

**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN MOLECULAR ENTRE ALCALOIDES DE
Caliphurria subedentata Y LAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASA Y
BUTIRILCOLINESTERASA POR ESTUDIOS DE DOCKING MOLECULAR *IN*
*SILICO***



Javier Fernando Rosero Madroñero

Universidad del Cauca
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación
Departamento de Biología
Popayán
2019

**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN MOLECULAR ENTRE ALCALOIDES DE
Caliphruria subdentata Y LAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASA Y
BUTIRILCOLINESTERASA POR ESTUDIOS DE DOCKING MOLECULAR *IN*
*SILICO***

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

Javier Fernando Rosero Madroñero

Director: Willian Orlando Castillo Ordoñez Ph,D

Universidad del Cauca
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación
Departamento de Biología
Popayán
2019

Nota de aceptación

Director: _____
Ph,D. Willian Orlando Castillo

Jurado: _____
Dra. Noelia Cajas Salazar

Jurado: _____
Dr. Víctor Campo Daza

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 06 de agosto de 2019

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre Edna Lucía Madroñero por estar dispuesta a escuchar mis problemas y ayudarme desde la distancia, ella es la razón por la cual soy un hombre de bien y dedicado a la academia. Gracias a mi padre Carlos Javier Rosero por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida.

Gracias a mi hermano Alleck Daniel Rosero Madroñero por acompañarme y brindarme ese calor de hogar que toda persona necesita, él siempre está conmigo dispuesto a sacarme una sonrisa y auxiliar en todo lo que él pueda, gracias por ser mi mejor amigo y ayudarme a quitar el estrés de una jornada difícil.

El termino gratitud, no siempre es asociado o familiarizado con los maestros, pero la realidad es que estas personas son sumamente importantes en nuestro desarrollo como personas, y especialmente en mi caso mi maestro fue crucial para la realización de esta tesis. Quiero agradecerle al profesor Willian Orlando Castillo Ordoñez por cada detalle y momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera, agradecerle por la claridad y exactitud con la que enseñó cada clase, discurso y lección.

Agradecimientos a la VRI por el apoyo enmarcado en el proyecto financiado con ID 4677, de la misma forma quiero agradecer al laboratorio de Bioinformática del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina de Universidad de Sao Paulo sede-Ribeirao Preto, Brasil en cabeza de la Dra Silvana Giuliati.

Gracias a mi pareja Ginna Mejía por entenderme en todo, gracias a ella porque en todo momento fue un apoyo incondicional en mi vida, y me guió en muchos momentos difíciles. Expreso mi total gratitud por la comprensión y paciencia que me tuvo y por el amor que siempre me brinda.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

AD: Autodock

ADT: Autodock Tools

APP: Proteína Precursora del Amiloide

AV: Autodock Vina

A β : Péptido Beta-Amiloide

BChE: Butirilcolinesterasa

EA: Enfermedad de Alzheimer

NGF: factor de crecimiento neurotrófico

NMDA: antagonista del receptor de *N*-metil-D-aspartato

PMV: Python Molecular Viewer

rhAChE: Acetilcolinesterasa Recombinante Humana

rhBChE: Butirilcolinesterasa Recombinante Humana

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	6
1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	8
2. JUSTIFICACIÓN	11
3. OBJETIVOS	14
3.1. GENERAL	14
3.2. ESPECÍFICOS	14
4. MÁRCO TEÓRICO	15
4.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	15
4.1.1. Epidemiología y factores de riesgo.	16
4.1.2. Tipos de Alzheimer.	17
4.1.3 Hipótesis etiológicas del Alzheimer.	18
4.1.4 Hipótesis colinérgica.	21
4.1.5. Acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BChE).	23
4.2. INHIBIDORES COLINÉRGICOS DE ORIGEN VEGETAL	24
4.2.1 Familia Amaryllidaceae.	25
4.2.2. <i>Caliphuria subedentata</i> (varita de San José).	26
4.3. IDENTIFICACIÓN DE FÁRMACOS ASISTIDO POR HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS. 26	
4.3.1. Docking molecular (Acoplamiento molecular).	
4.3.2 Requisitos para realizar docking molecular.	28
5. ANTECEDENTES	30
6. METODOLOGÍA.....	34
6.1.OBTENCIÓN DE LOS SUSTRATOS MACROMOLECULARES.....	34
6.2 OBTENCIÓN DE LOS LIGANDOS.....	34
6.3 PRE-TRATAMIENTO ESTRUCTURAL DE LIGANDOS Y SUSTRATOS.....	34
6.4. PREDICCIÓN DE LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS PROTEÍNAS.....	35
6.5. ANÁLISIS DE DOCKING MOLECULAR.....	36
6.6. PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD Y PERMEABILIDAD CEREBRAL-GASTROINTESTINAL (VIABILIDAD TERAPÉUTICA).....	36
6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFIA.....	59

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo progresivo crónico y un reto para la medicina moderna, al ser considerada un problema creciente de salud pública. Su etiología es compleja, explicada a través de diferentes hipótesis, siendo la hipótesis colinérgica una de las más aceptadas, al proponer, que el deterioro cognitivo dado por la disminución del neurotransmisor acetilcolina (ACh) al ser degradado por las enzimas acetilcolinesterasa (rhAChE) y butirilcolinesterasa (rhBChE). Evidencia farmacológica usando inhibidores colinérgicos han mostrado que la inhibición de las enzimas encargadas de degradar al neurotransmisor es una estrategia promisoría para modular el daño neurodegenerativo. Esos hallazgos, han intensificado la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos a partir de los vegetales. Entre las plantas, la familia Amaryllidaceae presenta gran cantidad de alcaloides que por su origen biosintético podrían tener una respuesta biológica positiva como inhibidores colinérgicos. La galantamina es un alcaloide encontrado en plantas de la familia Amaryllidaceae y aprobado como medicamento para el Alzheimer. Entre las Amaryllidaceae, *Caliphurria subedentata* es una planta endémica de Colombia con gran potencial terapéutico al contener metabolitos con características bioquímicas similares a la galantamina. En ese contexto, se realizó un acoplamiento molecular *in silico* que permitió analizar el tipo de conformación estructural entre dos moléculas y observar las interacciones entre las enzimas (rhAChE y rhBChE) y ligandos (tazetina, anhidrolicorina, galantamina). Los resultados mostraron que la tazetina y la anhidrolicorina tienen un mejor potencial de inhibición que la galantamina usada como control, siendo a la vez la anhidrolicorina el candidato farmacológico con mayor potencial, puesto que no mostró toxicidad y presenta permeación gastrointestinal y cerebral.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, Inhibidores colinérgicos, bioinformática, Amaryllidaceae.

1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo multifactorial, que causa demencia en las personas adultas. Después de los 65 años de edad el riesgo de adquirir esta patología es muy alto y la posibilidad se duplica cada cinco años. Estudios sugieren que en la población adulta de 85 años de edad el 50 % posee la enfermedad (Felsenstein, Candelario et al. 2014). Se estima que la enfermedad de Alzheimer se está volviendo una pandemia, según algunas proyecciones, cada siete segundos una persona en el mundo desarrolla Alzheimer (Ferri, Prince et al. 2005).

Lo anterior, implica una necesidad urgente para encontrar una cura o tratamiento; al mismo tiempo, que surge el interés cada vez mayor en descubrir el origen de la enfermedad que por su carácter multifactorial se desconocen muchos de los mecanismos biológicos implicados en su etiología, sin embargo existen diversas hipótesis sobre el origen de la enfermedad, que explican los posibles procesos biológicos que generan la EA.

La hipótesis colinérgica plantea que las enzimas Acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BChE) que hacen parte de la familia de glicoproteínas están implicadas en la enfermedad causando pérdida de la inervación colinérgica al degradar en exceso a la acetilcolina (ACh), un neurotransmisor clave para la sinapsis (Hampel, Mesulam et al. 2019). En ausencia de ACh, se genera una pérdida cognitiva y falla en la memoria en los primeros años de desarrollo de la enfermedad (2-3 años de presentar los primeros síntomas).

Además para la EA la lista de fármacos es insuficiente. algunos fármacos inhiben parcialmente a las enzimas responsables de la degradación del neurotransmisor (Samanta, Wilson et al. 2006).

El problema de los fármacos existentes es que todos son paliativos, alivian algunos síntomas de la enfermedad, pero no detienen su progresión (Herrera-Rivero, Hernández-Aguilar et al. 2010). Por esta razón, prima la necesidad de buscar nuevas sustancias que sean potenciales fármacos, los cuales logren y potencialicen la inhibición de enzimas como la AChE y BChE.

A nivel individual, la enfermedad de Alzheimer acorta significativamente la esperanza de vida y es una de las principales causas de discapacidad física y disminución de la calidad de vida entre las personas mayores (Aranda and Calabria 2019). Los estudios epidemiológicos han confirmado que la enfermedad de Alzheimer duplica el riesgo de muerte en la población adulta. El rápido aumento en el número de pacientes con Alzheimer resulta en consecuencias para la sociedad y economía global (Wimo, Jönsson et al. 2013).

La literatura internacional presenta varias estimaciones acerca de los costos del Alzheimer en los países desarrollados, aunque la evidencia es muy escasa para los países en desarrollo. En el Informe de la Asociación de Alzheimer del año 2018, se estima que 5.7 millones de estadounidenses tienen EA. Para mediados de siglo, se proyecta que la cantidad de personas que viven con demencia de Alzheimer en los Estados Unidos aumentará a 13.8 millones.

En la última década, la importancia del sistema medicinal tradicional a base de plantas ha sido altamente reconocido y ha surgido un interés para obtener de ciertas plantas una fuente de nuevos fármacos anticolinérgicos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Sofowora, Ogunbodede et al. 2013). A pesar de ser una fuente rica en compuestos biológicamente activos, muy pocas especies de plantas han sido investigadas a fondo con el fin de conocer sus propiedades medicinales.

La dificultad en el desarrollo de fármacos está fuertemente relacionada con la carencia de modelos biológicos disponibles para la enfermedad, ya que si bien, los modelos animales han desempeñado un papel importante en la definición de los mecanismos críticos relacionados con el Alzheimer, y han estado a la vanguardia de la evaluación de nuevos enfoques terapéuticos, hay problemas de extrapolación, una vez que ninguno de los modelos existentes consigue recrear el síndrome del Alzheimer (La Ferla and Green 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

La EA se ha convertido, en la época contemporánea, en un desafío complejo para la medicina. Con el desarrollo e innovación actual, la expectativa de vida ha aumentado considerablemente, lo que a su vez, ha llevado a una mayor incidencia de la enfermedad, siendo la edad un factor de riesgo (Kumar and Singh 2015). Actualmente, la enfermedad de Alzheimer es un creciente problema de salud pública cada vez más difícil de controlar, si bien en los últimos años se ha logrado avances significativos en los campos de la neuroimagen, la genética, el diagnóstico clínico y la estadificación de la enfermedad, los tratamientos actuales son exclusivamente paliativos, es decir retrasan la enfermedad sin conseguir cambiar su curso, el cual termina con la muerte del paciente (Apostolova 2016)(Katsamakas and Hadjipavlou-Litina 2019).

Desde épocas ancestrales el uso de las plantas ha sido una opción para aliviar y/o curar diversas patologías (Vásquez and Salinas 2015). En los últimos años este tipo de prácticas ha cobrado cada vez mayor importancia, las plantas no solo son abundantes en número, sino también en una diversidad de metabolitos secundarios con amplia actividad biológica (Cortes, Sierra et al. 2018). Uno de los fármacos de origen vegetal es la galantamina, un alcaloide aislado de los bulbos de diferentes especies de la familia Amaryllidaceae, es un medicamento de acción central, selectivo, reversible e inhibidor de la AChE, así como un modulador alostérico del receptor nicotínico neuronal para la acetilcolina (Marco-Contelles, do Carmo Carreiras et al. 2006), es uno de los pocos medicamentos aprobados para la enfermedad de Alzheimer, y al ser de origen vegetal ha promovido una intensa búsqueda de nuevas moléculas a partir de plantas (Rainer and Mucke 2019).

Dentro de la familia Amaryllidaceae se encuentra la especie *Caliphruria subedentata*, una planta bulbosa, endémica de Colombia con un gran potencial al contener diversos alcaloides, los cuales podrían funcionar como inhibidores de

AChE (Castillo, Aristizabal-Pachon et al. 2016) y posiblemente BChE (Carrasco Ruiz 2017). No obstante, se desconocen muchos de los efectos biológicos de sus metabolitos como inhibidores colinesterásicos, además es una planta en vía de extinción, y con su pérdida, se estaría perdiendo para siempre mucha información acerca de su potencial terapéutico (Miksatkova, Lankova et al. 2014, Masi, Gunawardana et al. 2019, Nair and van Staden 2019)

Actualmente, los inhibidores de las colinesterasas son la clase más prometedora de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Hoie 2019). Algunos alcaloides presentes en *C. subedentata* como la galantamina son inhibidores de Colinesterasas, el fármaco es selectivo y además de su potencial de inhibición, interactúa de forma alostérica con los receptores nicotínicos de acetilcolina para potenciar la acción de los agonistas en estos receptores (dos Santos, Gomes et al. 2018).

La ciencia farmacológica está tratando de establecer el vínculo entre productos químicos pequeños (fármacos) y las dianas macromoleculares relacionados con las enfermedades (proteínas). Se ha generado una gran cantidad de datos estructurales, gracias al enfoque basado en interacciones proteína-ligando que ha dominado el descubrimiento de fármacos en los últimos años (Liu, Xu et al. 2014). Existe una inestimable fuente de información para el perfil de dianas in silico. La predicción se basa en el principio de similitud química (medicamentos similares se unen a objetivos similares) y en principios biofísicos de las interacciones moleculares (Jenkins, Bender et al. 2006, Keiser, Roth et al. 2007).

Es por esto que es preciso analizar si existe interacción entre algunos alcaloides de *C. subedentata* con las enzimas rhAChE y rhBChE para conocer su especificidad de unión (Koellner, Kryger et al. 2000). Al identificar cuáles metabolitos de la planta tienen efectos inhibitorios en las proteínas, estos metabolitos se podrían tornar en moléculas promisorias para continuar siendo estudiados como posibles fármacos,

además, conociendo que alcaloides se unen a determinado sitio en la proteína, se puede optar por generar compuestos híbridos para lograr una inhibición total (Ibrar, Khan et al. 2018). Sin embargo se hace necesario iniciar con estudios básicos acerca de la interacción con las enzimas responsables de la degradación de ACh (Alpizar-Quesada and Morales-Alpizar 2003). Una vez que estos abordajes *in silico* consiguen abordajes promisorios, se procede a ensayos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*. Los análisis farmacológicos *in silico* tienen ventajas una vez que permiten evitar el uso de químicos y animales como modelos biológicos, además reducen costos en materia de reactivos, herramientas y esfuerzo de trabajo; al mismo tiempo, que tiene impacto social y económico, acelera la identificación de fármacos y el tiempo de obtención, aparte de eso no solo es aplicable a Alzheimer si no a una amplia gama de patologías asociadas (Yuriev and Ramsland 2013).

No obstante las técnicas *in silico* necesitan de diferentes software algunos de uso libre, otros tienen licencia, existe un grado de exclusividad para acceder a su uso, aun así, sigue representando una enorme ventaja en comparación con los estudios experimentales tradicionales (Glaab 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Evaluar las interacciones moleculares entre las enzimas AChE y BChE (sustratos) con los alcaloides anhidrolicorina, tazzetina (ligandos) presentes en *Caliphurria Subedentata* como potenciales candidatos a fármacos para la enfermedad de Alzheimer.

3.2. ESPECÍFICOS

- Optimizar biofísicamente las estructuras tridimensionales de AChE y BuChE utilizadas como sustratos
- Minimizar biofísicamente las estructuras tridimensionales de los alcaloides
- Describir las interacciones de acoplamiento molecular entre sustratos y ligandos
- Evaluar la viabilidad terapéutica de los alcaloides

4. MÁRCO TEÓRICO

4.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer es conocida a nivel mundial como un desorden progresivo neurodegenerativo multifactorial que genera demencia en la edad adulta, siendo la enfermedad cerebral más común para las personas de mayor edad (Robinson, Lee et al. 2017). Identificada en 1907 por el neuropsiquiatra alemán Alois Alzheimer quien analizó el primer caso, en una mujer de cincuenta años de edad, llamada Auguste Deter. El investigador hizo seguimiento de su paciente hasta que ella murió en 1906, momento en que el médico reportó el primer caso de la enfermedad que lleva su nombre. Se trataba de una mujer con deterioro cognitivo, alucinaciones, delirios y problemas de habla, y el estudio cerebral post-mortem reveló la existencia de atrofia y cambios en la estructura del cerebro (Fuentes 2003). Alois Alzheimer encontró depósitos o conglomerados en el exterior y alrededor de las células nerviosas (placas seniles), además notificó la presencia de bandas de fibra retorcidas dentro de las células nerviosas (ovillos neurofibrilares) (Dubois, Hampel et al. 2016).

Posteriormente los depósitos de las células nerviosas deterioradas y las bandas retorcidas dentro de las células nerviosas fueron identificadas en el cerebro de pacientes que experimentaban un descenso progresivo en sus funciones cognitivas similares a las del primer caso reportado; Sin embargo, no se encontraban presentes en los cerebros post-mortem de individuos mayores de edad que no tenían tal deterioro (Association 2017).

4.1.1. Epidemiología y factores de riesgo. En las últimas décadas, la población mundial ha sufrido importantes cambios en su estructura por edades, sobre todo en los países desarrollados, debido al progresivo envejecimiento de la población mundial y al aumento de la esperanza de vida media. Se estima que en el año 2020, en los países desarrollados, aproximadamente siete millones de personas se vean afectadas por esta enfermedad (Felsenstein, Candelario et al. 2014).

El informe Mundial sobre enfermedad de Alzheimer del año 2019 (Harris 2019) indica que en el mundo existen aproximadamente 900 millones de personas mayores de 60 años y se proyecta que entre el 2015 y el 2050 el número de adultos mayores aumentará a un ritmo diferente según el país de procedencia (Prince, Wimo et al. 2017). Actualmente según la organización mundial de la salud (OMS) en el mundo hay alrededor de 47,5 millones de personas que padecen demencia, y cada año se registran 7,7 millones de nuevos casos. La enfermedad de Alzheimer, que es la causa de demencia más común, acapara entre un 60% y un 70% de los casos (Alford, Patel et al. 2018).

Se ha comprobado que las mujeres tienden a tener mayor incidencia de la enfermedad a edades más avanzadas debido a la pérdida de estrógeno a causa de la menopausia (Sundermann, Biegon et al. 2017). Por otro lado, aunque la comunidad científica sabe que la enfermedad de Alzheimer implica una falla progresiva de las células cerebrales, todavía no se conoce por qué sucede esta enfermedad; no obstante, se han identificado ciertos factores de riesgo que aumentan las posibilidades de desarrollar Alzheimer (Richardson, German et al. 2014). Si bien el factor de riesgo más relevante es la edad, otros factores como la susceptibilidad genética, alcoholismo y factores ambientales como la exposición a ciertos metales como el cobre, cuyo mecanismo de acción neurotóxico se considera clásicamente por su fuerte afinidad con el beta-amiloide (A β) para ayudar a su

agregación y aumentar el estrés oxidativo representan un riesgo para adquirir la enfermedad (Arlt, Demiralay et al. 2013)(Hsu, 2018 #68).

La asociación entre la exposición crónica a plaguicidas y la prevalencia de la EA, no se ha estudiado tan bien como con otros factores de riesgo como la edad, no obstante es un factor a tener en cuenta, debido a que algunos estudios de diez años de seguimiento realizados en condados agrícolas a campesinos muestran una relación de riesgo para el desarrollo de AD mayor para la exposición a plaguicidas organofosforados que para organoclorados (Chin-Chan, 2015 #69).

4.1.2. Tipos de Alzheimer. Para clasificar el Alzheimer, y de acuerdo a las investigaciones actuales, se utilizan principalmente dos tipos, atendiendo a la edad en que se manifiesta esta patología. De este modo, se encuentra Alzheimer de aparición temprana o precoz, vinculado principalmente a la predisposición genética de los pacientes (Granillo Sanmartin 2017). Habitualmente, este tipo de Alzheimer acontece antes de los 65 años de edad, y aunque solo representa el 2% de los casos reportados, es necesario aclarar que se trata de la variante más rápida y peligrosa (Taragano, Castro et al. 2015). De hecho, a raíz del factor genético asociado a este tipo de patología neurodegenerativa, se puede afirmar que existe un tipo de Alzheimer familiar y otro esporádico, por lo que se relaciona con alteraciones genéticas en las personas con antecedentes familiares de Alzheimer presenil. Los genes afectados suelen ser tres principalmente: *PSEN1* y *PSEN2* en los cromosomas 14 y 1 respectivamente, y *APP* en el cromosoma 21 (Tellechea, Pujol et al. 2015).

Por otra parte, también existe el Alzheimer de aparición tardía o senil, el cual acontece posterior a los 65 años de edad y constituye el 95% según nuevos reportes (Hernández Fontán 2019). De lenta evolución y con síntomas menos agresivos que el presenil, este tipo de Alzheimer también puede guardar un carácter hereditario,

influenciados por una genética compleja, con múltiples factores de susceptibilidad, siendo el alelo *APOE4* el principal y más reconocido factor de riesgo (Hogan 2013).

4.1.3 Hipótesis etiológicas del Alzheimer. Uno de los modelos más aceptados de la patología molecular de la enfermedad de Alzheimer es la hipótesis de la cascada amiloidea, propuesta por Hardy y Higgins (1992). La formulación original de la hipótesis defiende que la presencia de A β en las placas seniles sería la causante de la muerte celular y la demencia (Figura 1) (Morelli 2016).

Según la hipótesis lo que desencadena la cascada amiloide son fallos genéticos, que generan una anomalía al codificar la proteína precursora del amiloide, llamada precursor proteico amiloide (APP). La APP es la encargada de sintetizar el péptido beta-amiloide, cuya función normal es la activación de quinasas, la protección contra estrés oxidativo, regulación del transporte de colesterol. El péptido A β se forma por la división secuencial del precursor proteico amiloide (APP), siendo este una glicoproteína transmembrana con una función indeterminada. El APP puede ser procesado a partir de α -secretasa (no amiloidogénica) y β -secretasa (amiloidogénica), con el objetivo de generar isoformas de 36 a 46 aminoácidos. Las isoformas más comunes son A β ₄₀ (proceso no amiloidogénico) y A β ₄₂ (proceso amiloidogénico) en donde la isoforma más corta se genera debido a la escisión que ocurre en el retículo endoplasmático mientras que la isoforma larga se escinde en el aparato de Golgi. La forma A β ₄₀ es la más común, sin embargo la forma A β ₄₂ es más fibrogénico y por lo tanto está asociada con el desarrollo de EA (Folch, Ettcheto et al. 2015).

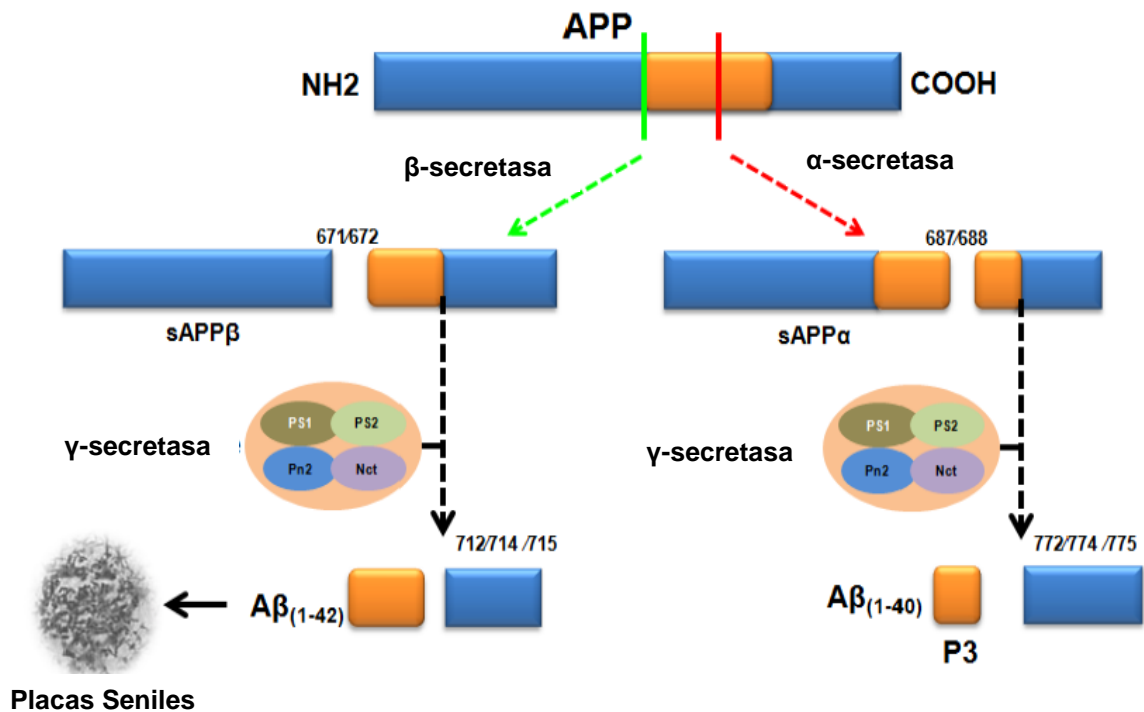


Figura 1. Proceso no amiloidogénico y amiloidogénico de la proteína precursora del amiloide (APP) (Modificado de WO. Castillo *et al.*, 2018).

Otra hipótesis es la de la proteína tau, fue Gerard D Schellenberg, en 1998 quien identificó una mutación en el gen de la proteína Tau, localizado en el cromosoma 17, al estudiar pacientes con demencia de tipo frontotemporal. La proteína Tau se encuentra en los ovillos de degeneración neurofibrilar, los cuales constituyen una de las características histológicas más importantes de la enfermedad (Dobarro 2015). Se encuentran en el citoplasma neuronal y su número está directamente relacionado con la severidad de la demencia (Maccioni, Farías *et al.* 2010). Están constituidos por cúmulos de filamentos helicoidales emparejados, que presentan características diferentes de los neurofilamentos y microtúbulos normales (Figura 2).

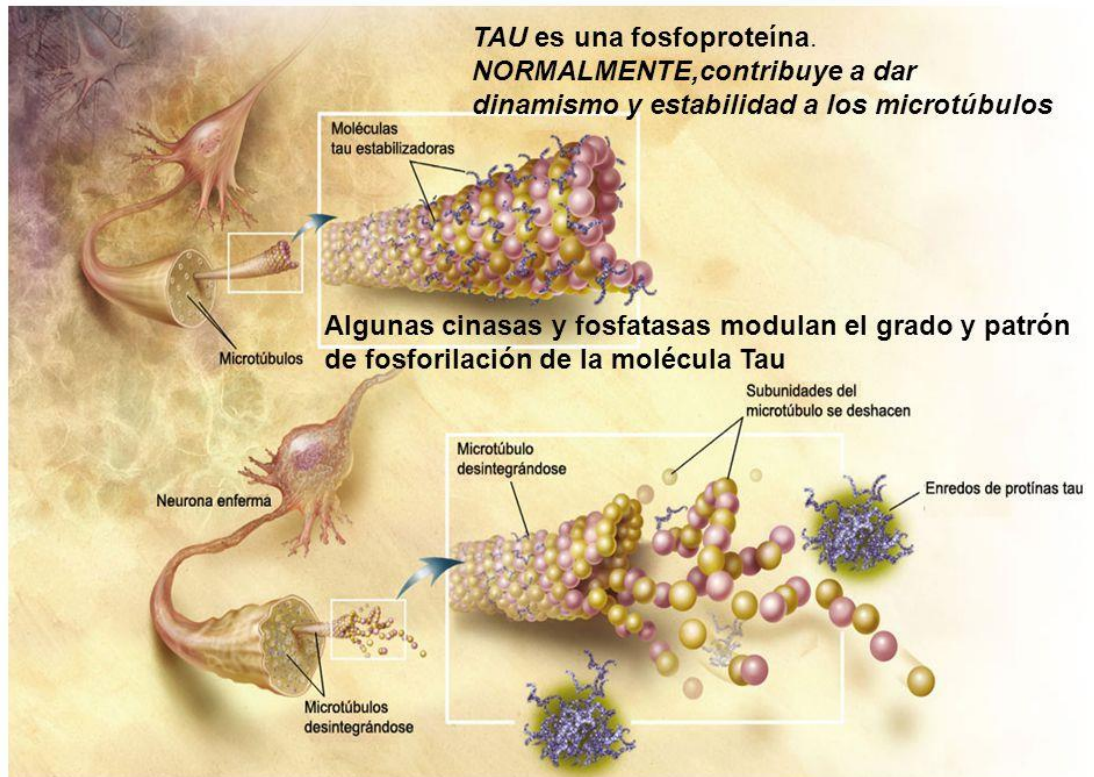


Figura 2. Ilustración de la hipótesis Tau, la afectación de los ovillos neurofibrilares se ve en la pérdida de la estructura de los microtúbulos. Modificado de: (Health, #71)

Los ovillos de degeneración neurofibrilar suelen ser más abundantes en las áreas donde es más intensa la destrucción neuronal, es decir, el hipocampo y las zonas adyacentes del lóbulo temporal, que son estructuras que tienen una gran importancia en la función de la memoria (Maccioni, Arzola et al. 2003). El gen que codifica para la proteína Tau se encuentra en el cromosoma 17 y produce un pre-RNA que se procesa dando lugar hasta seis isoformas diferentes. Estas isoformas se diferencian entre sí en la presencia o la ausencia de los exones 2, 3 y 10; las combinaciones de estos exones son las que originan las 6 isoformas (Maccioni 2008).

Los microtúbulos son unos de los 3 constituyentes mayores del citoesqueleto neuronal, los otros 2 constituyentes son los neurofilamentos y microfilamentos. Todos forman parte de la infraestructura neuronal y participan en funciones como el

transporte axonal de nutrientes y otras sustancias, así como el mantenimiento de la integridad estructural de la neurona. Tau tiene como función facilitar la polimerización de la tubulina en la célula, de manera que se formen los microtúbulos (Morales, Arata et al. 2015). En los ovillos neurofibrilares la agregación de Tau se produce porque esta sufre una fosforilación irreversible, que impide su función normal a la vez que facilita su autoagregación en fibrillas. El efecto de estos eventos es la alteración de la estructura de los microtúbulos, que junto con el empaquetamiento de la proteína Tau provocan afectaciones en el mecanismo de transporte neuronal. Como consecuencia de esto, la neurona no puede transmitir señales eléctricas ni transportar nutrientes (Morales, Arata et al. 2015).

4.1.4 Hipótesis colinérgica. El sistema colinérgico es, junto al sistema gabaminérgico, el que mayor presencia tiene en el sistema nervioso central (SNC). Es el encargado de la síntesis del neurotransmisor ACh (el primero que se descubrió), además de encargarse de la actividad sináptica en el cerebro y regular aspectos tan relevantes como la plasticidad neuronal (Figura 3), juega un papel igualmente importante en múltiples funciones del sistema nervioso autónomo, como la contracción de la musculatura lisa y rugosa (Douchamps and Mathis 2017). El sistema colinérgico se encarga de modular la función cognitiva e incluye neuronas localizadas en el cerebro basal anterior con sus axones largos que se proyectan a la corteza cerebral e hipocampo (Morales, Pérez et al. 2015).

La desregulación colinérgica nace como resultado de alteraciones en la expresión y en la actividad de la colina acetiltransferasa y las Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa (AChE y BChE), enzimas específicas relacionadas con la función del sistema nervioso central (Lawrence and Sahakian 1995). La corteza cerebral posee una extensa red de axones colinérgicos que se originan en las neuronas colinérgicas ubicadas en los núcleos celulares del núcleo basal de Meynert (NBM), ambos presentan inmunorreactividad para la enzima AChE (Orta-Salazar, Cuellar-Lemus et al. 2014). Para su manejo farmacológico específico solo

se dispone de tratamientos sintomáticos con inhibidores colinesterásicos indicados para la enfermedad de Alzheimer en las fases leve a moderadamente grave debido a que aumentan la cantidad de Acetilcolina (ACh) (Pochini, Scalise et al. 2012). El objetivo del tratamiento es intentar disminuir el déficit de acetilcolina en estadios iniciales y moderados en la que existe aún una proporción considerable de neuronas colinérgicas (Jentoft and Hernández 2014).

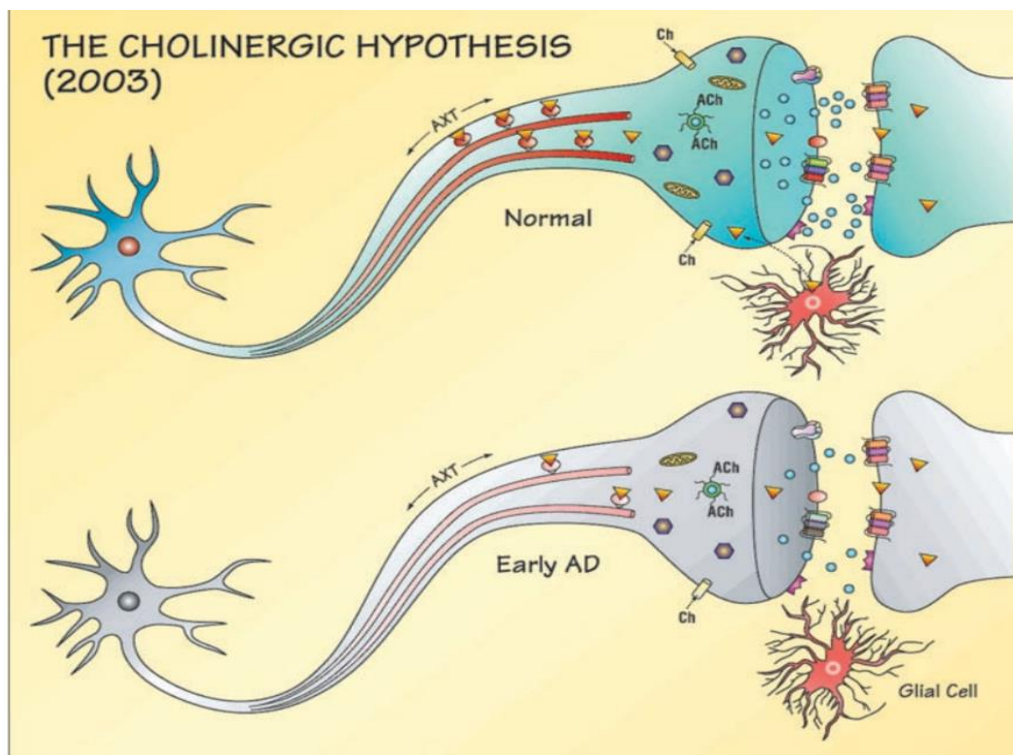


Figura 3. Visión esquemática de la hipótesis colinérgica (Terry, 2003).

Uno de los factores más importantes relacionados con la desregulación colinérgica y la ACh es el factor de crecimiento neurotrófico (*NGF*, por sus siglas en inglés). Es una proteína presente en el sistema nervioso y otros sistemas del cuerpo humano, necesaria para la supervivencia y desarrollo de las neuronas en el período embrionario, es el encargado no sólo de equilibrar la tasa entre crecimiento y muerte neuronal, también es uno de los mayores protectores de las neuronas colinérgicas.

Este es un punto importante, porque es la primera diferencia con el envejecimiento normal. Durante la etapa senil, el déficit en el sistema colinérgico se debe a una falta de función del propio sistema, en personas con deterioro cognitivo leve o estadios previos de alzheimer, lo que sucede es una disminución en la actividad del NGF (Fabiani, Murray et al. 2018). Las neuronas colinérgicas tienden a requerir un mayor aporte energético para funcionar. Para formar ACh, es necesario que esté disponible la enzima Acetil-CoA, la cual se obtiene a partir de la degradación de la glucosa durante la glucólisis. Uno de los efectos de la acumulación extracelular de proteína β -amiloide se produce sobre la fosfofrutokinasa, una de las principales enzimas en la glucólisis cerebral. Así, cuando hay una presencia significativa de placas amiloides, la neurona no es capaz de producir energía y muere (D'Souza and Waldvogel 2016).

4.1.5. Acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BChE). La AChE es la enzima que termina el efecto neurotransmisor de ACh y junto con la BChE pertenece al grupo de enzimas denominadas colinesterasas (ChEs). La AChE y la BChE son familias de glicoproteínas que pueden estar unidas a la membrana o ser liberadas al espacio extracelular y su heterogeneidad está dada por varias formas moleculares de cada enzima que pueden distinguirse por el número de subunidades catalíticas (Yu, Wu et al. 2018).

La AChE es una hidrolasa de serina, su proceso catalítico implica acilación y desacilación en un residuo de serina de la triada catalítica, que son tres residuos de aminoácidos que funcionan en conjunto en el centro del sitio activo de la enzima, la estructura del sitio activo de la AChE es complementaria a la del sustrato, por lo tanto, presenta dos subsitios: un subsitio aniónico y subsitio del éster. Conjuntamente a los dos subsitios del sitio catalítico, la AChE presenta uno o más lugares adicionales de unión para acetilcolina u otros compuestos cuaternarios, los cuales son conocidos como sitios aniónicos periféricos que se localizan en la entrada de la cavidad del centro activo (Luna Origgi 2015). Se ha propuesto que el

sitio activo participa en asociaciones con proteínas heterólogas que ocurren durante la neurodegeneración. Es por esto que el empleo de inhibidores de AChE ha sido muy útil para el estudio de la estructura del centro activo de la enzima. Existen diferentes compuestos que pueden unirse a cualquiera de los subsitios del centro activo de la AChE, esto facilita los estudios que involucran la hipótesis colinérgica y la necesidad de inhibir dicha molécula (Kucukoglu, Gul et al. 2019).

La función biológica de la AChE no se limita a la hidrólisis de la acetilcolina (ACh), acción que se denomina clásica o canónica (Peters, Trovaslet et al. 2012). En el sistema nervioso, la AChE muestra una amplia distribución. Cabe resaltar que cambios en los niveles de AChE y sus propiedades pueden significar varias enfermedades neurodegenerativas como los son las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y miastenia gravis las cuales son las tres neuropatologías más estudiadas en relación con alteraciones en la AChE (Agunloye and Oboh 2017)(ÖZDEMİR, ÖZÇELİK et al. 2019).

La pseudocolinesterasa, también llamada Butirilcolinesterasa (BChE) (por su capacidad de hidrolizar la butirilcolina más rápido que otros ésteres), colinesterasa sérica o falsa colinesterasa, es una enzima producida por el hígado que circula en el plasma sanguíneo (Castro, Romero et al. 2016). Su principal función es hidrolizar ésteres exógenos, como los presentes en algunos relajantes neuromusculares, como el mivacurio y la succinilcolina esta enzima no tiene una función fisiológica conocida, pero es de importancia toxicológica y farmacológica porque se encarga de hidrolizar ésteres exógenos de ácidos carboxílicos o de ácido fosfórico presentes en la succinilcolina, el ácido acetilsalicílico, el mivacurio, los anestésicos locales de tipo éster, la amitriptilina, la cocaína, la heroína, varios fármacos anticonvulsivantes y en menor proporción ACh (Manzano-Rincón, Castillo-Cabellos et al. 2018).

4.2. INHIBIDORES COLINÉRGICOS DE ORIGEN VEGETAL

Dado que los inhibidores de la AChE son una estrategia terapéutica importante en la enfermedad de Alzheimer, se están realizando esfuerzos en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad anti-AChE. El hecho de que los compuestos naturales de las plantas se consideren una fuente potencial de nuevos inhibidores ha llevado al descubrimiento de un número importante de metabolitos secundarios y extractos de plantas con capacidad para inhibir la enzima, lo que según la hipótesis colinérgica, aumenta los niveles del neurotransmisor acetilcolina en el cerebro, mejorando así las funciones colinérgicas en pacientes con enfermedad de Alzheimer y aliviando los síntomas de este trastorno neurológico (Vásquez and Salinas 2015).

4.2.1 Familia Amaryllidaceae. Las plantas elaboran productos denominados fitoconstituyentes, los cuales se pueden dividir en metabolitos primarios y secundarios. Los primeros son abundantes en la naturaleza, se encuentran presentes en grandes cantidades y son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta, son de fácil extracción y los costos de producción son relativamente bajos, además, estos conducen a la síntesis de los metabolitos secundarios, los cuales son de distribución limitada debido a que se generan por procesos metabólicos propios de cada planta (Dasari, Banuls et al. 2014). Estos compuestos son de mayor interés para la ciencia por sus diversas propiedades biológicas (Kilgore, Augustin et al. 2016).

Las plantas de la familia Amaryllidaceae, son un grupo de especies monocotiledóneas, constituyen una familia botánica ampliamente distribuida en la zona neotropical, con poblaciones representativas en los géneros *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyrantes*, *Hippeastrum*, *Crinum*, *Eucharis* y *Caliphruria* (Lázaro, et al., 2016). Se presenta distribución restringida de *Eucharis* y endemismo de *Caliphruria*, considerándose estos dos últimos géneros en vía de extinción (Cabezas, Argoti et al. 2007). Corresponden a las 20 familias más significativas de plantas que contienen alcaloides, que presentan un amplio grado de actividades biológicas relevantes y algunas de ellas han sido aptas para terapia clínica, de las

cuales la actividad AChEI es la más relevante (Pellegrino, Meyer et al. 2018). Este hecho ha ocasionado el tamizado de los alcaloides derivados de las plantas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae como posible AChEI y los resultados han verificado que la galantamina y la licorina son superiores como AChEI a comparación de otros alcaloides (Nair and van Staden 2012). En cuanto a la familia Amaryllidaceae, la investigación fitoquímica realizada en las últimas décadas ha mostrado que sus alcaloides tienen la capacidad para inhibir la AChE y posiblemente la BChE (Castillo-Ordóñez, Tamarozzi et al. 2017, Cimmino, Masi et al. 2017).

4.2.2. *Caliphruria subdentata* (varita de San José). *Caliphruria* es un género de plantas bulbosas perteneciente a la familia Amaryllidaceae. Este género está integrado por cuatro especies *C. korsakofii*, *C. hartwegiana*, *C. subdentata* y *C. tenera*. Distribuidas en regiones tropicales de Sur América, las tres últimas son endémicas de Colombia. Este género es muy escaso en la naturaleza, con distribución geográfica restringida (Torras Claveria, Tallini et al. 2017). Por métodos clásicos de análisis se sabe que *C. subdentata* presenta 18 alcaloides, de los cuales destacan galantamina, licorina, hemantamina, maritidina, homolicorina y hamayna (dos Santos, Gomes et al. 2018). El extracto polar muestra una moderada actividad citotóxica, lo cual se manifiesta mediante un bloqueo premitótico, originando la disminución del índice mitótico, dependiendo de la concentración del extracto, lo cual permite vislumbrar un posible uso de estas plantas no sólo como inhibidores colinérgicos sino con otras aplicaciones como el cáncer (Acosta, Álvarez et al. 1996).

4.3. IDENTIFICACIÓN DE FÁRMACOS ASISTIDO POR HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.

El desarrollo de fármacos es un proceso complicado el cual inicia con la identificación de compuestos que se unen a un blanco terapéutico o que muestran actividad biológica en un ensayo de tamizaje. La mayoría de los medicamentos que están en uso clínico son resultado de un proceso de investigación complejo. Por lo mismo, es necesaria la unión de esfuerzos de diferentes disciplinas científicas para descubrir y desarrollar medicamentos con efectos clínicos benéficos y efectos secundarios mínimos (Grande, Rizzuti et al. 2018).

Aunque el descubrimiento y desarrollo de medicamentos se ha realizado durante muchos años, usando únicamente métodos experimentales, se espera que el proceso se acelere gracias al uso de métodos computacionales (también llamados *in silico*) que permiten codificar con precisión modelos teóricos y son capaces de procesar grandes cantidades de información (Saldívar-González, Prieto-Martínez et al. 2017). En muchos proyectos, la aplicación de modelos generados *in silico* contribuyen a entender los mecanismos de acción de los principios activos de los medicamentos o a mejorar sus propiedades. Un ejemplo es la optimización de los fármacos de origen natural. En la actualidad se hacen esfuerzos para mejorar las propiedades de estos medicamentos al reducir efectos secundarios eliminando elementos tóxicos o buscar actividades biológicas potenciales de estos compuestos aislados evaluando potencial de inhibición (Medina-Franco 2013).

4.3.1. Docking molecular (Acoplamiento molecular). La mayoría de procesos biológicos dependen de las interacciones de los receptores moleculares y sus ligandos por lo que el reconocimiento molecular juega un papel clave en los eventos biomoleculares, ya sean interacciones enzima-substrato, proteína-inhibidor o ácido nucleico-inhibidor (Valderrama 2009).

El acoplamiento (docking) molecular es un método computacional que busca formas de unión entre ligandos potenciales (un posible fármaco) y un blanco macromolecular (normalmente células, proteínas o procesos bioquímicos), cuya

estructura es conocida de manera experimental (Meng, Shoichet et al. 1992). Particularmente, el acoplamiento molecular se aplica para localizar la orientación y posición de un ligando en el sitio activo de su blanco macromolecular (Allen, Fochtman et al. 2017). El objetivo de la técnica consiste en encontrar la unión más probable entre el ligando y el receptor; es decir, la que menos energía requiera (a menor energía, más fuerte la unión) así como el sitio idóneo de unión molecular (Morris, Goodsell et al. 1998).

Es evidente que al conocer esta respuesta, el investigador está en posición de llevarla a la experimentación *in vivo* y así corroborar sus resultados previamente obtenidos *in silico*. Esta forma de trabajo experimental ha resultado de gran valor para entender de qué manera los fármacos que se usan diariamente alcanzan su objetivo dentro del cuerpo humano, y también facilita el desarrollo de nuevos fármacos con características bien definidas o con objetivos seleccionados previamente (Irwin 2002).

Es posible hacer acoplamiento molecular automatizado entre dos macromoléculas, como dos proteínas. Considerando la flexibilidad de las moléculas, el número de posibles conformaciones puede ser muy elevado. De igual manera, si la cavidad del sitio receptor es grande y/o flexible, es más complicado encontrar la posición y orientación que tendrá la molécula pequeña dentro del receptor (Reyes, Tirado et al. 2016). Es así como el uso de computadoras ayuda a acelerar el proceso de búsqueda y sugiere modelos de unión (Kumar and Singh 2015).

4.3.2 Requisitos para realizar docking molecular. Antes de realizar cualquier proceso de acoplamiento, las estructuras a seleccionar (dianas macromoleculares) deben cumplir con dos requisitos señalados a continuación:

El primer requisito es que las estructuras deben tener una resolución superior a 2 Armstrong (Å) para que el acoplamiento sea eficiente. El valor de resolución es importante porque de ese valor dependen las ubicaciones de las cadenas laterales de una estructura. Una mejor resolución significa una ubicación más precisa de la cadena lateral (Cummings, Maxwell et al. 2007). Las cadenas laterales desempeñan un papel importante en la unión del ligante, principalmente porque son las partes flexibles de la estructura de una macromolécula y su movimiento indica la unión de un ligante, una baja resolución afectaría la posición de las cadenas laterales de una estructura, lo que a su vez puede causar un impedimento estérico, incluso una ubicación incorrecta, y esto puede llevar a formar una cavidad o bolsa de unión falsa, por lo tanto es necesario que la resolución de una estructura para realizar docking molecular oscile entre 2 - 3 Armstrongs y se tenga certeza en la posición de las cadenas laterales (Gray, Moughon et al. 2003).

El segundo requisito es que el método experimental de cristalografía aplicado para determinar la estructura tridimensional sea de difracción de rayos X, para esto se debe aclarar que existen dos métodos para determinar la estructura terciaria tridimensional de proteínas, la difracción de rayos X y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de proteínas (RMN) (Usón and Sheldrick 1999). La difracción de rayos X es el más eficiente para estudiar las interacciones proteína-ligando, por encima de la RMN, esto es debido a que el poder de resolución de la RMN es menor que el poder de resolución de la difracción de rayos X, esto influye directamente en el requisito anterior, además mediante la difracción de rayos X es posible obtener toda una estructura 3D mediante el análisis sistemático de un buen material cristalizado, mientras que en la RMN no se puede obtener (Drenth 2007).

5. ANTECEDENTES

En 1960, John R. Vane y Sergio Ferreira, estudiaron el factor de potenciación de bradiquinina (BPF) del veneno de la víbora brasileña *Bothrops jararacá*. Establecido que BPF potenciaba las acciones de la bradiquinina, probablemente al inhibir la enzima que la inactivaba, BPF se probó con la enzima transformadora de angiotensina (ECA) y se encontró que es un potente inhibidor de la misma. Esa fue la base que terminó en el desarrollo del captopril, inhibidor de la enzima transformadora de angiotensina (ECA), el cual se obtuvo siguiendo el diseño de análogo activo (técnica bioinformática la cual consiste en la comparación de una serie de moléculas que manifiesten una actividad selectiva frente a un determinado receptor, con objeto de poner de manifiesto las características estructurales que puedan tener en común, y con esta información se construye una nueva molécula que presumiblemente será más activa y más selectiva) . Fue aprobado en 1981 como fármaco antihipertensivo.

Las ideas sobre el uso de la cristalografía de rayos X en el descubrimiento de fármacos surgieron hace más de 30 años (precursora de DIFAC) cuando se determinaron las primeras estructuras tridimensionales de las proteínas. Estas ideas permitieron avances que finalizaron en la síntesis de ligandos de la hemoglobina para disminuir la enfermedad de células falciformes (anemia causada por drepanocitos) (Beddell, Goodford et al. 1976), la modificación química de las insulinas para aumentar la vida media en circulación y el diseño de inhibidores de serina proteasas para controlar la coagulación de la sangre (Blundell, Dodson et al. 1972).

Brunger, Kuriyan et al. (1987) iniciaron en el campo de la química computacional y bioinformática avanzada, simulando la interacción entre un Inhibidor generado en laboratorio y tripsina pancreática en bovinos. Este compuesto es un polipéptido de cadena simple derivado de tejidos de bovino que está constituido por 58 residuos

de aminoácidos, se trata de un inhibidor de enzimas proteolíticas. Observaron que este inhibidor bloqueaba completamente a la tripsina pancreática en las simulaciones. Este trabajo de investigación se logró gracias a la disponibilidad de las estructuras tridimensionales de las proteínas implicadas (Brünger, Kuriyan et al. 1987).

De la misma forma Maté (2017) quiso demostrar que la inhibición de la Rhokinasa en el SNC promueve la reparación de los tejidos alterados en el Alzheimer, y en el Parkinson protege las neuronas dopaminérgicas y mejora las capacidades de movimiento. Además, que la inhibición de la monoaminoxidasa (MAO) lleva indirectamente a un incremento de la transmisión dopaminérgicas, esencial en el tratamiento del Parkinson. Para comprobar esa hipótesis, decidieron unir el Fasudil, (un potente inhibidor de Rhokinasa), con un sustituyente propargílico (para evitar la inhibición de la Rhokinasa) mediante docking molecular, observando el estudio de las energías de enlace entre ambas moléculas. A través de esta técnica, compararon la interacción del fasudil-propargilo con la interacción del fasudil con la Rhokinasa, analizando que para todos los casos, el fármaco multidiana resultó tener una afinidad comparable o mejor que la del fármaco de referencia (Maté 2017).

Así mismo Castillo et al (2017), realizó un trabajo de docking molecular *in silico* para examinar la actividad inhibidora de la enzima AChE humana recombinante (rhAChE) con diferentes alcaloides de la familia Amaryllidaceae. Entre esos alcaloides están galantamina, norbeladina, crinina, pretazetina, licorina, hemantamina. Los resultados respaldan la idea que algunos de los alcaloides encontrados en las Amaryllidaceae son capaces de interactuar con los sitios de unión de la rhAChE, debido al scoring arrojado por el programa de dockaje usado que para el caso fue GOLD® (V 5.1), el cual es uno de los software más potentes y robustos. El GOLD SCORE fue de 8,27, este puntaje muestra el nivel de interacción entre los alcaloides y la AChE, logrando determinar que compuestos tienen una mejor interacción y

logran inhibir con mayor efectividad la proteína (Castillo-Ordóñez, Tamarozzi et al. 2017).

Las técnicas *in silico* como el docking y la dinámica molecular son aplicables a muchas enfermedades, como los realizados por Musyoka (2016) el cual Identificó posibles dianas farmacológicas y desarrolló nuevas quimioterapias antipalúdicas con un modo único de acción, debido a que la resistencia a los medicamentos por los parásitos *Plasmodium* es inevitable (Musyoka, Kanzi et al. 2016),.

Ibrar (2018) (Ibrar, Khan et al. 2018) diseñó y sintetizó dos nuevos híbridos de cumarina-tiazol y cumarina-oxadiazol. Se evaluaron nuevos análogos híbridos frente a AChE y BChE, con el fin de conocer su potencial para la prevención de la enfermedad de Alzheimer. En la serie de cumarinil tiazol, el compuesto 6b (único entre 12 compuestos evaluados se encontró como el miembro más activo contra AChE con coeficiente de interacción con un IC50 de $0,87 \pm 0,09 \mu\text{M}$, mientras que el compuesto 6j tuvo una eficacia significativa contra BuChE con un CI50 de $11,01 \pm 3,37 \mu\text{M}$.

Barreiro *et al.* (2005) aplicó un protocolo de acoplamiento virtual para buscar inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa del VIH-1 (NNRTI) y su mutante K103N. En primer lugar, realizó una búsqueda de similitud química en la biblioteca de Maybridge utilizando NNRTI conocidos como estructuras de referencia. Consecutivamente las moléculas seleccionadas se acoplaron a en los sitios de unión de la transcriptasa inversa natural (HIV-RT) y su variante K103N (K103N-RT) usando Glide 3.5. Los 100 compuestos mejor clasificados del acoplamiento para ambas proteínas se anotaron posteriormente con un procedimiento que usa dinámica molecular y solvatación continua (MM-GB / SA). Con esto observaron que un NNRTI (S10087), contiene un núcleo potencialmente viable, que posteriormente lograron sintetizar y es un inhibidor de uso clínico. Se autorizó en Estados Unidos el 22 de junio de 2008 llamado tipranavir (Aptivus®).

Cabe aclarar que estudios de docking molecular *in silico* entre las enzimas rhAChE, rhBChE con los alcaloides tazetina y anhidrolicorina, no se registran en las bases de datos.

6. METODOLOGÍA

6.1. OBTENCIÓN DE LOS SUSTRATOS MACROMOLECULARES.

La estructura tridimensional de las enzimas rhAChE y rhBChE se descargaron en formato pdb con sus respectivos códigos de identificación ID: 4EY6 y ID 2PM8 (Burley 2019) de las bases de datos Protein Data Bank (PDB) y Uniprot.

6.2 OBTENCIÓN DE LOS LIGANDOS.

Las moléculas de interés o ligandos se obtuvieron del repositorio público de PubChem (Kim, Thiessen et al. 2015) con sus respectivos códigos de identificación así: tazzetina (CID: 271607), anhidrolicorina (CID: 619567) y galantamina (CID: 9651). La galantamina se utilizó en todos los experimentos como control positivo.

6.3 PRE-TRATAMIENTO ESTRUCTURAL DE LIGANDOS Y SUSTRATOS.

Una vez descargados los ligandos, fueron minimizados para reducir su energía utilizando el software Avogadro (Hanwell, Curtis et al. 2012). Este paso no siempre se realiza, dado que muchos software de docking molecular tienen en su algoritmo de dockaje la minimización automática del ligante, no obstante en programas de uso libre como *AutodockTools*, esta opción no hace parte del paquete de herramientas, por lo tanto se deben buscar vías alternativas para minimizar el ligante, este paso es importante ya que al minimizar se le da al ligante la conformación con menor energía, que en teoría, es la que presentan los compuestos de forma real (Cole, Murray et al. 2005). Posteriormente, se usa el software *Open Babel* versión 2.3 (O'Boyle, Banck et al. 2011) para transformar el archivo SDF a formato PDBQT, el cual es requerido por los programas de docking molecular. *Open Babel* es una herramienta de código abierto que usa diferentes lenguajes de datos químicos. Este programa intercambia más de 110 formatos y da solución a la necesidad de representar una variedad tan amplia de datos químicos y moleculares. Los cuales requieren una biblioteca que implemente una amplia gama de algoritmos

bioinformáticos, para la asignación de carga parcial, detección de aromaticidad y la percepción del orden de los enlaces (O'Boyle, Morley et al. 2008).

El tratamiento previo de las estructuras rhAChE y rhBChE se realizó con el programa de visualización molecular *PyMol* versión 2.1.1 (DeLano 2002) y con el software *Python Molecular Viewer* (Johnson, Autin et al. 2011) que permiten la visualización y eliminación de elementos secundarios como las moléculas de agua que pueden causar interferencia en el momento de acoplar los compuestos en el sitio activo de las proteínas. Posteriormente, a través del programa se añadieron los hidrógenos y las cargas de Kollman, las cuales brindan las condiciones biofísicas reales, debido a que la mayoría de los datos de estructura macromolecular no contienen átomos de hidrógeno en sus archivos PDB correspondientes. Además, a menudo se cuestiona el estado de ionización de los residuos de proteínas, por lo que es necesario incluir las cargas (Forli, Huey et al. 2016, Dashti, Wedell et al. 2019).

6.4. PREDICCIÓN DE LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS PROTEÍNAS

El sitio activo de una enzima comprende un sitio de unión al sustrato y un sitio catalítico. El ambiente químico específico, desarrollado por los aminoácidos en el sitio activo determina qué ligantes son capaces de unirse a la enzima; es por eso, que para inhibir una proteína se debe tener conocimiento de que residuos conforman el sitio activo catalítico y periférico (Jindal, Slanska et al. 2019). Existen diferentes programas que predicen los residuos que conforman el sitio activo, para este caso se llevó a cabo con el servidor *FTsite* (Ngan, Hall et al. 2011). Este método de identificación se basa en la creación de un FTMap que es un servidor de mapeo computacional que identifica los “hotspots” de unión de las macromoléculas (regiones de la superficie con mayores contribuciones a la energía libre de unión al ligando). FTMap toma muestras de miles de millones de posiciones de

pequeñas moléculas orgánicas utilizadas como sondas, y puntúa las posturas de la sonda utilizando una expresión de energía detallada. Las regiones que unen grupos de múltiples tipos de sondas identifican los hotspots de enlace en buena concordancia con los datos experimentales (Brenke, Kozakov et al. 2009, Kozakov, Grove et al. 2015).

6.5. ANÁLISIS DE DOCKING MOLECULAR

El análisis de acoplamiento molecular se realizó utilizando los programas AutoDock Tools (ADT) versión 1.5.6 y Autodock Vina (AV). ADT combina una evaluación rápida de energía a través de cuadrículas precalificadas de potenciales de afinidad con una variedad de algoritmos de búsqueda para encontrar posiciones de unión adecuadas para un ligando en una macromolécula determinada. AV por su parte, utiliza un método mejorado de optimización de gradiente en su procedimiento de optimización local. El cálculo del gradiente le da al algoritmo de optimización un "sentido de dirección" desde una única evaluación a través del uso de múltiples subprocesos. El programa busca las mejores orientaciones de los ligandos que se unen al sitio activo de cada proteína, es decir las conformaciones con menor energía libre (Tanchuk, Tanin et al. 2016, Di Muzio, Toti et al. 2017).

6.6. PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD Y PERMEABILIDAD CEREBRAL-GASTROINTESTINAL (VIABILIDAD TERAPÉUTICA)

Para la predicción de toxicidad de tazzetina, anhidrolicorina y galantamina se usó el programa ProTox-II, es un laboratorio de toxicidad virtual disponible para usuarios académicos a través de un servidor web. ProTox-II contiene modelos basados en computadora obtenidos a partir de datos reales (*in vitro* o *in vivo*) para predecir el potencial tóxico de compuestos existentes y virtuales (Banerjee, Eckert et al. 2018). Por otro lado, la viabilidad terapéutica de cada compuesto fue analizada a través de la plataforma Swiss ADME (Daina, Michielin et al. 2017), la cual permite evaluar la permeabilidad intestinal y cerebral de cada alcaloide, haciendo uso del método de premiación cerebral o intestinal (the Brain Or IntestinaL EstimateD permeation

method (BOILED-Egg)). Se trata de un modelo predictivo preciso que funciona computando la lipofilicidad y la polaridad de moléculas pequeñas (Chedik, Mias-Lucquin et al. 2017).

6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó usando el programa RWizard versión 3.5 (Guisande, Vaamonde et al. 2014), utilizando una matriz de Excel donde se ubican los valores de afinidad arrojados por el programa Autodock Vina y se compararon mediante un contraste de homogeneidad de variables cuantitativas, específicamente una prueba ANOVA, para establecer si hay diferencias significativas en la afinidad (variable) entre los alcaloides y el control positivo para cada proteína.

Para el caso de las pruebas de toxicidad y permeabilidad cerebral-gastrointestinal, no se aplican análisis estadísticos, ya que los servidores utilizados tienen su propio algoritmo estadístico, el cual viene integrado en el resultado final de los análisis.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para identificar y encontrar la mejor posición de los ligandos en los sitios de unión a las proteínas diana, se realizó un acoplamiento molecular tridimensional entre las enzimas rhAChE y rhBChE con los alcaloides tazetina, anhidrolicorina y galantamina, teniendo en cuenta las coordenadas anatómicas de la estructura cristalográfica de cada proteína (Figura 4). Estas coordenadas permiten ubicar espacialmente cada átomo de una estructura macromolecular lo que posibilita el reconocimiento de todos los residuos que conforman las proteínas rhAChE y rhBChE (Lüthy, Bowie et al. 1992).

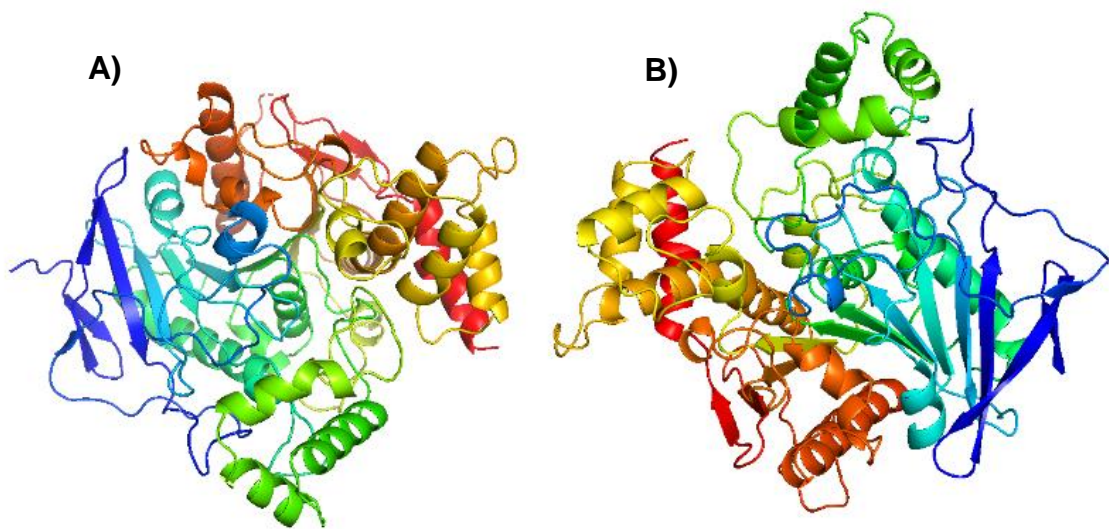


Figura 4. Proteínas usadas como dianas macromoleculares rhAChE (A) código PDB: 4EY6 y rhBChE (B) código PDB: 2PM8 (Heinz, D. *et al.*,1993).

En este caso rhAChE y rhBChE tienen una resolución de 2.3983 Å y 2.8 Å respectivamente lo que indica que las proteínas son aptas, puesto que están dentro del rango de buena resolución de 2 a 3 Å (Tabla 1), de igual manera ambas estructuras se obtuvieron por difracción de rayos X, que es el método de obtención ideal para trabajos de acoplamiento molecular.

Tabla 1. Datos de las enzimas obtenidas del repositorio público Protein Data Bank, necesarios para el cumplimiento de los requisitos previos al proceso de docking molecular.

Datos experimentales PDB		
Proteína	rhAChE	rhBChE
Código PDB	4EY6	2PM8
Método de obtención	Difracción rayos X	Difracción rayos X
Resolución	2.3983 Å	2.8 Å
año de cristalización	2012	2007
Autor	Cheung et al., (2012)	Homma et al., (2007)

* Å = Armstrongs

* rhAChE= Acetilcolinesterasa Recombinante Humana

* rhBChE= Butirilcolinesterasa Recombinante Humana

Las proteínas seleccionadas deben estar completamente limpias, es decir deben estar en su forma más sencilla, sin formar complejos con algún ligante o estructura similar, sin iones distintos a los que naturalmente presenta la estructura y eliminando moléculas de agua que quedaron en el proceso de cristalografía de las proteínas, la limpieza de las proteínas es clave para evitar errores ya que en la búsqueda de fármacos *in silico*, moléculas externas a la proteína complican el proceso de encontrar poses y calcular la afinidad de unión (Sulimov, Kutov et al. 2019).

En la etapa de identificación y selección virtual, la estructura cristalina de la diana macromolecular puede incluir varias moléculas como agua cristalográfica, iones y residuos, al no eliminar estos elementos se afecta las funciones de puntuación de acoplamiento y eso puede sesgar resultados de puntuación puesto que las moléculas externas pueden mediar los contactos entre el ligando y la proteína objetivo (Wong and Lightstone 2011). Se debe tener en cuenta que rhAChE y rhBChE son monómeros es decir una sola cadena polipeptídica, estructuralmente muy similares, no obstante en las estructuras obtenidas en la base de datos PDB rhAChE se presenta como dímero anfífilico en complejos con ligandos de fármacos y rhBChE se presenta como una glicoproteína tetramérica (Cheung, Rudolph et al.

2012) (Ngamelue, Homma et al. 2007), esto significa que durante el proceso de cristalografía se formaron complejos proteicos que deben ser corregidos, en otras palabras, con el software Pymol se eliminó para rhBChE la cadena adicional beta, así como 92 moléculas de agua cristalográfica, seis moléculas de sulfato y doce ligantes que presentaban las proteínas originalmente (Figura 5). Para el caso de rhAChE se eliminó la cadena beta, junto con 383 moléculas de agua cristalográfica, dos moléculas de nitrato y trece ligantes asociados.

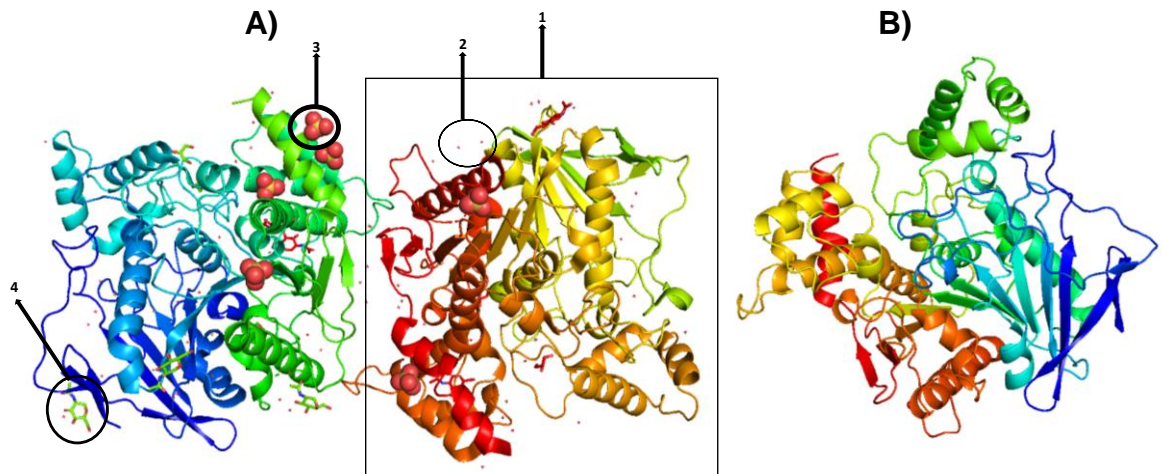


Figura 5. (A) rhBChE sin pre-tratamiento, 1: Cadena beta. 2: Agua cristalográfica. 3: sulfato. 4: ligantes. (B) rhBChE con pre-tratamiento. Eliminación de cadenas secundarias, iones y residuos no pertenecientes a la proteína, a través del software *PyMOL*.

Los tres sitios activos calculados para rhAChE y rhBChE a través del servidor web *FTsite* fueron analizados, se encontró que el sitio activo uno para el caso de las dos enzimas fue el seleccionado para realizar el proceso de docking molecular (Tabla 2), esto debido a que este sitio activo seleccionado está formado por varios residuos que en el caso de rhAChE contiene la triada catalítica, y para la rhBChE el sitio activo seleccionado contiene los residuos del sitio aniónico periférico (Asp70), el bolsillo de unión a la colina (Trp82) y el bolsillo de unión al acilo (Trp231, Leu286 y Val288), así como los residuos catalíticos de serina e histidina (Ser198 y His438) (Jiang and Gao 2019). Para el acoplamiento de rhAChE con los ligantes es muy importante que el sitio activo determinado esté compuesto por los residuos de la

triada catalítica, puesto que la reacción de degradación de ACh transcurre a través de la adición de Ser200 nucleofílica al carbonil C de la acetilcolina, y la reacción se facilita mediante la transferencia simultánea de protones desde Ser203 a His447, el tercer residuo de la tríada catalítica, Glu334, es esencial para estabilizar el estado de transición a través de interacciones electrostáticas (Polgár 2005). En el caso de rhBChE la ubicación del sitio periférico (Asp70) está en el borde exterior de la garganta, se ha postulado como el sitio de unión del sustrato inicial. Se ha propuesto que la unión del ligando a este sitio ralentice el tráfico de sustrato y producto en el sitio de acilación, debido a la similitud estructural el funcionamiento de la triada catalítica es parecido al de rhAChE (Darvesh, Hopkins et al. 2003).

Tabla 2. Residuos del sitio activo seleccionado por FTSite server para cada proteína.

Sitio activo para cada proteína		
rhBChE	rhBChE	rhAChE
ASP A 70	ALA A 199	TRP A 86
GLY A 78	TRP A 231	GLY A 120
SER A 79	PRO A 285	GLY A 121
TRP A 82	LEU A 286	GLY A 122
ASN A 83	SER A 287	TYR A 133
TYR A 114	VAL A 288	GLU A 202
GLY A 115	ASN A 289	SER A 203
GLY A 116	ALA A 328	ALA A 204
GLY A 117	PHE A 329	TRP A 236
PHE A 118	TYR A 332	PHE A 295
GLN A 119	PHE A 398	PHE A 297
THR A 120	TRP A 430	TYR A 337
GLY A 121	MET A 437	PHE A 338
THR A 122	HIS A 438	TRP A 439
LEU A 125	GLY A 439	HIS A 447
TYR A 128	TYR A 440	GLY A 448
GLU A 197	ILE A 442	TYR A 449
SER A 198		ILE A 451

*se señalan los residuos de la triada catalítica con un circulo.

Los posibles modos de unión de tazzetina, anhidrolicorina y galantamina se determinaron en el sitio activo uno de rhAChE y rhBChE haciendo uso del programa *Autodock Vina*. Este software usa un algoritmo optimizado basado en *Autodock 4.2.6* (Glaab 2015).

El parámetro de configuración en el cual se especifican las coordenadas en la proteína donde se realizará el proceso de acoplamiento. Fue realizado mediante la opción *Gridbox* de *Autodock Tools*, y se estableció un "campo de fuerza" en un espacio determinado con sus propias coordenadas, el espacio usado para ejecutar el acoplamiento de los ligantes fue el sitio activo establecido previamente por *FT site*, los residuos de los sitios activos se diferenciaron usando *Python Molecular Viewer* (PMV), se diferenciaron un total de 35 residuos para rhBChE y 18 residuos para rhAChE, posteriormente se establecieron las coordenadas haciendo que el *gridbox* cubriera en su totalidad los sitios activos para cada proteína (Figura 6). Las coordenadas para rhAChE fueron -12.016 para el eje X, -47.805 para el eje Y, y 31.752 para el eje Z, el tamaño del *gridbox* es X=64, Y=74 y Z=80; Las coordenadas para rhBChE fueron 15.859 en el eje X, -34.482 en el eje Y, y 8.481 en el eje Z, el tamaño del *gridbox* es X=82, Y=70 y Z=80. La ventaja de usar PMV es en gran medida el rápido proceso de creación de los parámetros para *Autodock Vina*, generando un archivo tipo texto (.txt) que contiene la información de las coordenadas de los ejes X, Y, Z junto con el tamaño del campo de fuerza dado por la herramienta *gridbox* (Baba and Akaho 2011).

Durante los procesos de interacción molecular realizados con *AutoDock Vina*, se generan miles de complejos ligando-proteína, que se clasifican según su afinidad (energía libre de Gibbs) generando por defecto las nueve mejores conformaciones posibles (Tabla 3), valores negativos, indican una alta interacción molecular, es decir a menores valores hay una mayor correlación entre sustratos y ligantes. El

procedimiento de acoplamiento de las macromoléculas diana rhAChE y rhBChE con tazzetina, anhidrolicorina y galantamina mostró que todos los complejos de enzimas tienen un gran potencial de inhibición, además de mostrar fuerte correlación con los sitios de unión seleccionados previamente y estar estabilizados por enlaces de hidrógeno intermoleculares o interacciones de apilamiento pi.

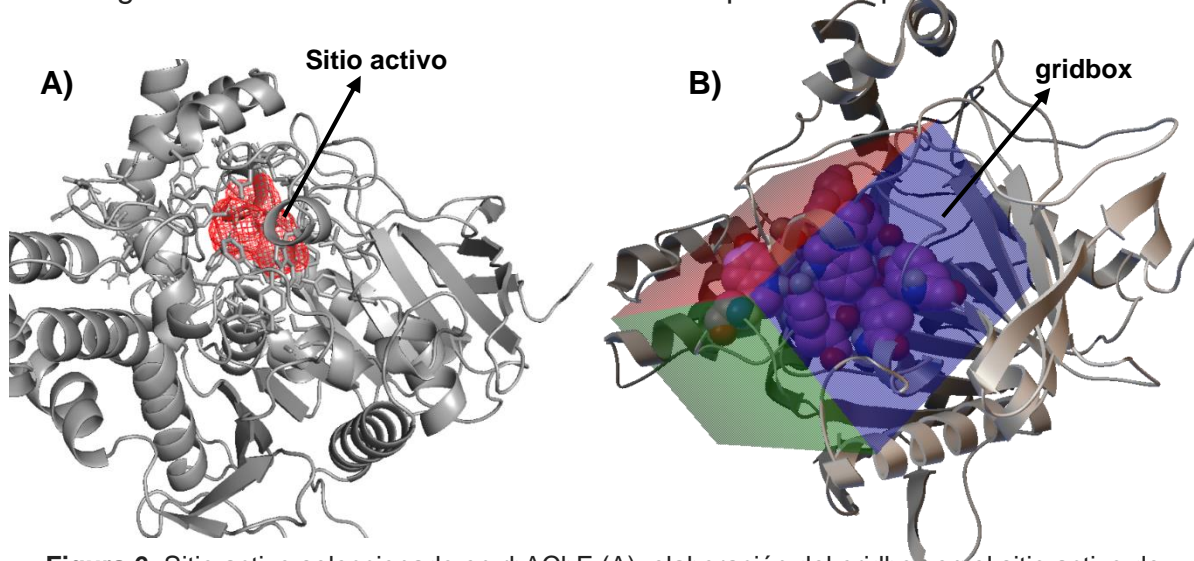


Figura 6. Sitio activo seleccionado en rhAChE (A), elaboración del gridbox en el sitio activo de rhAChE (B).

Estos sitios de unión representan espacios de las moléculas con gran potencial, que posiblemente determinan el modo de acción de estos alcaloides de origen vegetal con respecto a la actividad inhibitoria de rhAChE y rhBChE, ya que las moléculas de los alcaloides interactúan con los residuos comunes, donde teóricamente deben actuar. Por otro lado, todas las interacciones evaluadas se ubican dentro de los sitios activos (garganta larga y bolsillos de unión) lo cual corrobora el potencial de inhibición de los alcaloides (Figuras 7, 8) (Anand and Singh 2013).

Tabla 3. Afinidad de la mejor conformación para cada alcaloide con respecto a las proteínas.

Alcaloides	Afinidad rhAChE	Afinidad rhBChE
Anhidrolicorina	-8,80	-9,70
Tazzetina	-8,20	-9,90
Galantamina	-7,50	-8,40

Tabla 4. Valores de afinidad arrojada con las nueve mejores conformaciones dadas por el acoplamiento molecular

rhAChE		rhBChE	
Alcaloide	Afinidad	Alcaloide	Afinidad
Galantamina	-7,5	Galantamina	-8,4
Galantamina	-7,1	Galantamina	-8,4
Galantamina	-7	Galantamina	-8,3
Galantamina	-7	Galantamina	-8,1
Galantamina	-6,9	Galantamina	-8
Galantamina	-6,8	Galantamina	-7,4
Galantamina	-6,8	Galantamina	-7,3
Galantamina	-6,7	Galantamina	-7,1
Galantamina	-6,6	Galantamina	-7
Anhidrolicorina	-8,8	Anhidrolicorina	-9,7
Anhidrolicorina	-8,5	Anhidrolicorina	-9,4
Anhidrolicorina	-8,2	Anhidrolicorina	-9,3
Anhidrolicorina	-8	Anhidrolicorina	-8,9
Anhidrolicorina	-7,8	Anhidrolicorina	-8,3
Anhidrolicorina	-7,7	Anhidrolicorina	-8
Anhidrolicorina	-7,4	Anhidrolicorina	-7,9
Anhidrolicorina	-7,3	Anhidrolicorina	-7,7
Anhidrolicorina	-7	Anhidrolicorina	-7,7
Tazetina	-8,2	Tazetina	-9,9
Tazetina	-8,1	Tazetina	-9,5
Tazetina	-7,4	Tazetina	-9,2
Tazetina	-7,3	Tazetina	-8,9
Tazetina	-7,3	Tazetina	-8,9
Tazetina	-7,1	Tazetina	-8,6
Tazetina	-7	Tazetina	-8,2
Tazetina	-7	Tazetina	-7,9

*Estos datos son los que se toman para realizar las pruebas estadísticas.

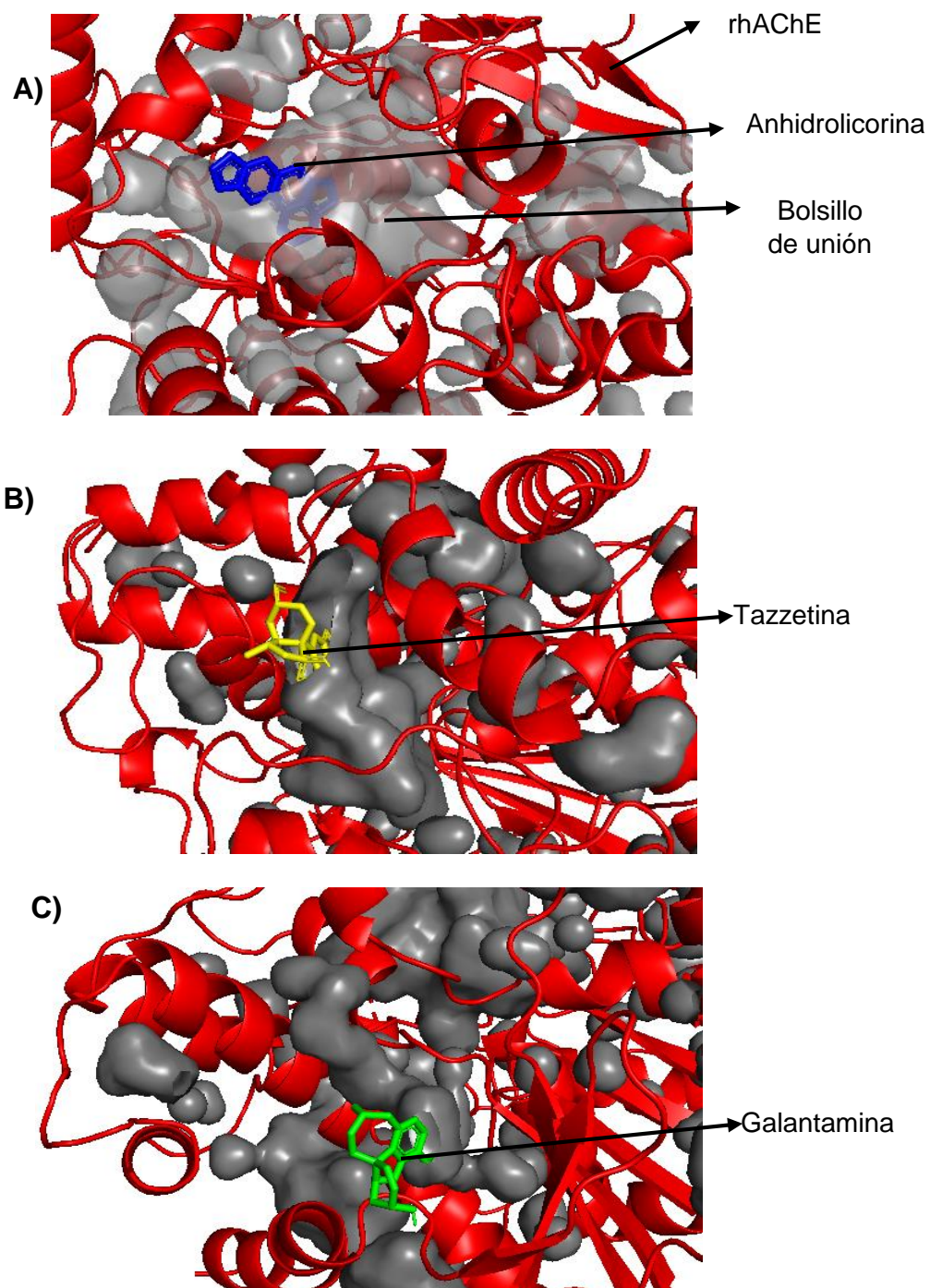


Figura 7. Complejos proteína-ligando con la mejor afinidad entre AChE (rojo) y anhidrolicorina (A) (azul), tazetina (B) (amarillo) y el control galantamina (C) (verde); con exposición de los bolsillos de unión (gris).

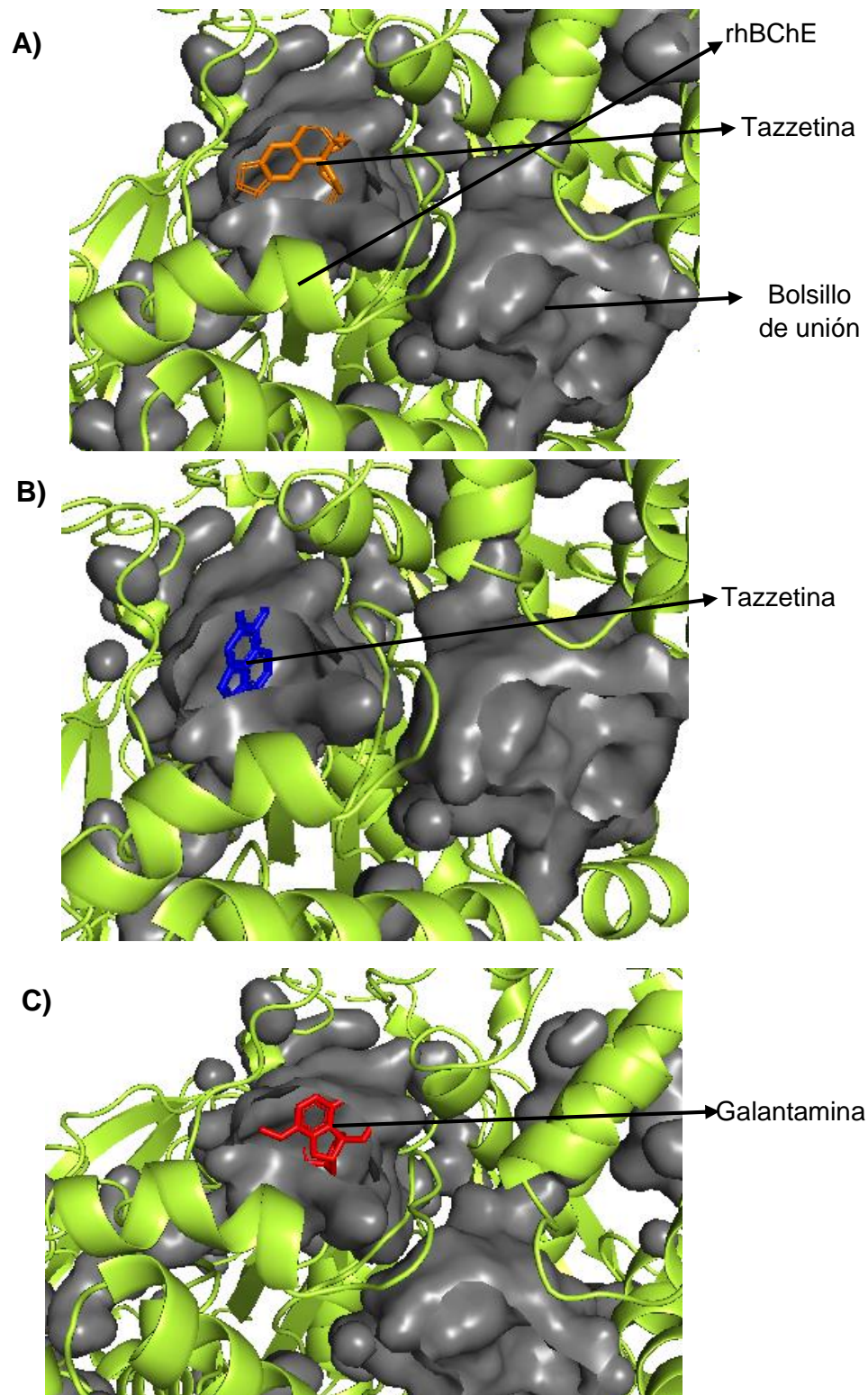


Figura 8. Complejos proteína-ligando con la mejor afinidad entre BChE (Verde) y tazetina (A) (Naranja), anhidrolitorina (B) (Azul) y el control galantamina (C) (Rojo); con exposición de los bolsillos de unión (gris).

En cuanto a los resultados de afinidad las poses de acoplamiento generadas por *Autodock Vina* se pueden cargar directamente en *PyMOL*. Las posturas para múltiples ligantes pueden manejarse simultáneamente usando un diseño intuitivo. Para cada postura de acoplamiento, la metainformación que contiene la puntuación de acoplamiento se muestra en un visor de texto pequeño y los resultados de las mejores ejecuciones de acoplamiento se resumen en la tabla 3. Las poses de acoplamiento se clasifican según sus puntuaciones de acoplamiento y tanto la lista clasificada de ligandos acoplados como sus poses de unión correspondientes pueden exportarse.

Las puntuaciones de energía libre muestran una fuerte afinidad de los inhibidores por los bolsillos de unión a las enzimas, el mejor candidato para inhibir rhAChE fue la anhidrolicorina, porque tiene el valor energético más bajo (-8.80), mientras que el mejor compuesto para inhibir rhBChE es la tazzetina con un valor de (-9.90), estos valores indican que los dos alcaloides tienen un potencial de inhibición mejor que el control positivo galantamina, que se demuestra no solo en la tabla de afinidad (Tabla 3), sino también gráficamente, ya que en todos los casos los alcaloides interactúan de manera mínima o amplia con algún bolsillo de unión (el ligante está dentro de un bolsillo o una parte del ligante está dentro del bolsillo de unión), dando a entender que estos compuestos tienen relación con la inhibición de las proteínas. Sabiendo que la galantamina es uno de los pocos fármacos aprobados por la FDA y que tazzetina y anhidrolicorina tuvieron mejor potencial de inhibición, se deduce que estos compuestos son posibles candidatos para dianas farmacológicas.

Estructuralmente tienen algunas diferencias como por ejemplo el grupo control tiene más átomos de torsión que tazzetina y anhidrolicorina detectados en *PMV*, estos átomos pueden inferir en la capacidad de movilidad de un ligante, además tazzetina y anhidrolicorina tienen más anillos aromáticos que el grupo control (Cahlíková, Macáková et al. 2011). Un aspecto limitante es que en *C. subedentata* los alcaloides tazzetina y anhidrolicorina están en bajo porcentaje de corriente iónica total (Di

Muzio, Toti et al.) respecto a galantamina, tanto así que anhidrolicorina fue reportada simplemente como trazas, lo que significa que hay muy poco contenido de esta sustancia en la planta, tazzetina tiene una corriente ionica total (TIC por sus siglas en inglés) de 12,447% y galantamina tiene un TIC de 24,776% (Cabezas, Pigni et al. 2013), en la actualidad es posible sintetizar los compuestos en concentraciones más altas, lo cual potencia el estudio de estas sustancias en los pocos modelos biológicos a los que se tiene acceso actualmente (Saldívar-González, Prieto-Martínez et al. 2017).

Los máximos valores de afinidad de los alcaloides, en todos los casos siempre fueron superiores en rhBChE respecto a rhAChE, estas dos proteínas son altamente homólogas con distintas preferencias de sustratos. rhBChE es conocida como "colinesterasa no específica" debido a su amplia gama de sustratos, que incluyen acetilcolina, butirilcolina, succinilcolina, organofosfatos, cocaína entre otros. Mientras que rhAChE es altamente específica para ACh, siendo tan parecidos estructuralmente estas dos enzimas difieren mucho en cuanto a especificidad, esto se debe principalmente a la posición de los residuos que conforman sus triadas catalíticas, ya que si bien los aminoácidos son los mismos la posición de los residuos difiere, dándole a rhBChE un espacio más amplio en la triada catalítica para que más sustratos actúen (Cavdar, Senturk et al. 2019). Esto hace que esta enzima actúe fisiológicamente como un "escudo" para evitar la inhibición de rhAChE, por lo que rhBChE es un objetivo de inhibición grande, y basados en los valores de la tabla 3 se consigue inhibir muy bien esta proteína con tazzetina y anhidrolicorina (Jiang and Gao 2019).

El análisis estadístico se realizó en dos partes, aplicando un filtro por proteína, es decir se hizo un análisis ANOVA con los datos de afinidad usando como factor los alcaloides para cada proteína (Tabla 4). Los resultados estadísticos mostraron que los datos de afinidad tienen una distribución normal a través de la prueba de

Kolmogorov-Smirnov en ambos casos (valor $p = 0,2285$ para rhAChE y valor $p = 0,2422$ para rhBChE), además de presentar homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene (valor $p = 0,11765$ para rhAChE y valor $p = 0,6299$ para rhBChE), esto indica que aplicar una prueba paramétrica para los datos de afinidad de las dos proteínas es la mejor opción, esto se llevó a cabo con el paquete estadístico RWizard; En el caso de rhAChE, el análisis de varianza ANOVA mostró un valor $p = 0.001219$ lo que indica que hay una diferencia significativa entre la afinidad de los alcaloides (Figura 9), y estas diferencias entre alcaloides se determinó con un contraste de Tukey, esta prueba marca diferencias significativas entre la afinidad del grupo control y anhidrolicorina con un valor $p = < 0,001$ es decir es extremadamente significativo.

De igual manera el análisis de varianza ANOVA para el caso de rhBChE mostró un valor $p = 0,01383$ esto quiere decir que existen diferencias significativas entre los alcaloides respecto a la afinidad en rhBChE, esto se corrobora mediante el test de Tukey, el cual arroja las diferencias entre alcaloides, y para este caso existen diferencias significativas entre el grupo control y tazzetina ($p = 0,0142$) indicando una mayor eficacia de la tazzetina ante la galantamina (Tabla 5). Todos los resultados se muestran en el boxplot de la figura 9.

Tabla 5. Resultados de prueba Tukey, que compara las diferencias entre la afinidad de los alcaloides para cada proteína.

Alcaloides comparados rhBChE	p-valor	Alcaloides comparados rhAChE	p-valor
galantamina-anhidrolicorina	0,0678	galantamina-anhidrolicorina	<0,001***
tazzetina-anhidrolicorina	0,7569	tazzetina-anhidrolicorina	0,1524
tazzetina-galantamina	0,0142**	tazzetina-galantamina	0,0913

** diferencia altamente significativa entre la afinidad de tazzetina y galantamina respecto a rhBChE.

*** diferencia extremadamente significativa entre la afinidad de anhidrolicorina y galantamina respecto a rhAChE.

Los fármacos como la rivastigmina, donepezilo, tacrina y galantamina son los inhibidores de la colinesterasa utilizados para el tratamiento de la EA; sin embargo, estos medicamentos tienen una eficacia limitada para detener el curso de la enfermedad. Por lo que, la investigación relacionada con la síntesis de inhibidores de colinesterasas se ve incrementada, especialmente en la búsqueda de compuestos más potentes y altamente eficaces modificando los restos de la plantilla principal de inhibidores de la colinesterasa disponibles para el tratamiento de la EA. Los efectos inhibitorios de las enzimas están fuertemente relacionados con las características estructurales comunes de cada compuesto; la actividad inhibitoria de Colinesterasas que pertenece a la estructura de tipo licorina se ha atribuido a la presencia de un anillo aromático junto con el átomo de nitrógeno cuaternario, que es importante para la actividad inhibitoria mostrada por diferentes compuestos (Konrath, Passos et al. 2013).

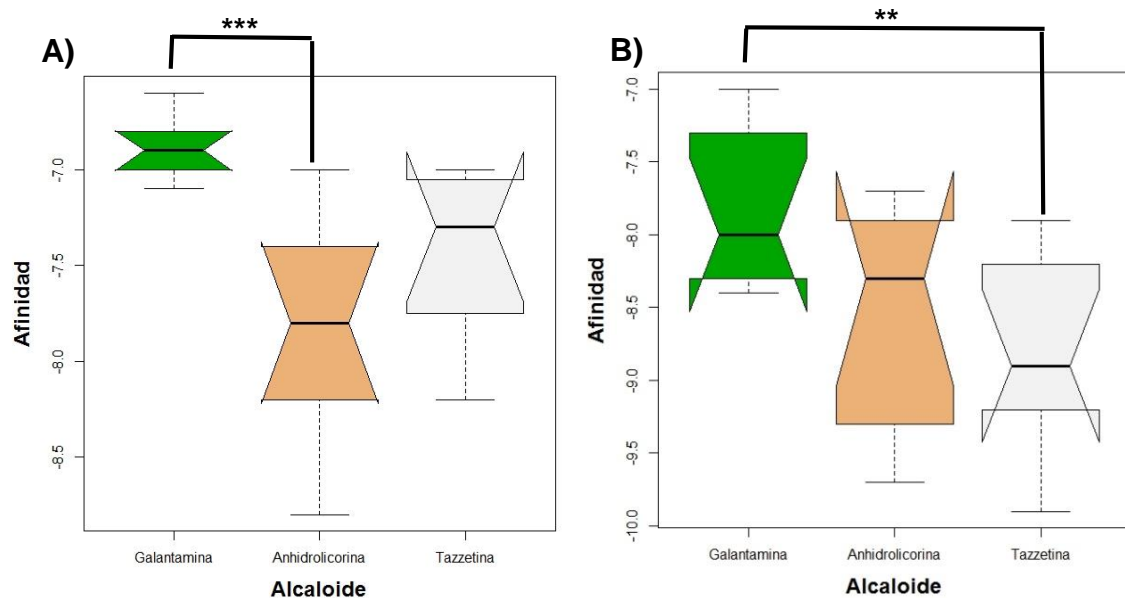


Figura 9. Boxplot de afinidad de los alcaloides para las proteínas rhAChE (A) y rhBChE (B).
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Sabiendo que el avance en el campo de la investigación computacional ha hecho posible que los métodos in silico ofrezcan beneficios significativos tanto para las

necesidades regulatorias como para los requisitos de evaluación de riesgos, y que la industria farmacéutica evalúa el perfil de seguridad de un producto químico, se determinó la toxicidad para la tazzetina, anhidrolicorina y galantamina con el servidor ProTox-II, este laboratorio virtual para la predicción de toxicidades de moléculas pequeñas, incorpora similitud molecular, farmacóforos, propensiones de fragmentos y modelos de aprendizaje automático, con esto se predijo diversos puntos finales de toxicidad en los alcaloides, tales como toxicidad aguda, hepatotoxicidad, citotoxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad (Banerjee, Eckert et al. 2018).

Se considera a los alcaloides como estructuras de entrada, se pronostica la toxicidad utilizando 33 modelos con puntuaciones de confianza respectivas, los resultados de toxicidad oral se pueden observar en la figura 10, los modelos de toxicidad aguda se desarrollan en base a similitudes químicas entre compuestos con efectos tóxicos conocidos y la presencia de fragmentos tóxicos, según la gravedad de su efecto, los compuestos se pueden clasificar en diferentes grupos de toxicidad (clases).

El servidor web los divide en seis clases, cinco clases que representan diferentes grados de toxicidad y la clase no tóxica, de esta forma:

- Clase I: fatal si se ingiere ($LD50 \leq 5$)
- Clase II: fatal si se ingiere ($5 < LD50 \leq 50$)
- Clase III: tóxico si se ingiere ($50 < LD50 \leq 300$)
- Clase IV: nocivo si se ingiere ($300 < LD50 \leq 2000$)
- Clase V: puede ser dañino si se ingiere ($2000 < LD50 \leq 5000$)
- Clase VI: no tóxico ($LD50 > 5000$)

Las dosis tóxicas a menudo se administran como valores de LD50 en mg / kg de peso corporal. La LD50 es la dosis letal media, es decir, la dosis a la que el 50% de

los sujetos de prueba mueren al exponerse a un compuesto (Álvarez-Holguín, Morales-Nieto et al. 2019).

La galantamina presenta una toxicidad clase 2, lo que significa que es bastante tóxica, por lo que las concentraciones en las que debe administrarse en bajas cantidades (Koola, Praharaj et al. 2019), la LD50 calculada fue de 19 mg/kg, a diferencia de anhidrolicorina y tazzetina cuyas LD50 fueron 1000mg/kg y 765mg/kg respectivamente, estos dos alcaloides presentan toxicidad clase 4, es decir, si bien estos compuestos pueden afectar al organismo en grandes cantidades, podrían administrarse en concentraciones mayores a la galantamina.

Además se hizo la predicción de la toxicidad en órganos la cual se determina con la hepatotoxicidad inducida por fármacos que es una causa importante de insuficiencia hepática aguda y una de las principales razones para la retirada de fármacos del mercado (Drwal, Banerjee et al. 2014). Los productos químicos que pueden inducir tumores o aumentar la incidencia de tumores se denominan carcinógenos. Los datos para la predicción de carcinogenicidad se recogen de la base de datos de potencia carcinogénica (CPDB) y la base de datos CEBS.

El modelo de predicción de carcinogenicidad ProTox-II tiene una precisión equilibrada de 81.24%. De igual manera, los productos químicos que causan mutaciones genéticas anormales, como los cambios en el ADN de una célula, se denominan mutágenos. Dichos cambios pueden causar daño a las células y resultar en ciertas enfermedades, por ejemplo, cáncer.

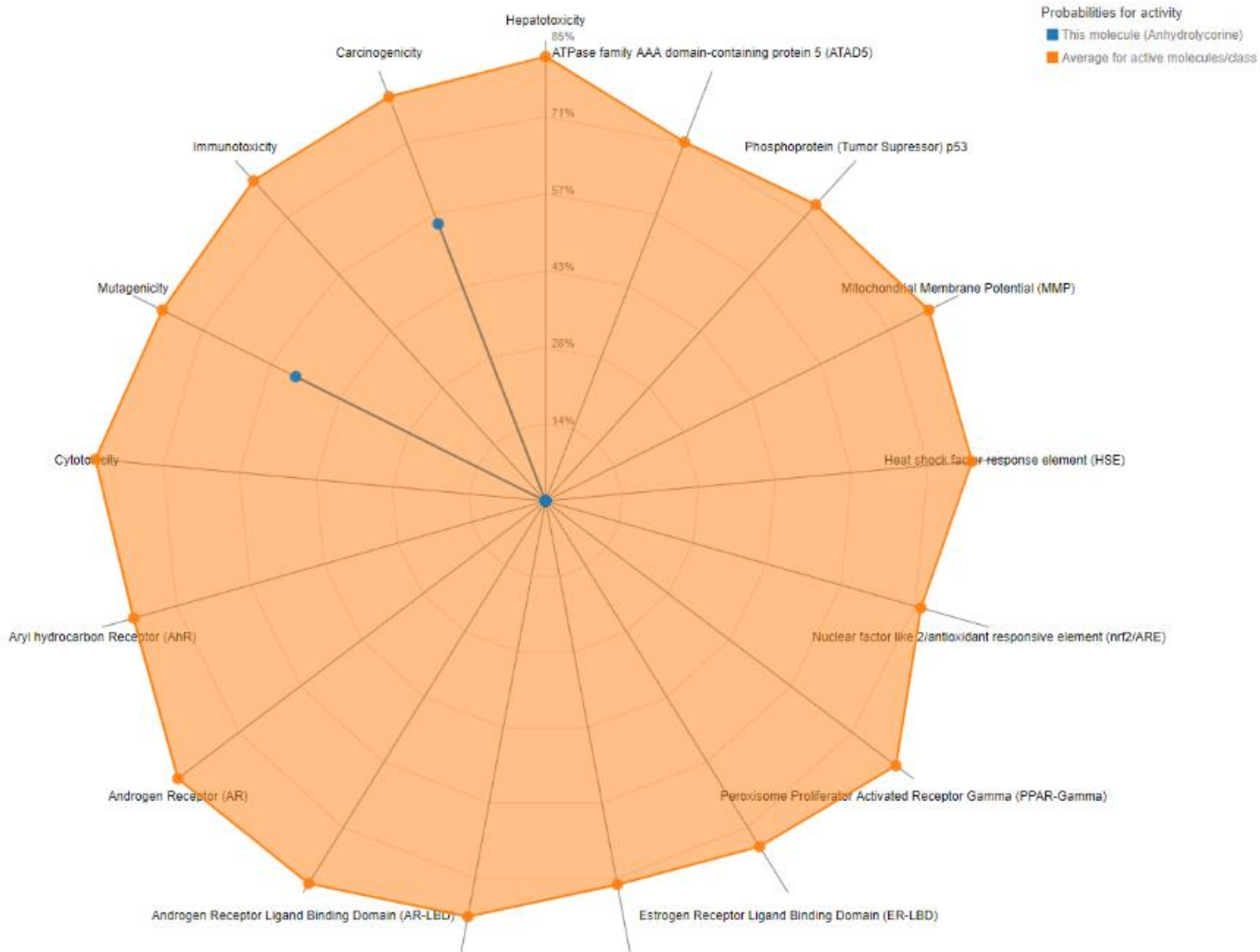
La predicción de mutagenicidad se basa en el conjunto de datos de referencia en la base de datos CEBS. El modelo de predicción de mutagenicidad ProTox-II tiene una precisión equilibrada de 84.00%. Por otro lado, la predicción de la citotoxicidad es importante para detectar compuestos que pueden causar daño celular no deseado y deseado, este último como en el caso de las células tumorales. El modelo de

citotoxicidad ProTox-II se basa en datos extraídos de la base de datos del Laboratorio Europeo de Biología Química (ChEMBL). El modelo de predicción de citotoxicidad ProTox-II tiene una precisión equilibrada de 85.00%. Los resultados de predicción se proporcionan como un gráfico de radar de toxicidad general (Figura 10).

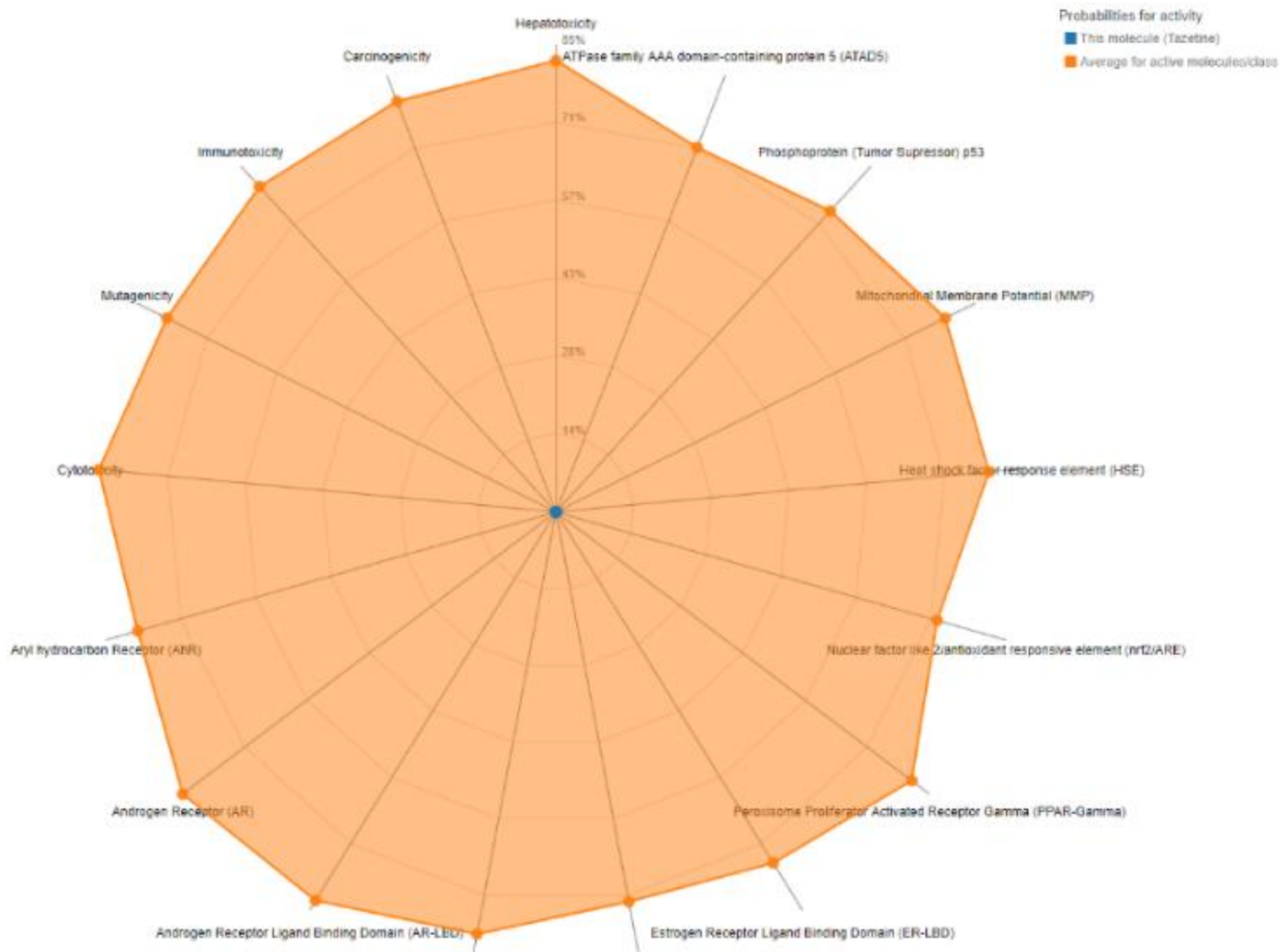
Es importante aclarar que la hepatotoxicidad, citotoxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad pueden aparecer como activas o inactivas en el Informe del modelo de toxicidad, pero se debe observar la casilla de probabilidad, ya que es esta casilla la que determina si la variable se puede tener en cuenta o no, es decir si alguna molécula presenta hepatotoxicidad activa pero la probabilidad es menor a 0,7 no se tiene en cuenta debido a que la predicción no fue lo suficientemente precisa (Drwal, Banerjee et al. 2014). Teniendo en cuenta lo anterior ningún alcaloide evaluado tuvo hepatotoxicidad, citotoxicidad, mutagenicidad o carcinogenicidad, como se ve en la figura 10 la línea azul no sobrepasa el radar, que es cuando se tendría alguna variable tóxica.

Aparte de la eficacia y la toxicidad, muchos fallos en el desarrollo de fármacos son imputables a una farmacocinética y biodisponibilidad deficientes (Daina, Michielin et al. 2017). La absorción gastrointestinal y el acceso al cerebro son dos comportamientos farmacocinéticos cruciales para estimar varias etapas de los procesos de descubrimiento de fármacos. Para determinar la permeabilidad, el método BOILED - Egg (the Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method) fue aplicado a la tazzetina, anhidrolicorina y galantamina. Este modelo ofrece un método robusto rápido, intuitivo, fácilmente reproducible y estadísticamente válido para predecir la absorción gastrointestinal pasiva y el acceso al cerebro de moléculas pequeñas útiles para el descubrimiento y desarrollo de fármacos (Figura 11).

A)



B)



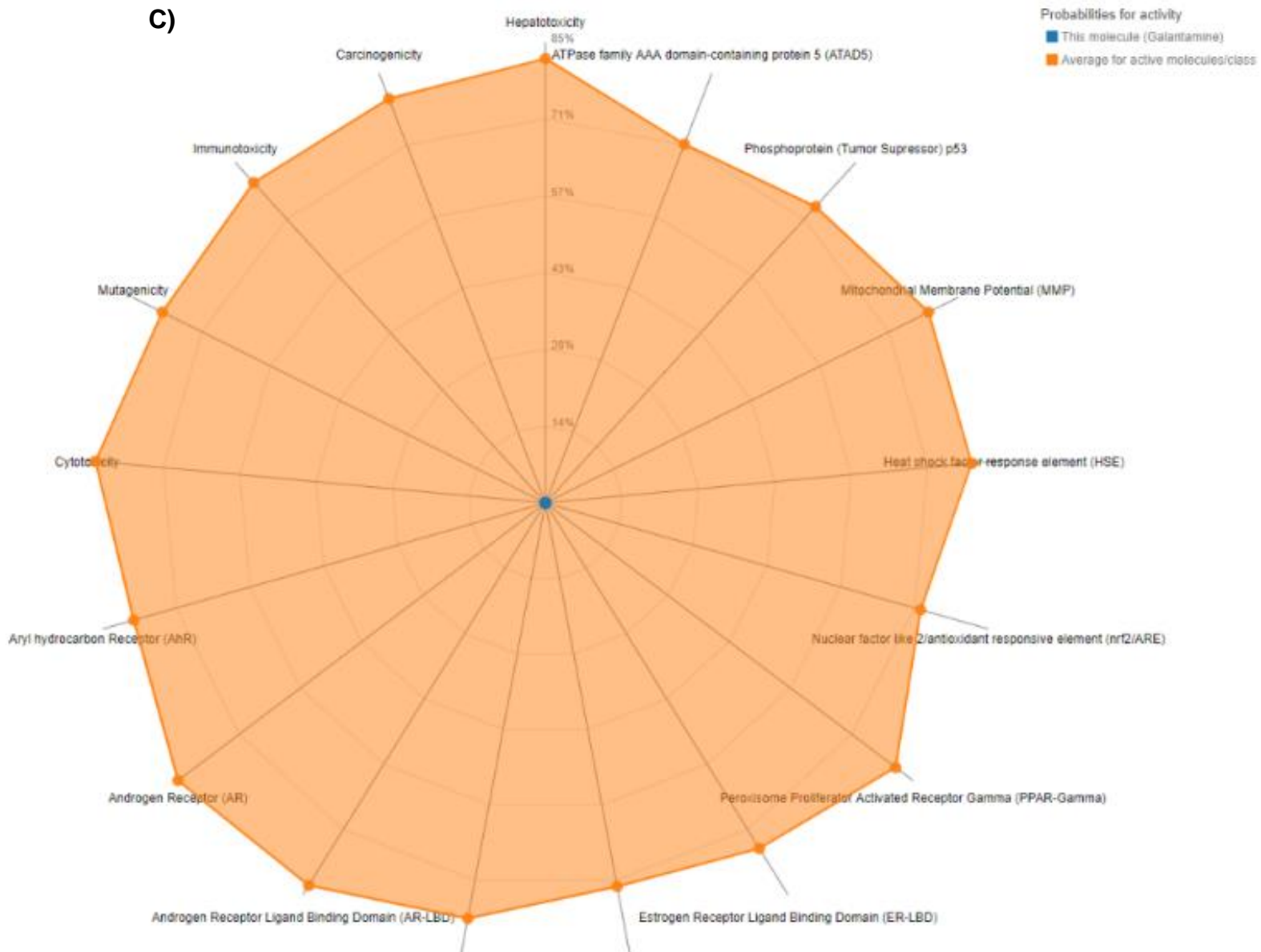


Figura 10. Gráficos de radar de toxicidad para anhidrolicorina (A), tazzetina (B) y galantamina (C). Se establece que si el punto azul sobrepasa el radar naranja, tiene una clase de toxicidad.

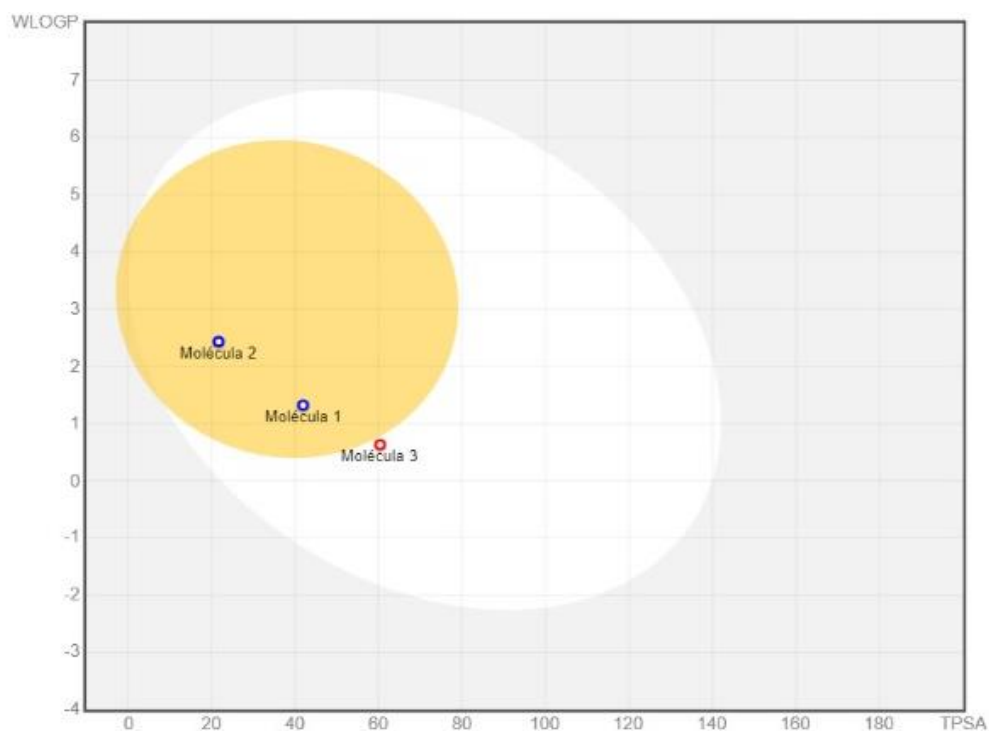


Figura 11. Gráfico BOILED-Egg muestra la permeación intestinal y cerebral de la molécula 1 (galantamina), molécula 2 (anhidrolicorina) y molécula 3 (tazetina). Cuando una molécula tiene permeabilidad cerebral y gastrointestinal el punto se ubica dentro del círculo amarillo, si el punto se ubica dentro del ovalo blanco significa que hay permeabilidad gastrointestinal.

Al someter a los alcaloides al método de predicción de BOILED-Egg tanto el grupo control como la Anhidrolicorina presentaron permeabilidad cerebral y gastrointestinal, mientras que la tazetina solamente permeabilidad gastrointestinal (Figura 11), lo que condiciona al ligante como fármaco anti-Alzheimer, ya que es crucial que los compuestos nuevos que se usen para la patología atraviesen la barrera hematocefálica, no obstante se puede usar este compuesto para hacer análisis de su estructura y plantear un compuesto híbrido que permita el acceso al cerebro. Por otro lado la anhidrolicorina presentó las mismas características de permeabilidad cerebral, gastrointestinal que la galantamina, un medicamento ya aprobado para la enfermedad de Alzheimer, además de presentar una toxicidad menor al grupo control, lo cual da indicios de que este compuesto es un gran candidato.

8. CONCLUSIONES

- Por las interacciones dadas al hacer un acoplamiento molecular *in Silico* de las proteínas rhAChE y rhBChE con los alcaloides tazzetina, anhidrolicorina, junto con la comparación de potenciales de inhibición con el control positivo se puede deducir que la anhidrolicorina, compuesto presente en *C. subedentata* es el metabolito de mayor potencial farmacológico para la enfermedad de Alzheimer
- El acoplamiento específico en la región de las gargantas de unión de las enzimas rhAChE y rhBChE con los alcaloides proporcionó información sobre las características de inhibición con una alta afinidad de unión, lo cual es importante para posibles evaluaciones biofísicas y biológicas, así como la posibilidad de generar compuestos híbridos que mejoren aún más el potencial de inhibición.
- Los alcaloides evaluados tienen amplia viabilidad terapéutica, puesto que no presentan una alta toxicidad, ni tampoco representan carcinogenicidad, mutagenicidad y citotoxicidad. Además anhidrolicorina presenta permeabilidad cerebral y gastrointestinal, al igual que el grupo control, asimismo este alcaloide tiene el mayor potencial de inhibición para rhAChE (-8,80) por lo que es el alcaloide con mayor viabilidad farmacológica.
- Con este trabajo se esclarece una parte del potencial biológico y farmacológico de *Caliphruria subedentata* y el papel en la formulación de fármacos anti-Alzheimer y otras enfermedades asociadas a la desregulación colinérgica por su amplia gama de fitoconstituyentes secundarios con actividad biológica positiva.

BIBLIOGRAFIA

(2016). "Article retraction. Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Amano N. Comparison of non-vertebral fracture between minodronate and risedronate therapy in elderly female patients with Alzheimer disease. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2013;13:346-52." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 16(3): 264.

(2018). "Is cerebral glucose metabolism related to blood-brain barrier dysfunction and intrathecal IgG synthesis in Alzheimer disease? A 18F-FDG PET/CT study: Erratum." *Medicine (Baltimore)* 97(1): e9592.

Abad, S., C. Ramon, D. Pubill, J. Camarasa, A. Camins and E. Escubedo (2016). "Adolescent exposure to MDMA induces dopaminergic toxicity in substantia nigra and potentiates the amyloid plaque deposition in the striatum of APP^{swe}/PS1^{dE9} mice." *Biochim Biophys Acta* 1862(9): 1815-1826.

Acosta, C., R. Álvarez, L. Bonilla and C. Tovar (1996). Evaluación del efecto citotóxico bloqueador del ciclo genotóxico y clastogénico del extracto crudo del "Lirio Pequeño" (*Caliphurria subedentata*), Tesis de Pregrado, Departamento de Biología, Universidad del Cauca. Popayán, Colombia.

Agunloye, O. M. and G. Oboh (2017). "Modulatory effect of caffeic acid on cholinesterases inhibitory properties of donepezil." *J Complement Integr Med* 15(1).

Alford, S., D. Patel, N. Perakakis and C. Mantzoros (2018). "Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence." *Obesity Reviews* 19(2): 269-280.

Alpizar-Quesada, C. L. and C. Morales-Alpizar (2003). "La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa." *Acta Médica Costarricense* 45(2): 50-56.

Álvarez-Holguín, A., C. R. Morales-Nieto, C. H. Avendaño-Arrazate, R. Corrales-Lerma, F. Villarreal-Guerrero, E. Santellano-Estrada and Y. Gómez-Simuta (2019). "Dosis letal media (DL50) y reducción de crecimiento (GR50) por irradiación gamma en pasto garrapata (*Eragrostis superba*)." *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 10(1).

Allen, W. J., B. C. Fochtman, T. E. Balius and R. C. Rizzo (2017). "Customizable de novo design strategies for DOCK: Application to HIVgp41 and other therapeutic targets." *Journal of computational chemistry* 38(30): 2641-2663.

Anand, P. and B. Singh (2013). "A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease." *Archives of pharmacal research* 36(4): 375-399.

Apostolova, L. G. (2016). "Alzheimer Disease." *Continuum (Minneapolis, Minn)* 22(2 Dementia): 419-434.

Aranda, M. and A. Calabria (2019). "Impacto económico-social de la enfermedad de Alzheimer." *Neurología Argentina* 11(1): 19-26.

Arlt, S., C. Demiralay, B. Tharun, O. Geisel, N. Storm, M. Eichenlaub, J. T. Lehmbeck, K. Wiedemann, B. Leuenberger and H. Jahn (2013). "Genetic risk factors for depression in Alzheimer`s disease patients." Curr Alzheimer Res **10**(1): 72-81.

Association, A. s. (2017). "2017 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimer's & Dementia **13**(4): 325-373.

Awale, M. and J.-L. Reymond (2017). "The polypharmacology browser: a web-based multi-fingerprint target prediction tool using ChEMBL bioactivity data." Journal of cheminformatics **9**(1): 11.

Baba, N. and E. Akaho (2011). "VSDK: Virtual screening of small molecules using AutoDock Vina on Windows platform." Bioinformatics **6**(10): 387.

Banerjee, P., A. O. Eckert, A. K. Schrey and R. Preissner (2018). "ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals." Nucleic acids research **46**(W1): W257-W263.

Beddell, C., P. Goodford, F. Norrington, S. Wilkinson and R. Wootton (1976). "Compounds designed to fit a site of known structure in human haemoglobin." British journal of pharmacology **57**(2): 201-209.

Blundell, T., G. Dodson, D. Hodgkin and D. Mercola (1972). Insulin: The Structure in the Crystal and its Reflection in Chemistry and Biology by. Advances in protein chemistry, Elsevier. **26**: 279-402.

Brenke, R., D. Kozakov, G.-Y. Chuang, D. Beglov, D. Hall, M. R. Landon, C. Mattos and S. Vajda (2009). "Fragment-based identification of druggable 'hot spots' of proteins using Fourier domain correlation techniques." Bioinformatics **25**(5): 621-627.

Brünger, A. T., J. Kuriyan and M. Karplus (1987). "Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics." Science **235**(4787): 458-460.

Burley, S. K. (2019). "Rcsb Protein Data Bank: Sustaining a Living Digital Data Resource that Enables Breakthroughs in Scientific Research and Biomedical Education." Biophysical Journal **116**(3): 329a.

Cabezas, F., J. Argoti, S. Martinez, C. Codina, J. Bastida and F. Viladomat (2007). "Alcaloides y actividad biológica en Eucharis amazonica, E. grandiflora, Caliphruria subdentata y Crinum kunthianum, especies colombianas de Amaryllidaceae." Scientia et technica **1**(33).

Cabezas, F., N. Pigni, J. Bastida, C. Codina and F. Viladomat (2013). "Análisis del contenido alcaloidico de Caliphruria Subdentata Baker (Amaryllidaceae) por el método CG-EM." Revista latinoamericana de química **41**(1): 68-73.

Cahlíková, L., K. Macáková, S. Zavadil, P. Jiroš, L. Opletal, K. Urbanová and L. Jahodář (2011). "Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from Chlidanthus fragrans by GC-MS and their cholinesterase activity." Natural product communications **6**(5): 1934578X1100600506.

Carrasco Ruiz, A. F. (2017). Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de Crinum x amabile, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Castellani, R. J. and G. Perry (2012). "Pathogenesis and disease-modifying therapy in Alzheimer's disease: the flat line of progress." Archives of medical research **43**(8): 694-698.

Castillo-Ordóñez, W. O., E. R. Tamarozzi, G. M. da Silva, A. F. Aristizabal-Pachon, E. T. Sakamoto-Hojo, C. S. Takahashi and S. Giuliatti (2017). "Exploration of the Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Alkaloids from Amaryllidaceae Family by Molecular Docking In Silico." Neurochem Res **42**(10): 2826-2830.

Castillo-Ordóñez, W. O., E. R. Tamarozzi, G. M. Da Silva, A. F. Aristizabal-Pachón, E. T. Sakamoto-Hojo, C. S. Takahashi and S. Giuliatti (2017). "Exploration of the acetylcholinesterase inhibitory activity of some alkaloids from amaryllidaceae family by molecular docking in silico." Neurochemical research **42**(10): 2826-2830.

Castillo, W. O., A. F. Aristizabal-Pachon and C. Takahashi (2016). "Amaryllidaceae perspectives in AlzheimerS disease." IOSR J Pharm **6**: 27-33.

Castro, J., K. Romero, O. Flórez and L. H. S. Rodríguez (2016). "Efecto de las variantes genéticas sobre los parámetros enzimáticos de la butirilcolinesterasa humana." Revista Facultad de Ciencias de la Salud UDES **3**(1. S1): 31.

Cavdar, H., M. Senturk, M. Guney, S. Durdagi, G. Kayik, C. T. Supuran and D. Ekinici (2019). "Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with uracil derivatives: kinetic and computational studies." Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry **34**(1): 429-437.

Cimmino, A., M. Masi, M. Evidente, S. Superchi and A. Evidente (2017). "Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity." Chirality **29**(9): 486-499.

Cole, J. C., C. W. Murray, J. W. M. Nissink, R. D. Taylor and R. Taylor (2005). "Comparing protein–ligand docking programs is difficult." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **60**(3): 325-332.

Cortes, N., K. Sierra, F. Alzate, E. H. Osorio and E. Osorio (2018). "Alkaloids of Amaryllidaceae as Inhibitors of Cholinesterases (AChEs and BChEs): An Integrated Bioguided Study." Phytochemical analysis **29**(2): 217-227.

Cummings, M. D., A. C. Maxwell and R. L. DesJarlais (2007). "Processing of small molecule databases for automated docking." Medicinal Chemistry **3**(1): 107-113.

Chedik, L., D. Mias-Lucquin, A. Bruyere and O. Fardel (2017). "In silico prediction for intestinal absorption and brain penetration of chemical pesticides in humans." International journal of environmental research and public health **14**(7): 708.

Cheung, J., M. J. Rudolph, F. Burshteyn, M. S. Cassidy, E. N. Gary, J. Love, M. C. Franklin and J. J. Height (2012). "Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands." Journal of medicinal chemistry **55**(22): 10282-10286.

D'Souza, G. X. and H. J. Waldvogel (2016). "Targeting the Cholinergic System to Develop a Novel Therapy for Huntington's Disease." J Huntingtons Dis **5**(4): 333-342.

Daina, A., O. Michielin and V. Zoete (2017). "SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules." Scientific reports **7**: 42717.

Darvesh, S., D. A. Hopkins and C. Geula (2003). "Neurobiology of butyrylcholinesterase." Nature Reviews Neuroscience **4**(2): 131.

Dasari, R., L. M. Y. Banuls, M. Masi, S. C. Pelly, V. Mathieu, I. R. Green, W. A. van Otterlo, A. Evidente, R. Kiss and A. Kornienko (2014). "C1, C2-ether derivatives of the Amaryllidaceae alkaloid lycorine: Retention of activity of highly lipophilic analogues against cancer cells." Bioorganic & medicinal chemistry letters **24**(3): 923-927.

Dashti, H., J. R. Wedell, W. M. Westler, J. L. Markley and H. R. Eghbalnia (2019). "Automated evaluation of consistency within the PubChem Compound database." Scientific data **6**.

DeLano, W. L. (2002). "Pymol: An open-source molecular graphics tool." CCP4 Newsletter On Protein Crystallography **40**(1): 82-92.

Di Muzio, E., D. Toti and F. Polticelli (2017). "DockingApp: a user friendly interface for facilitated docking simulations with AutoDock Vina." Journal of computer-aided molecular design **31**(2): 213-218.

Dobarro, M. (2015). "Efectos del propranolol sobre deterioro cognitivo y las patologías Amiloide y Tau en distintos modelos experimentales de enfermedad de Alzheimer."

dos Santos, T. C., T. M. Gomes, B. A. S. Pinto, A. L. Camara and A. M. de Andrade Paes (2018). "Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy." Frontiers in pharmacology **9**.

Douchamps, V. and C. Mathis (2017). "A second wind for the cholinergic system in Alzheimer's therapy." Behav Pharmacol **28**(2 and 3-Spec Issue): 112-123.

Drenth, J. (2007). Principles of protein X-ray crystallography, Springer Science & Business Media.

Drwal, M. N., P. Banerjee, M. Dunkel, M. R. Wettig and R. Preissner (2014). "ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity." Nucleic acids research **42**(W1): W53-W58.

Dubois, B., H. Hampel, H. H. Feldman, P. Scheltens, P. Aisen, S. Andrieu, H. Bakardjian, H. Benali, L. Bertram and K. Blennow (2016). "Preclinical Alzheimer's disease: definition, natural history, and diagnostic criteria." Alzheimer's & Dementia **12**(3): 292-323.

Fabiani, C., A. P. Murray, J. Corradi and S. S. Antollini (2018). "A novel pharmacological activity of caffeine in the cholinergic system." Neuropharmacology **135**: 464-473.

- Felsenstein, K. M., K. M. Candelario, D. A. Steindler and D. R. Borchelt (2014). "Regenerative medicine in Alzheimer's disease." Translational Research **163**(4): 432-438.
- Ferri, C. P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie and Y. Huang (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." The lancet **366**(9503): 2112-2117.
- Folch, J., M. Ettcheto, D. Petrov, S. Abad, I. Pedrós, M. Marin, J. Olloquequi and A. Camins (2015). "Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína β -amiloide." Neurología.
- Forli, S., R. Huey, M. E. Pique, M. F. Sanner, D. S. Goodsell and A. J. Olson (2016). "Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite." Nature protocols **11**(5): 905.
- Fuentes, P. (2003). "Enfermedad de Alzheimer: una nota histórica." Revista chilena de neuro-psiquiatría **41**: 9-12.
- Glaab, E. (2015). "Building a virtual ligand screening pipeline using free software: a survey." Briefings in Bioinformatics **17**(2): 352-366.
- Grande, F., B. Rizzuti, M. A. Occhiuzzi, G. Ioele, T. Casacchia, F. Gelmini, R. Guzzi, A. Garofalo and G. Statti (2018). "Identification by Molecular Docking of Homoisoflavones from *Leopoldia comosa* as Ligands of Estrogen Receptors." Molecules **23**(4).
- Granillo Sanmartin, M. F. (2017). "Influencia de factores genéticos y ambientales en la aparición de la enfermedad de alzheimer."
- Gray, J. J., S. Moughon, C. Wang, O. Schueler-Furman, B. Kuhlman, C. A. Rohl and D. Baker (2003). "Protein–protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations." Journal of molecular biology **331**(1): 281-299.
- Guisande, C., A. Vaamonde and A. Barreiro (2014). "RWizard Software, Package 'StatR' version 1.0 University of Vigo. Spain." Recuperado de: <http://www.ipez.es/RWizard>.
- Hampel, H., M.-M. Mesulam, A. C. Cuello, A. S. Khachaturian, A. Vergallo, M. Farlow, P. Snyder, E. Giacobini, Z. Khachaturian and C. S. W. Group (2019). "Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: emerging evidence from translational and clinical research." The journal of prevention of Alzheimer's disease: 1-14.
- Hanwell, M. D., D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek and G. R. Hutchison (2012). "Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform." Journal of cheminformatics **4**(1): 17.
- Harris, R. E. (2019). Epidemiology of chronic disease: global perspectives, Jones & Bartlett Publishers.
- Hernández Fontán, A. (2019). "Alzheimer de origen metabólico."

Herrera-Rivero, M., M. E. Hernández-Aguilar, J. Manzo and G. E. Aranda-Abreu (2010). "Enfermedad de Alzheimer: inmunidad y diagnóstico." Revista de neurología **51**(3): 153-164.

Hogan, K. J. (2013). "Hereditary vulnerabilities to post-operative cognitive dysfunction and dementia." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **47**: 128-134.

Hoie, E. (2019). "Alzheimer's Disease: Current Treatments and Potential New Agents." US Pharm **44**(1): 20-23.

Howard, R., R. McShane, J. Lindesay, C. Ritchie, A. Baldwin, R. Barber, A. Burns, T. Dening, D. Findlay and C. Holmes (2012). "Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease." New England Journal of Medicine **366**(10): 893-903.

Hyde, C., J. Peters, M. Bond, G. Rogers, M. Hoyle, R. Anderson, M. Jeffreys, S. Davis, P. Thokala and T. Moxham (2012). "Evolution of the evidence on the effectiveness and cost-effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: systematic review and economic model." Age and ageing **42**(1): 14-20.

Ibrar, A., A. Khan, M. Ali, R. Sarwar, S. Mehsud, U. Farooq, S. M. A. Halimi, I. Khan and A. Al-Harrasi (2018). "Combined in Vitro and in Silico Studies for the Anticholinesterase Activity and Pharmacokinetics of Coumarinyl Thiazoles and Oxadiazoles." Front Chem **6**: 61.

Irwin, B. K. S. S. L. M. B. W. J. J. (2002). "lead discovery using molecular docking."

Jenkins, J. L., A. Bender and J. W. Davies (2006). "In silico target fishing: Predicting biological targets from chemical structure." Drug Discovery Today: Technologies **3**(4): 413-421.

Jentoft, A. C. and B. Hernández (2014). "Manejo terapéutico con rivastigmina en pacientes con enfermedad de Alzheimer de leve a moderadamente grave en condiciones de práctica clínica habitual. Estudio ENTERPRISE." Neurologia **29**(1): 1-10.

Jiang, Y. and H. Gao (2019). "Pharmacophore-based drug design for the identification of novel butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease." Phytomedicine **54**: 278-290.

Jindal, G., K. Slanska, V. Kolev, J. Damborsky, Z. Prokop and A. Warshel (2019). "Exploring the challenges of computational enzyme design by rebuilding the active site of a dehalogenase." Proceedings of the National Academy of Sciences **116**(2): 389-394.

Johnson, G. T., L. Autin, D. S. Goodsell, M. F. Sanner and A. J. Olson (2011). "ePMV embeds molecular modeling into professional animation software environments." Structure **19**(3): 293-303.

Katsamakos, S. and D. Hadjipavlou-Litina (2019). "Computational Design of Multitarget Drugs Against Alzheimer's Disease." Multi-Target Drug Design Using Chem-Bioinformatic Approaches: 203-253.

Keiser, M. J., B. L. Roth, B. N. Armbruster, P. Ernsberger, J. J. Irwin and B. K. Shoichet (2007). "Relating protein pharmacology by ligand chemistry." Nature biotechnology **25**(2): 197.

Kilgore, M. B., M. M. Augustin, G. D. May, J. A. Crow and T. M. Kutchan (2016). "CYP96T1 of *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus* Catalyzes Formation of the Para-Para'CC Phenol Couple in the Amaryllidaceae Alkaloids." Frontiers in plant science **7**: 225.

Kim, S., P. A. Thiessen, E. E. Bolton, J. Chen, G. Fu, A. Gindulyte, L. Han, J. He, S. He and B. A. Shoemaker (2015). "PubChem substance and compound databases." Nucleic acids research **44**(D1): D1202-D1213.

Koellner, G., G. Kryger, C. B. Millard, I. Silman, J. L. Sussman and T. Steiner (2000). "Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*1." Journal of molecular biology **296**(2): 713-735.

Konrath, E. L., C. d. S. Passos, L. C. Klein-Júnior and A. T. Henriques (2013). "Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease." Journal of Pharmacy and Pharmacology **65**(12): 1701-1725.

Koola, M. M., S. K. Praharaj and A. Pillai (2019). "Galantamine-Memantine Combination as an Antioxidant Treatment for Schizophrenia." Current Behavioral Neuroscience Reports: 1-14.

Kozakov, D., L. E. Grove, D. R. Hall, T. Bohnuud, S. E. Mottarella, L. Luo, B. Xia, D. Beglov and S. Vajda (2015). "The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins." Nature protocols **10**(5): 733.

Kucukoglu, K., H. I. Gul, P. Taslimi, I. Gulcin and C. T. Supuran (2019). "Investigation of inhibitory properties of some hydrazone compounds on hCA I, hCA II and AChE enzymes." Bioorganic chemistry **86**: 316-321.

Kumar, A. and A. Singh (2015). "A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update." Pharmacological Reports **67**(2): 195-203.

LaFerla, F. M. and K. N. Green (2012). "Animal models of Alzheimer disease." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **2**(11): a006320.

Lawrence, A. D. and B. J. Sahakian (1995). "Alzheimer disease, attention, and the cholinergic system." Alzheimer Dis Assoc Disord **9 Suppl 2**: 43-49.

Liu, X., Y. Xu, S. Li, Y. Wang, J. Peng, C. Luo, X. Luo, M. Zheng, K. Chen and H. Jiang (2014). "In Silico target fishing: addressing a "Big Data" problem by ligand-based similarity rankings with data fusion." Journal of cheminformatics **6**(1): 33.

López Locanto, Ó. (2015). "Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias." Archivos de Medicina Interna **37**(2): 61-67.

Luna Origgi, D. O. (2015). "Comparación de marcadores de estrés oxidativo, actividad de acetilcolinesterasa y monoamino oxidasa en suero y puntajes de ansiedad, depresión y

calidad de vida en mujeres post-menopáusicas con tratamiento de reemplazo hormonal alternativo (Warmi® y Soya) y sintético (tibolona)."

Lüthy, R., J. U. Bowie and D. Eisenberg (1992). "Assessment of protein models with three-dimensional profiles." Nature **356**(6364): 83.

Maccioni, C., M. E. Arzola, L. Mujica and R. Maccioni (2003). "Nuevos paradigmas en el estudio de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer." Revista chilena de neuro-psiquiatría **41**: 33-46.

Maccioni, R. (2008). "Nuevas Avenidas hacia el diagnóstico y tratamiento de los desórdenes cognitivos: enfermedad de Alzheimer." Medwave **8**(11).

Maccioni, R. B., G. Farías, I. Morales and L. Navarrete (2010). "The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease." Archives of medical research **41**(3): 226-231.

Manzano-Rincón, Y., J. M. Castillo-Cabellos, C. A. Gualdrón-Frias and L. S. Vega-Useche (2018). "Deficiencia de butirilcolinesterasa identificada después de la administración de succinilcolina. Reporte del caso." Iatreia **31**(1): 97-102.

Marco-Contelles, J., M. do Carmo Carreiras, C. Rodríguez, M. Villarroya and A. G. Garcia (2006). "Synthesis and pharmacology of galantamine." Chemical reviews **106**(1): 116-133.

Masi, M., S. Gunawardana, M. van Rensburg, P. James, J. Mochel, P. Heliso, A. Albalawi, A. Cimmino, W. van Otterlo and A. Kornienko (2019). "Alkaloids isolated from *Haemanthus humilis* Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: Anticancer activity of coccinine and montanine." South African Journal of Botany.

Maté, C. F. (2017). MODELADO MOLECULAR COMO HERRAMIENTA PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS QUE INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE.

Medina-Franco, J. L. (2013). "Advances in computational approaches for drug discovery based on natural products." Revista latinoamericana de química **41**(2): 95-110.

Melo-Santos, G., A. L. F. Rodrigues, I. Ramos-Santos, A. M. Andrade, D. L. Arcoverde, L. Sena and M. L. da Silva (2019). "Interactions between children, teenagers and botos (*Inia araguaiaensis* and *Inia geoffrensis*) in markets and fairs of Eastern Amazon." Ocean & Coastal Management **172**: 137-145.

Meng, E. C., B. K. Shoichet and I. D. Kuntz (1992). "Automated docking with grid-based energy evaluation." Journal of computational chemistry **13**(4): 505-524.

Miksatkova, P., P. Lankova, L. Huml and O. Lapcik (2014). "Isoflavonoids in the Amaryllidaceae family." Nat Prod Res **28**(10): 690-697.

Morales, C., M. Pérez and M. Fuenzalida (2015). "Papel de la transmisión gabaérgica en la fisiopatología de la esquizofrenia." Rev. Farmacol. Chile, **8** (1), **26-34**.

- Morales, I., L. Arata and R. B. Maccioni (2015). "La teoría de la neuroinmunomodulación en enfermedades neurodegenerativas: nuevas evidencias científicas." Revista chilena de neuro-psiquiatría **53**(1): 53-58.
- Morelli, L. (2016). "La contribución de la hipótesis amiloide a la comprensión de la enfermedad de Alzheimer: una visión crítica." Química Viva **15**(1): 7-12.
- Morris, G. M., D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew and A. J. Olson (1998). "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function." Journal of computational chemistry **19**(14): 1639-1662.
- Musyoka, T. M., A. M. Kanzi, K. A. Lobb and Ö. T. Bishop (2016). "Structure based docking and molecular dynamic studies of plasmodial cysteine proteases against a South African natural compound and its analogs." Scientific reports **6**: 23690.
- Nair, J. J. and J. van Staden (2012). "Acetylcholinesterase inhibition within the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids." Nat Prod Commun **7**(7): 959-962.
- Nair, J. J. and J. van Staden (2019). "Antiplasmodial Lycorane Alkaloid Principles of the Plant Family Amaryllidaceae." Planta medica.
- Ngamelue, M. N., K. Homma, O. Lockridge and O. A. Asojo (2007). "Crystallization and X-ray structure of full-length recombinant human butyrylcholinesterase." Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications **63**(9): 723-727.
- Ngan, C.-H., D. R. Hall, B. Zerbe, L. E. Grove, D. Kozakov and S. Vajda (2011). "FTSite: high accuracy detection of ligand binding sites on unbound protein structures." Bioinformatics **28**(2): 286-287.
- O'Boyle, N. M., M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch and G. R. Hutchison (2011). "Open Babel: An open chemical toolbox." Journal of cheminformatics **3**(1): 33.
- O'Boyle, N. M., C. Morley and G. R. Hutchison (2008). "Pybel: a Python wrapper for the OpenBabel cheminformatics toolkit." Chemistry Central Journal **2**(1): 5.
- Orta-Salazar, E., C. Cuellar-Lemus, S. Díaz-Cintra and A. Feria-Velasco (2014). "Marcaje colinérgico en la corteza cerebral y el hipocampo en algunas especies animales y su relación con la enfermedad de Alzheimer." Neurología **29**(8): 497-503.
- ÖZDEMİR, Z., A.-B. ÖZÇELİK and M. UYSAL (2019). "Approaches Based on Cholinergic Hypothesis and Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease." Frontiers in Clinical Drug Research-Alzheimer Disorders: Volume 8 **8**: 154.
- Pacheco Tandazo, V., P. Carrera Burneo and K. Almeida Ferri (2011). "Propuesta metodológica para la evaluación de la factibilidad de proyectos de turismo comunitario. Caso de estudio: Comunidades Huaorani, Achuar y Shiwiar de la Amazonia Ecuatoriana." Gestión turística(15).

Pellegrino, S., M. Meyer, C. Zorbas, S. A. Bouchta, K. Saraf, S. C. Pelly, G. Yusupova, A. Evidente, V. Mathieu, A. Kornienko, D. L. J. Lafontaine and M. Yusupov (2018). "The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth." Structure **26**(3): 416-425 e414.

Peters, J., M. Trovaslet, M. Trapp, F. Nachon, F. Hill, E. Royer, F. Gabel, L. van Eijck, P. Masson and M. Tehei (2012). "Activity and molecular dynamics relationship within the family of human cholinesterases." Phys Chem Chem Phys **14**(19): 6764-6770.

Pochini, L., M. Scalise, M. Galluccio and C. Indiveri (2012). "Regulation by physiological cations of acetylcholine transport mediated by human OCTN1 (SLC22A4). Implications in the non-neuronal cholinergic system." Life Sci **91**(21-22): 1013-1016.

Polgár, L. (2005). "The catalytic triad of serine peptidases." Cellular and molecular life sciences CMLS **62**(19-20): 2161-2172.

Prince, M., A. Wimo, M. Guerchet, G. Ali, Y. Wu and M. Prina (2017). "World Alzheimer Report 2015—The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. 2015." London, Alzheimer's Disease International (ADI).

Rainer, M. and H. A. M. Mucke (2019). "Management of Alzheimer's disease." Hamdan Medical Journal **12**(2): 37.

Reyes, R. V., Y. Tirado and V. Valdiris (2016). "Estudio y análisis comparativo de interacciones entre la proteína integrina con fragmentos de la proteína fibrilina-1 y fragmentos mutados de esta utilizando la metodología de docking molecular." Salud Uninorte **32**(3).

Richardson, J. R., D. German and A. Levey (2014). "Alzheimer disease risk factors." JAMA Neurol **71**(8): 1051.

Robinson, M., B. Y. Lee and Z. Leonenko (2017). "Drugs and Drug Delivery Systems Targeting Amyloid- β in Alzheimers Disease." arXiv preprint arXiv:1704.08313.

Rodríguez, J. L. and R. F. G. Herrera (2014). "Dementias and Alzheimer's disease in Latin America and the Caribbean." Revista Cubana de Salud Pública **40**(3): 378-387.

Saldívar-González, F., F. D. Prieto-Martínez and J. L. Medina-Franco (2017). "Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional." Educación química **28**(1): 51-58.

Samanta, M. K., B. Wilson, K. Santhi, K. S. Kumar and B. Suresh (2006). "Alzheimer disease and its management: a review." American journal of therapeutics **13**(6): 516-526.

Sofowora, A., E. Ogunbodede and A. Onayade (2013). "The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention." African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines **10**(5): 210-229.

Sulimov, V. B., D. C. Kutov and A. V. Sulimov (2019). "Advances in Docking." Current medicinal chemistry.

Sundermann, E. E., A. Biegon, L. H. Rubin, R. B. Lipton, S. Landau and P. M. Maki (2017). "Does the Female Advantage in Verbal Memory Contribute to Underestimating Alzheimer's Disease Pathology in Women versus Men?" Journal of Alzheimer's Disease **56**(3): 947-957.

Tanchuk, V. Y., V. O. Tanin, A. I. Vovk and G. Poda (2016). "A new, improved hybrid scoring function for molecular docking and scoring based on autodock and autodock vina." Chemical biology & drug design **87**(4): 618-625.

Taragano, F. E., D. M. Castro, C. M. Serrano, S. L. Heisecke, P. Pérez Lequizamón, L. Loñ and C. Dillon (2015). "Una encuesta sobre biomarcadores y diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer." Medicina (Buenos Aires) **75**(5): 282-288.

Tellechea, P., N. Pujol, P. Esteve-Belloch, B. Echeveste, M. García-Eulate, J. Arbizu and M. Riverol (2015). "Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz y de inicio tardío: ¿ son la misma entidad?" Neurología.

Torras Claveria, L., L. Tallini, F. Viladomat Meya and J. Bastida Armengol (2017). "Research in natural products: Amaryllidaceae ornamental plants as sources of bioactive compounds." Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VII, 2017, Research Signpost. Editors: Diego Muñoz-Torrero, Montserrat Riu & Carles Feliu. ISBN: 978-81-308-0573-3. Chapter 5, p. 69-82.

Usón, I. and G. M. Sheldrick (1999). "Advances in direct methods for protein crystallography." Current opinion in structural biology **9**(5): 643-648.

Valderrama, A. A. (2009). Estudio mecanocuántico, docking y dinámica molecular de tioazúcares como inhibidores de la proteína fucosidasa: algoritmos para el análisis conformacional y programa para el cálculo de constantes de acoplamiento vecinales (cal3jhh), Universidad de Granada.

Vásquez, M. R. S. and M. J. L. Salinas (2015). "Estudio exomorfológico y fitoquímico de los bulbos de dos especies endémicas del Perú de la familia Amaryllidaceae." Arnaldoa **22**(1): 269-288.

Wimo, A., L. Jönsson, J. Bond, M. Prince, B. Winblad and A. D. International (2013). "The worldwide economic impact of dementia 2010." Alzheimer's & Dementia **9**(1): 1-11. e13.

Wong, S. E. and F. C. Lightstone (2011). "Accounting for water molecules in drug design." Expert opinion on drug discovery **6**(1): 65-74.

Yu, Z., S. Wu, W. Zhao, L. Ding, Y. Fan, D. Shiuan, J. Liu and F. Chen (2018). "Anti-Alzheimers activity and molecular mechanism of albumin-derived peptides against AChE and BChE." Food & function **9**(2): 1173-1178.

Yuriev, E. and P. A. Ramsland (2013). "Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review." Journal of Molecular Recognition **26**(5): 215-239.

Zhan, G., J. Liu, J. Zhou, B. Sun, H. A. Aisa and G. Yao (2017). "Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors." European journal of medicinal chemistry **127**: 771-780.