	-7.20	-7.20	-7.30	-7.23 ± 0.05
AChE_006	-7.40	-7.20	-6.90	-7.40	-7.23 ± 0.24
AChE_033	-7.20	-7.30	-7.20	-7.20	-7.23 ± 0.05
AChE_031	-7.20	-7.20	-7.20	-7.20	-7.20 ± 0.00
AChE_037	-7.20	-7.20	-7.20	-7.20	-7.20 ± 0.00
AChE_039	-7.20	-7.20	-7.20	-7.20	-7.20 ± 0.00
AChE_045	-7.20	-7.20	-7.20	-7.20	-7.20 ± 0.00
AChE_096	-7.20	-7.10	-7.20	-7.20	-7.18 ± 0.05
AChE_034	-7.10	-7.10	-7.20	-7.10	-7.13 ± 0.05

AChE_043	-7.10	-7.10	-7.10	-7.10	-7.10 ± 0.00
AChE_151	-7.00	-7.00	-7.10	-7.00	-7.03 ± 0.05
AChE_220	-6.90	-6.90	-6.90	-7.30	-7.00 ± 0.20
AChE_046	-7.00	-7.00	-7.00	-6.90	-6.98 ± 0.05
AChE_051	-6.90	-6.90	-6.90	-6.90	-6.90 ± 0.00
AChE_213	-6.90	-6.90	-6.90	-6.90	-6.90 ± 0.00
AChE_211	-7.00	-7.00	-6.70	-6.70	-6.85 ± 0.17
AChE_047	-6.80	-6.80	-6.90	-6.80	-6.83 ± 0.05
AChE_145	-6.70	-6.80	-6.80	-6.70	-6.75 ± 0.06
AChE_044	-6.70	-6.70	-6.70	-6.70	-6.70 ± 0.00
AChE_050	-6.70	-6.70	-6.70	-6.70	-6.70 ± 0.00
AChE_041	-6.60	-6.60	-6.60	-6.60	-6.60 ± 0.00
AChE_038	-6.50	-6.50	-6.60	-6.60	-6.55 ± 0.06
AChE_029	-6.50	-6.50	-6.50	-6.50	-6.50 ± 0.00
AChE_035	-6.30	-6.30	-6.30	-6.30	-6.30 ± 0.00
AChE_036	-6.10	-6.10	-6.10	-6.10	-6.10 ± 0.00
AChE_214	-5.50	-6.30	-6.10	-6.30	-6.05 ± 0.38
AChE_012	-5.60	-5.90	-5.90	-5.80	-5.80 ± 0.14
AChE_171	-5.70	-5.70	-5.70	-5.70	-5.70 ± 0.00
AChE_169	-5.40	-5.40	-5.40	-5.40	-5.40 ± 0.00
AChE_Acetilcolina	-5.10	-5.10	-5.10	-5.10	-5.10 ± 0.00
AChE_168	-5.00	-5.00	-5.00	-5.00	-5.00 ± 0.00
AChE_004	-4.80	-4.80	-4.80	-4.80	-4.80 ± 0.00
AChE_170	-4.30	-4.50	-4.50	-4.50	-4.45 ± 0.10

ANEXO D. Propiedades fisicoquímicas de los 33 compuestos analizados

Tabla D.1. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos analizados y regla de cinco de Lipinski.

ID	Log P	HBD	HBA	PM g/mol	TPSA Å ²	LogS	Fracción C sp ³	NrotB
090	3.22	5	10	468.41	170.82	-6.2	0.12	7
204	3.28	6	10	538.46	189.66	-6.79	0.07	1
179	2.95	0	4	290.27	52.6	-3.79	0	2
190	1.43	4	7	314.25	132.13	-3.87	0.06	1
116	1.79	3	9	372.28	139.59	-3.92	0.17	1
186	2.38	2	4	254.24	74.6	-4.11	0.07	0
092	3.46	4	10	482.44	159.82	-6.07	0.16	8
135	2	3	7	314.25	117.2	-3.92	0.12	1
172	2.61	1	5	306.27	72.83	-3.71	0	1
201	2.46	2	4	292.29	74.6	-3.82	0	2
189	1.87	3	5	270.24	94.83	-3.67	0.07	0
191	1.97	3	6	300.26	104.06	-4.08	0.12	1
206	1.72	4	8	352.25	141.34	-4.38	0	0
207	2.03	3	6	300.26	104.06	-4.08	0.12	1
194	2.77	2	5	318.71	83.83	-4.47	0.12	1
091	3.5	4	10	482.44	159.82	-6.07	0.16	8
138	2.53	2	5	270.24	79.9	-4.07	0.13	0
183	1.07	2	6	272.21	104.81	-2.55	0.07	0
195	1.26	4	7	314.25	132.13	-3.51	0.06	1
199	2.27	2	5	284.26	83.83	-3.87	0.12	1
064	1.6	5	8	334.28	144.52	-4.08	0.12	4
131	1.56	3	7	344.32	121.13	-3.35	0.28	2
132	-4.16	4	7	316.26	128.2	-4.16	0.12	2
188	1.07	4	7	300.22	132.13	-3.22	0	1
200	1.5	3	7	314.25	121.13	-3.43	0.06	2

225	2.76	2	4	256.25	70.67	-4.2	0.13	0
192	1.64	2	6	298.25	100.9	-3.31	0.06	2
123	1.04	4	10	388.28	159.82	-3.16	0.17	2
125	1.91	2	9	386.31	128.59	-3.79	0.21	2
187	1.08	4	6	286.24	115.06	-2.9	0.07	1
196	1.33	2	7	304.25	110.13	-3.34	0.27	1
208	5.73	0	0	272.47	0	-5.88	0.9	0
184	1.54	0	6	300.26	82.81	-2.63	0.19	2
Donepezilo	4	0	4	379.49	38.77	-4.81	0.46	6

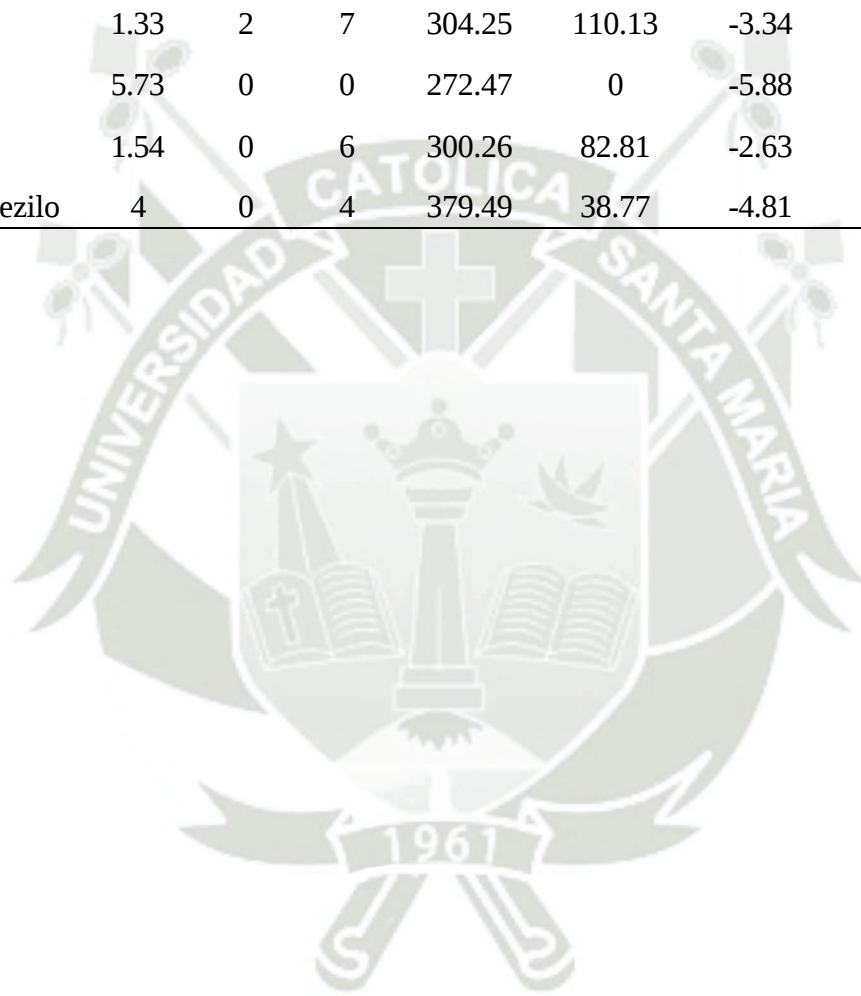


Tabla D.2: Propiedades farmacocinéticas de metabolitos con SwissADME

ID	Absorción GI	Permeabilidad BHE	Sustrato P-gp	Inhibición CYP1A2	Inhibición CYP2C19	Inhibición CYP2C9	Inhibición CYP2D6	Inhibición CYP3A4	Puntuación de biodisponibilidad
090	BAJA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0.11
204	BAJA	NO	NO	NO	SI	SI	NO	NO	0.17
179	ALTA	SI	NO	SI	SI	SI	NO	NO	0.85
190	ALTA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	0.56
116	ALTO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	0.55
186	ALTA	SI	NO	SI	NO	NO	NO	SI	0.55
092	BAJA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0.11
135	ALTA	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	0.56
172	ALTA	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NO	0.85
201	ALTA	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	0.85
189	ALTA	NO	NO	SI	NO	NO	NO	SI	0.55
191	ALTA	NO	NO	SI	NO	SI	NO	SI	0.55
206	BAJA	NO	NO	SI	NO	SI	SI	SI	0.55
207	ALTA	NO	NO	SI	NO	SI	NO	SI	0.55
194	ALTA	NO	NO	SI	NO	SI	NO	SI	0.55
091	BAJA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0.11

138	ALTA	NO	NO	SI	NO	NO	SI	SI	0.55
183	ALTA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	0.56
195	ALTA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	0.55
199	ALTA	NO	NO	SI	NO	SI	NO	SI	0.55
064	BAJA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0.56
131	ALTA	NO	NO	NO	NO	SI	NO	SI	0.56
132	ALTA	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	0.56
188	ALTA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0.56
200	ALTA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	0.55
225	ALTA	SI	NO	SI	NO	NO	SI	SI	0.55
192	ALTA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	0.55
123	BAJA	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	0.55
125	ALTA	NO	SI	NO	NO	SI	NO	NO	0.55
187	ALTO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	0.56
196	ALTO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0.55
208	BAJA	NO	NO	SI	SI	SI	NO	NO	0.56
184	ALTA	NO	NO	SI	NO	NO	NO	SI	0.55
Donepezilo	ALTA	SI	SI	NO	NO	NO	SI	SI	0.55



ANEXO E. SMILES de los compuestos con mayor afinidad

Tabla E.1: SMILES de los compuestos con mayor afinidad.

ID	Metabolito	SMILES
090	Ácido girálico	<chem>CC1=CC(=CC(=C1C(=O)OC2=CC(=C(C(=C2)C)C(=O)OC3=CC(=C(C(=C3)C)C(=O)O)O)O)O)O</chem>
204	Esquirina	<chem>CC1=CC2=C(C(=C1)O)C(=O)C3=C(C=C(C(=C3C2=O)C4=C5C(=C(C(=C4O)O)C(=O)C6=C(C5=O)C=C(C(=C6O)C)O)O)O</chem>
179	Dilactona de ácido pulvínico	<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=C3C(=C(C(=O)O3)C4=CC=CC=C4)OC2=O</chem>
190	Endocrocina	<chem>CC1=CC2=C(C(=C1C(=O)O)O)C(=O)C3=C(C2=O)C=C(C(=C3O)O</chem>
116	Ácido norstúctico	<chem>CC1=CC(=C(C2=C1C(=O)OC3=C(O2)C4=C(C(=C3C)O)C(=O)OC4O)C=O)O</chem>
186	Crisofanol	<chem>CC1=CC2=C(C(=C1)O)C(=O)C3=C(C2=O)C=CC=C3O</chem>
092	Ácido umbelicárico	<chem>CC1=CC(=CC(=C1C(=O)OC2=CC(=C(C(=C2)C)C(=O)OC3=CC(=C(C(=C3)C)C(=O)O)O)O)OC)O</chem>
135	Ácido porfirílico	<chem>CC1=CC(=C2C3=C(C=C(C4=C3COC4=O)O)OC2=C1C(=O)O)O</chem>
172	Calicina	<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=C(/C(=C\3/C4=CC=CC=C4OC3=O)/OC2=O)O</chem>
201	Ácido polipórico	<chem>OC(C(C1CCCCC1)=C1O)=O=C(C2CCCCC2)C1=O</chem>
189	Emodina	<chem>CC1=CC2=C(C(=C1)O)C(=O)C3=C(C2=O)C=C(C(=C3O)O</chem>
191	Eritroglauquina	<chem>CC1=CC(=C2C(=C1O)C(=O)C3=C(C2=O)C(=CC(=C3)OC)O)O</chem>
206	Ácido telefórico	<chem>C1=C2C(=CC(=C1O)O)OC3=C2C(=O)C4=C(C3=O)C5=CC(=C(C(=C5O4)O)O)O</chem>
207	Xantorina	<chem>CC1=CC2=C(C(=C1)O)C(=O)C3=C(C2=O)C(=C(C(=C3O)OC)O</chem>
194	Fragilina	<chem>CC1=CC2=C(C(=C1)O)C(=O)C3=C(C(=C(C(=C3C2=O)OC)Cl)O</chem>
091	Ácido óvico	<chem>CC1=CC(=CC(=C1C(=O)OC2=CC(=C(C(=C2)C)C(=O)OC3=CC(=C(C(=C3)C)C(=O)O)O)OC)O)O</chem>
138	Estrepsilina	<chem>CC1=CC(=CC2=C1C3=C(O2)C=C(C4=C3COC4=O)O)O</chem>
183	Canariona	<chem>CC1=CC(=O)C2=C(O1)C=C3C(=C2O)C(=CC(=O)C3=O)O</chem>

195	Hematomona	<chem>CC(=O)C1=C(C=C2C(=C1O)C(=O)C3=C(C2=O)C=C(C=C3O)O)O</chem>
199	Parietina	<chem>CC1=CC2=C(C(=C1)O)C(=O)C3=C(C2=O)C=C(C=C3O)OC</chem>
064	Ácido diplosquistésico	<chem>CC1=CC(=CC(=C1C(=O)O)O)OC(=O)C2=C(C(=C(C=C2C)O)O)O</chem>
131	Ácido isousnico	<chem>CC1=C(C(=C(C2=C1OC3=CC(=C(C(=O)C32C)C(=O)C)O)O)C(=O)C)O</chem>
132	Ácido panárico	<chem>CC1=CC(=C2C3=C(C=C(C(=C3C)C(=O)O)O)OC2=C1C(=O)O)O</chem>
188	Ácido emódico	<chem>C1=C(C=C(C2=C1C(=O)C3=C(C2=O)C(=CC(=C3)O)O)O)C(=O)O</chem>
200	Ácido parietínico	<chem>COC1=CC2=C(C(=C1)O)C(=O)C3=C(C2=O)C=C(C=C3O)C(=O)O</chem>
	1,6-Dihidroxí-3,8-	
225	dimetilxantona	<chem>CC1=CC(=C2C(=C1)OC3=C(C2=O)C(=CC(=C3)O)C)O</chem>
192	Falacinal	<chem>COC1=CC2=C(C(=C1)O)C(=O)C3=C(C2=O)C=C(C=C3O)C=O</chem>
123	Ácido salazínico	<chem>CC1=CC(=C(C2=C1C(=O)OC3=C(O2)C4=C(C(=C3CO)O)C(=O)OC4O)C=O)O</chem>
125	Ácido stíctico	<chem>CC1=CC(=C(C2=C1C(=O)OC3=C(O2)C4=C(C(=C3C)O)C(=O)OC4O)C=O)OC</chem>
187	Citreorseína	<chem>C1=C(C=C(C2=C1C(=O)C3=C(C2=O)C(=CC(=C3)O)O)O)CO</chem>
196	Hemoventosina	<chem>C[C@H]1CC2=C(C(=C3C(=O)C=C(C(=O)C3=C2O)OC)O)C(=O)O1</chem>
208	Isocaurano	<chem>CC1=CC23CCC4C(CCCC4(C2CCC1C3)C)(C)C</chem>
184	Canariona dimetiléter	<chem>CC1=CC(=O)C2=C(O1)C=C3C(=C2OC)C(=CC(=O)C3=O)OC</chem>
Control	Donepezilo	<chem>COC1=C(C=C2C(=C1)CC(C2=O)CC3CCN(CC3)CC4=CC=CC=C4)OC</chem>

ANEXO F. Análisis de dinámica molecular de 0 a 100ns

Figura F.1: RMSD de la cadena A durante los 50 a 100ns.

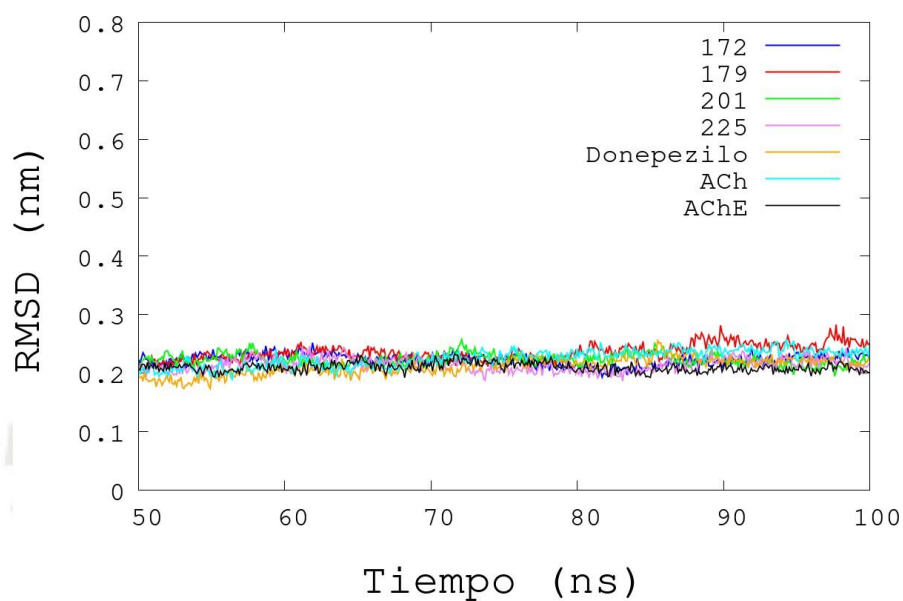


Figura F.2: RMSD de la cadena B durante los 50 a 100ns.

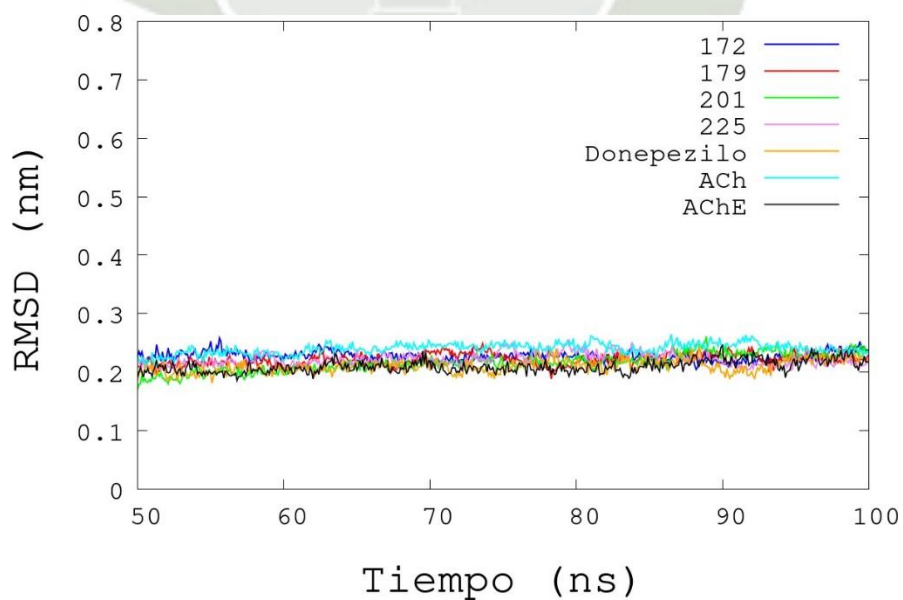


Figura F.3: RMSD de la proteína durante los 100ns.

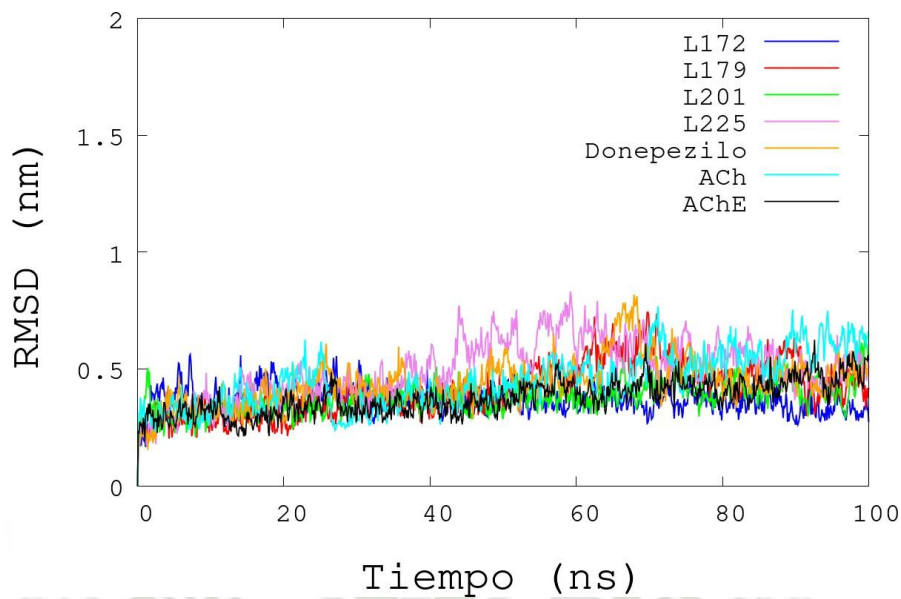


Figura F.4: RG de la proteína durante los 100ns.

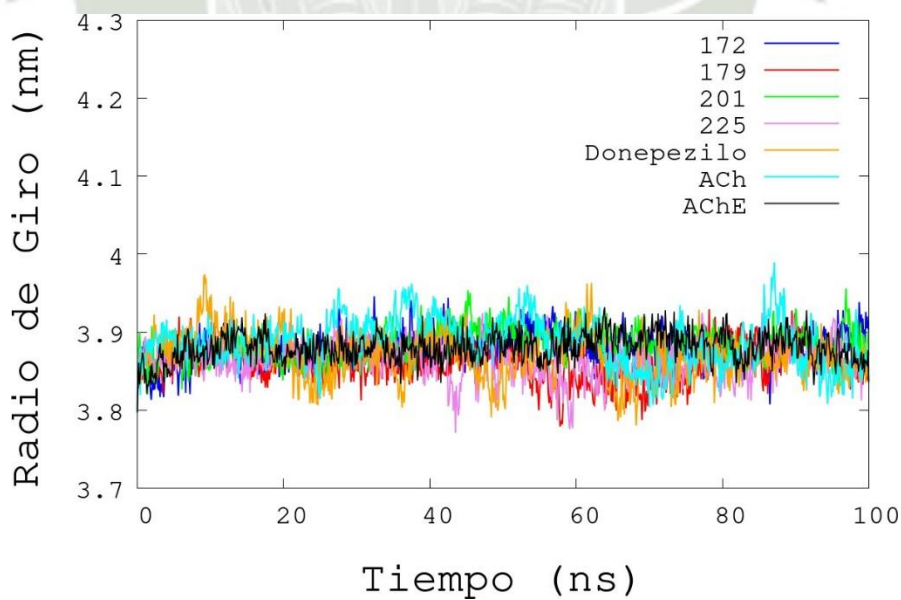
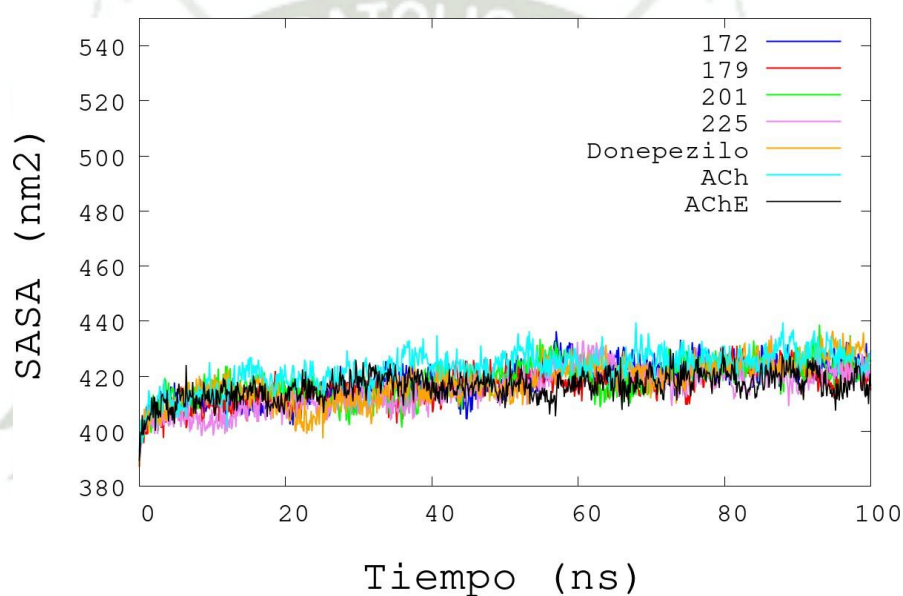


Figura F.5: SASA de la proteína durante los 100ns.



GLOSARIO

1. LDB: Lichen DataBase.
2. APP: Proteína precursora amiloide.
3. EA: Enfermedad de Alzheimer.
4. SAD: Enfermedad de Alzheimer esporádica.
5. FAD: Enfermedad de Alzheimer familiar.
6. OMS: Organización Mundial de la Salud.
7. PSEN1: Presenilina 1.
8. PSEN2: Presenilina 2.
9. ApoE: Apolipoproteína E.
10. DCL: Deterioro Cognitivo Leve.
11. A β : Placas beta-amiloides.
12. NFT: Ovillos neurofibrilares.
13. ROS: Especies reactivas de oxígeno.
14. ACh: Acetilcolina.
15. CAT: Colina acetiltransferasa.
16. H-ATPasa: Bomba dependiente de energía.
17. VACHT: Transportador de acetilcolina vesicular.
18. SNARE: Proteínas de fijación soluble de NSF.
19. AChE: Acetilcolinesterasa.
20. hAChE: Acetilcolinesterasa humana.
21. BChE: Butirilcolinesterasa.
22. RMN: Resonancia magnética nuclear.
23. FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.
24. EMA: Agencia Europea de Medicamentos.
25. PET: Tomografía por emisión de positrones.
26. PET-A β : Tomografía por emisión de positrones con beta-amiloides.
27. G1: AChE monomérica.
28. G2: AChE dimérica.
29. G4: AChE tetramérica.
30. A: Formas asimétricas de AChE.
31. G: Formas globulares de AChE.
32. GPI: Glicosilfosfatidilinositol.

33. SNC: Sistema Nervioso Central.
34. SNP: Sistema Nervioso Periférico.
35. PRiMA: Anclaje membranal rico en proteínas.
36. ES: Sitio esteárico o sitio catalítico.
37. PAS: Sitio aniónico periférico.
38. CAS: Sitio aniónico catalítico.
39. OAS: Bolsillo de axianión.
40. APS: Sitio de bolsillo de acilo.
41. Ser-S: Serina.
42. His-H: Histidina.
43. Glu-G: Glutamato.
44. Phe-F: Fenilalanina.
45. Asp-D: Aspartato.
46. Ala-A: Alanina.
47. Trp-W: Triptófano.
48. Tyr-Y: Tirosina.
49. DM: Dinámica molecular.
50. PDB: Protein Data Bank.
51. ADMET: Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad.
52. ns: Nanosegundo.
53. RMSD: Desviación Cuadrática Media de la Raíz.
54. RMSF: Fluctuación Cuadrática Media de la Raíz.
55. SASA: Área Superficial Accesible al Solvente.
56. Rg: Radio de giro.