

Búsqueda de nutraceuticos para la prevención y tratamiento del Alzheimer

Rita C. Ortega Vallbona

Máster Universitario en Bioinformática y Bioestadística
Bioinformática farmacéutica

Consultor: Melchor Sanchez Martinez

Profesor responsable de la asignatura: Marc Meceira Duch

Fecha entrega: 5 de enero de 2021



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Búsqueda de nutraceuticos para la prevención y tratamiento del Alzheimer</i>
Nombre del autor:	<i>Rita C. Ortega Vallbona</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Melchor Sanchez Martinez</i>
Nombre del PRA:	<i>Marc Maceira Duch</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	01/2021
Titulación:	<i>Máster Universitario en Bioinformática y Bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Bioinformática farmacéutica</i>
Idioma del trabajo:	<i>Castellano</i>
Palabras clave	<i>Structure-based virtual screening, flavonols, Alzheimer</i>
<p>Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.</i></p>	
<p>La enfermedad de Alzheimer es de las enfermedades neurodegenerativas más comunes en personas de edad avanzada, para la cual no existe tratamiento. En este trabajo se pretende encontrar nutraceuticos que sirvan para prevenir o tratar esta enfermedad.</p> <p>Para ello, se ha recopilado una base de datos de flavonoles, que son un subgrupo de flavonoides (polifenoles) muy común en productos de origen vegetal y que presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Por otra parte, se ha elegido la 5-lipoxigenasa (5-LOX), una enzima implicada en varios mecanismos relacionados con el Alzheimer, como diana terapéutica con la que trabajar, y se ha recopilado información sobre sus inhibidores conocidos.</p> <p>Con esto, se ha seguido una estrategia parecida a la del diseño de fármacos por estructura. Mediante docking con 5-LOX de los inhibidores y de los flavonoles, se han comparado las interacciones resultantes, para elegir aquellos flavonoles que interactuaran con 5-LOX de forma similar a los inhibidores. La hipótesis es que cuantas más interacciones tenga un compuesto en común con los inhibidores conocidos, más probable es que se comporte como inhibidor.</p> <p>Los 9 flavonoles elegidos en la comparación de interacciones se sometieron a un análisis ADMET (Absorción, Difusión, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) para determinar cuál sería la mejor opción de tratamiento. Finalmente se eligió el flavonol natural kaempferol como candidato con el que realizar futuros ensayos.</p>	

Abstract (in English, 250 words or less):

Alzheimer's disease is one of the most common neurodegenerative diseases in elderly people, for which there is no treatment. This work aims to find nutraceuticals that serve to prevent or treat this disease.

To this end, a database of flavonols has been compiled. Flavonols are a subgroup of flavonoids (polyphenols) which occur abundantly in plant products and are associated with antioxidant and anti-inflammatory properties. On the other hand, 5-lipoxygenase (5-LOX), an enzyme that has a role in several mechanisms involved in Alzheimer's disease, has been chosen as the therapeutic target to work with, and information has been compiled on its known inhibitors.

After this, a strategy like structure-based drug design has been followed. After docking flavonols and inhibitors to 5-LOX, the resulting interactions have been compared to choose those flavonols that interact with 5-LOX like inhibitors do. The hypothesis is that the more interactions a compound has in common with known inhibitors, the more likely it is to behave as an inhibitor.

The 9 flavonols chosen in the interaction comparison were subjected to an ADMET analysis (Absorption, Diffusion, Metabolism, Excretion and Toxicity) to determine which would be the best treatment option. Finally, the natural flavonol kaempferol was chosen as a candidate with which to carry out future tests.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Contexto y justificación del Trabajo	1
1.2 Objetivos del Trabajo	2
1.3 Enfoque y método seguido	2
1.4 Planificación del Trabajo	4
1.5 Breve resumen de productos obtenidos	6
1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria	7
2. La enfermedad de Alzheimer: breve introducción	8
2.1 Dianas terapéuticas del Alzheimer	9
2.2 La enzima 5-lipoxigenasa	14
3. Nutraceuticos	17
3.1 Los flavonoles	18
4. Métodos	20
4.1 Elección del target	20
4.2 Inhibidores conocidos de 5-LOX	21
4.3 Base de datos de flavonoles	24
4.4 Docking	27
4.5 Estudio de las interacciones	32
4.6 Estudio de propiedades ADMET	33
5. Resultados	35
5.1 Interacciones de NDGA cristalizado y NDGA en el docking	35
5.2 Interacciones de los inhibidores conocidos de 5-LOX	37
5.3 Interacciones de los flavonoles	39
5.4 Flavonoles para ADMET	43
5.5 Resultados del análisis ADMET	45
5.5.1 Propiedades moleculares de pkCSM	45
5.5.2 Absorción	46
5.5.3 Distribución	47
5.5.4 Metabolismo	48
5.5.5 Excreción	50
5.5.6 Toxicidad	50
5.6 Selección final de flavonoles	53
6. Conclusiones	56
6.1 Conclusiones del trabajo	56
6.2 Logro de los objetivos	56
6.3 Seguimiento de la planificación y metodología	57
6.4 Perspectivas futuras	57
7. Glosario	59
8. Bibliografía	61
9. Anexo	68

Lista de figuras

Figura 1. Pasos en el descubrimiento de fármacos. Extraído de Sliwoski et al., 2014	2
Figura 2. Diagrama de Gantt de las tareas del trabajo	6
Figura 3. El sistema de los leucotrienos. Adaptado de Michael et al. 2019	15
Figura 4. Estructura básica de un flavonol	18
Figura 5. 5-LOX. PDB ID: 3O8Y.	21
Figura 6. Estructuras 2D de AKBA y NDGA	27
Figura 7. Estructuras cristalizadas de 5-LOX con dos inhibidores. Izq: en azul AKBA en 6NCF. Dcha: en magenta NDGA en 6N2W	28
Figura 8. NDGA en la estructura cristalizada situado en el sitio activo de 5-LOX.	28
Figura 9. Posiciones NDGA: (A)Cristalizado en 6N2W. (B)Modelo 1 docking. (C)Modelo 2 docking. (D)Modelo 3 docking.	35
Figura 10. NDGA cristalizado con los aminoácidos con los que interacciona.	37
Figura 11. Inhibidores dockeados con sus interacciones (A) Puupehenone (B) Phenidone (C) ChEMBL3113612 (D) Catequina (E) Atreleuton (F) CNB-001 (G) Zileuton	38
Figura 12. Flavonoles naturales dockeados en 5-LOX. (A) Isorhamnetina (B) Kaempferol (C) Quercetina	41
Figura 13. Flavonoles seleccionados de la base de datos: (A) ID 23 (B) ID 19 (C) ID 12 (D) ID 17 (E) ID 24 (F) ID 20	43
Figura 14. Kaempferol situado en el bolsillo del sitio activo de 5-LOX	54

Lista de tablas

Tabla 1. Tareas del trabajo	5
Tabla 2. Hitos marcados para el trabajo.....	5
Tabla 3. Dianas terapéuticas en estudio para el Alzheimer	14
Tabla 4. Inhibidores conocidos de 5-LOX extraídos de la literatura.....	23
Tabla 5. Muestra de flavonoles obtenidos de la búsqueda en ZINC drug like .	24
Tabla 6. Muestra de flavonoles obtenidos en la búsqueda en ChEMBL.....	25
Tabla 7. Estructuras 2D de los flavonoles naturales.....	26
Tabla 8. Coordenadas de la caja de docking	29
Tabla 9. Inhibidores de 5-LOX seleccionados para docking	31
Tabla 10. Inhibidores de 5-LOX seleccionados para docking (continuación)...	32
Tabla 11. Propiedades ADMET que calcula pkCSM	34
Tabla 12. Interacciones NDGA cristalizado y modelos de docking	36
Tabla 13. Interacciones conservadas en los inhibidores.	39
Tabla 14. 25 flavonoles seleccionados en el virtual screening.	40
Tabla 15. Interacciones en los flavonoles naturales seleccionados.....	40
Tabla 16. Interacciones de los flavonoles seleccionados de la base de datos	42
Tabla 17. Flavonoles seleccionados para análisis ADMET	44
Tabla 18. Propiedades físico-químicas calculadas por pkCSM	45
Tabla 19. Propiedades de Absorción de los flavonoles seleccionados.....	47
Tabla 20. Propiedades de Distribución de los flavonoles seleccionados	48
Tabla 21. Propiedades de Metabolismo de los flavonoles seleccionados	49
Tabla 22. Propiedades de Excreción de los flavonoles seleccionados	50
Tabla 23. Propiedades de Toxicidad de los flavonoles seleccionados	52

1. Introducción

1.1 Contexto y justificación del Trabajo

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es un proceso costoso, arriesgado y requiere mucho tiempo. Se estima que se necesitan aproximadamente 13 años y 1.8 billones de dólares para poder llevar un nuevo fármaco al mercado [1]. Por ello, es necesario buscar técnicas alternativas para el desarrollo de fármacos. La bioinformática es el conjunto de herramientas computacionales y recursos para el almacenamiento, manejo y análisis de datos sobre compuestos, técnicas surgidas en la era post genómica [2].

Las enfermedades neurodegenerativas se encuentran entre las que se dan con más frecuencia en personas de edad avanzada y la enfermedad de Alzheimer es la más común de todas. En un mundo donde la edad media de la población es cada vez más alta, se presenta como un problema cada vez más común. Aunque se están poniendo a prueba varias estrategias para ralentizar el avance de la enfermedad, todavía no se dispone de fármacos o agentes que prevengan la progresión del Alzheimer dado que los tratamientos que se están probando a menudo se asocian con efectos adversos y todavía se desconocen sus consecuencias a largo plazo [3].

Por este motivo es necesario buscar tratamientos alternativos que resulten más seguros y que puedan aplicarse a largo plazo para retrasar el avance del Alzheimer. Los nutraceuticos, compuestos procedentes de alimentos que tienen efectos beneficiosos en la salud [4], aparecen como una opción atractiva en este contexto por su efecto preventivo. Se han realizado diversos estudios sobre los efectos protectores de algunos nutraceuticos, como los polifenoles, para prevenir enfermedades neurodegenerativas [5], pero sigue siendo necesario un estudio más profundo sobre su seguridad y eficacia.

Una manera de conocer realmente hasta qué punto un nutraceutico puede ser beneficioso para cierta patología sería adoptar una metodología de evaluación similar a la existente para los productos farmacéuticos, identificando una diana terapéutica (“*target*”) apropiada, evaluando la seguridad del nutraceutico e investigando el mecanismo de acción del compuesto [6].

En el presente trabajo se pretende utilizar las herramientas proporcionadas por los avances en el campo de la bioinformática para evaluar un conjunto de nutraceuticos en su uso para la prevención del Alzheimer, siguiendo una estrategia similar a la que se utiliza para el descubrimiento de nuevos fármacos.

1.2 Objetivos del Trabajo

Los objetivos del presente trabajo fin de máster son los siguientes:

1. Seleccionar una proteína relacionada con el Alzheimer que sirva de *target* con el que trabajar
 - a. Determinar la estructura molecular del *target*
 - b. Definir el mecanismo de acción de esta proteína en la enfermedad
 - c. Encontrar moléculas inhibidoras conocidas de esta proteína
2. Formular una hipótesis sobre qué nutracéutico sería la mejor opción preventiva
 - a. Hacer un listado de nutracéuticos con los que trabajar
 - b. Analizar la interacción de los nutracéuticos con el *target*
 - c. Comparar la interacción de los nutracéuticos con la de las moléculas inhibidoras
 - d. Clasificar los nutracéuticos según su poder de interacción con el *target*
 - e. Analizar la farmacocinética de las moléculas mejor clasificadas

1.3 Enfoque y método seguido

La intención del presente trabajo es encontrar qué nutracéutico sería ideal para prevenir la enfermedad de Alzheimer. Para ello se ha seguido una estrategia similar a la que se utiliza para descubrir nuevos fármacos. Los enfoques computacionales más utilizados para el diseño de fármacos se clasifican en: diseño de fármacos por estructura y diseño de fármacos por ligando [7].

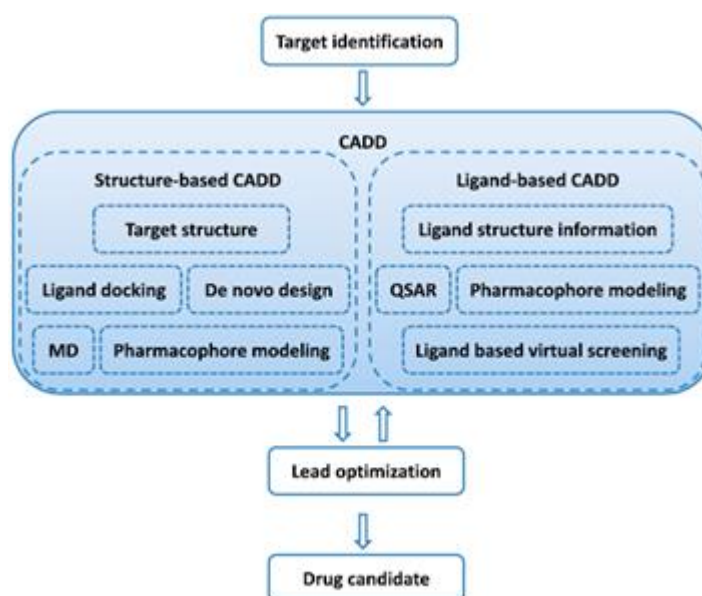


Figura 1. Pasos en el descubrimiento de fármacos. Extraído de Sliwoski et al., 2014

El diseño de fármacos por estructura se apoya en el conocimiento de la estructura de la macromolécula *target* (obtenida por cristalización, análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) o modelos computacionales por homología), mientras que el diseño de fármacos por ligando se usa en ausencia de la estructura 3D del *target* y mediante técnicas como QSAR (relación cuantitativa de estructura y actividad), modelado farmacofórico, análisis de campo molecular y evaluación de similitud 2D o 3D, puede ofrecer una visión de las interacciones entre *targets* y ligandos [2].

El número de estructuras disponibles de proteínas de interés en el descubrimiento de fármacos ha aumentado significativamente en los últimos años, estando muchas de ellas al alcance de la comunidad científica en bases de datos públicas como la Protein Data Bank. Como consecuencia, la distinción entre las estrategias de diseño de fármacos basadas en estructura o en ligando se ha difuminado. Actualmente es muy común emplear métodos de ambos enfoques en un mismo trabajo [8].

El primer paso que se llevó a cabo en este trabajo fue la búsqueda de una proteína relacionada con el Alzheimer que sirviera de *target* de interés mediante la exploración de bases de datos y la investigación bibliográfica. Una vez concretado este *target*, se determinó su estructura 3D para proceder con una dinámica de trabajo más parecida al diseño de fármacos basado en estructura.

En el presente proyecto se ha trabajado con un subgrupo de nutracéuticos ampliamente estudiado, los polifenoles, que se clasifican según su número de anillos fenol y los grupos químicos unidos a ellos [9]. Para poder realizar una búsqueda por estructura de los nutracéuticos más adecuados, primero se tuvo que construir una base de datos personalizada. Existen dos posibles estrategias para crear esta base de datos personalizada de polifenoles: descargar una base de datos ya existente de nutracéuticos de portales como DrugBank [10], Drugs.com [11], fooDB [12], PubChem [13] o ChEMBL [14], o bien seleccionar una lista de polifenoles obtenida de la literatura y utilizar SwissSimilarity [15] para encontrar moléculas similares a estos en bases de datos de compuestos químicos. En el primer caso se obtendría una lista de productos nutracéuticos, no todos polifenoles, de la que deberían eliminarse aquellos nutracéuticos que no sean polifenoles. En el segundo caso lo ideal sería eliminar de la lista los compuestos que no sean nutracéuticos.

Para acotar mejor la búsqueda, nos centramos en los flavonoles, compuestos flavonoides, englobados dentro del grupo de los polifenoles, que se encuentran muy frecuentemente en extractos de plantas y de los que se han detectado propiedades antiinflamatorias y antioxidantes [16].

También se ha creado una base de datos personalizada con los compuestos (fármacos y moléculas químicas) de los cuales se sabe que actúan como inhibidores del *target* de interés. La lista de compuestos inhibidores se ha obtenido a partir de investigación bibliográfica y, en el caso de existir en la literatura información sobre el modo de unión, se ha recopilado dicha información para su posterior análisis.

Dentro de los métodos por estructura, el más usado es el anclaje molecular entre proteína y ligando o “*docking*”, que consiste en un algoritmo informático automatizado que determina cómo un compuesto puede unirse al sitio activo del *target* (“*binding mode*”) e intenta predecir la fuerza con la que se une. Éste es el método más utilizado para investigar las interacciones ligando-proteína cuando la estructura de la proteína es conocida [8]. Existe una amplia variedad de programas para *docking* como DOCK, GOLD y FlexX [17], y también servidores web como MTiOpenScreen [18]. Por su facilidad de uso, se ha decidido utilizar MTiOpenScreen para realizar todos los *dockings* durante el trabajo.

Con los *dockings* se ha obtenido un listado de los modos de unión de los inhibidores y los flavonoles con la proteína *target*. Posteriormente se ha llevado a cabo una comparativa de estos modos de unión de los flavonoles con los de los inhibidores, la cual se ha tomado como referencia para comprobar computacionalmente que los flavonoles pueden unirse a la proteína de una forma similar a como lo hacen los compuestos inhibidores conocidos, y, por tanto, que podrían presentar una actividad similar.

Para finalizar, se llevó a cabo un análisis de las propiedades farmacocinéticas (ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) y de toxicidad de los flavonoles seleccionados mediante el uso de servidores web como pkCSM [19]. Este es un aspecto particularmente relevante, pues cualquier compuesto candidato no sólo deber tener un efecto preventivo o terapéutico, sino que es fundamental que pueda ser administrado al ser humano y llegar a ser biodisponible y actuar en el órgano/tejido/sistema celular deseado.

1.4 Planificación del Trabajo

Este trabajo se ha realizado en el primer semestre del curso 2020/21 en la Universitat Oberta de Catalunya. El semestre tuvo inicio el 16 de septiembre de 2020 y finalizará con la defensa pública de los TFM de 11 al 20 de enero de 2021. La planificación del trabajo se llevó a cabo teniendo en cuenta las fechas de presentación de las distintas Pruebas de Evaluación Continua durante el semestre.

Los recursos utilizados para realizar este trabajo han sido los siguientes:

- La estructura de la proteína se obtuvo de la base de datos **Protein Data Bank** (<https://www.rcsb.org/>) [20].
- La información sobre los inhibidores conocidos de la proteína se extrajo de la literatura científica. Sus estructuras se obtuvieron de bases de datos de compuestos químicos como:
 - **ChEMBL** (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) [21].
 - **Pubchem** (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) [13].
 - **ZINC** (<https://zinc.docking.org/>) [22].
 - **Drugs.com** (<https://www.drugs.com/>) [11].
 - **DrugBank** (<https://go.drugbank.com/>) [10].

- La información sobre los flavonoles más conocidos se extrajo de literatura científica, y sus estructuras se obtuvieron de **ChEMBL** y **ZINC**.
- La base de datos de flavonoles se construyó con estructuras de flavonoles obtenidas en **SwissSimilarity** (<http://www.swisssimilarity.ch/>) [15].
- Se modificaron los parámetros de la información estructural de las moléculas con **Open Babel** [23] y con **UCSF Chimera** [24]. Este último software se utilizó también para la visualización de las moléculas.
- Los *dockings* se realizaron con el servidor **MTiOpenScreen** (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/MTiOpenScreen/>) [18].
- La información de las interacciones se extrajo con el servidor **PLIP** (Protein-Ligand Interaction Profiler) (<https://projects.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/>) [25].
- La información sobre las interacciones de los ligandos con la proteína se estudió utilizando **R** [26] en RStudio.
- La información ADMET de los flavonoles se obtuvo con el servidor **pkCSM** (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>) [19].
- Los scripts y otros archivos relevantes se han sincronizado en el siguiente repositorio de **GitHub**: <https://github.com/riorval/TFM>

En la Tabla 1 se enumeran las tareas en las que se ha dividido el trabajo con las fechas en las que se han llevado a cabo y en la Tabla 2 los hitos que se planeó alcanzar dentro de las PEC.

Tabla 1. Tareas del trabajo

Inicio	Fin	Tareas
16/09/2020	28/09/2020	Definición del tema del trabajo
29/09/2020	13/10/2020	Creación del plan de trabajo
14/10/2020	28/10/2020	Elección <i>target</i>
27/10/2020	28/10/2020	Obtención estructura 3D <i>target</i>
29/10/2020	13/11/2020	Investigación moléculas inhibidoras conocidas del <i>target</i>
11/11/2020	03/12/2020	<i>Docking</i> de moléculas inhibidoras con el <i>target</i>
16/11/2020	20/11/2020	Búsqueda de nutraceuticos y elaboración de base de datos
23/11/2020	03/12/2020	<i>Docking</i> de nutraceuticos con el <i>target</i>
04/12/2020	10/12/2020	Comparación con moléculas inhibidoras y clasificación
11/12/2020	14/12/2020	Análisis ADMET de los mejores nutraceuticos
15/12/2020	05/01/2021	Elaboración de la memoria
06/01/2021	08/01/2021	Elaboración de la presentación

Tabla 2. Hitos marcados para el trabajo

Fechas	Hitos
16/11/2020	Toda la información sobre el <i>target</i> recopilada
24/11/2020	Todas las estructuras de moléculas recopiladas
10/12/2020	Clasificación de los nutraceuticos por comparación con las moléculas inhibidoras del <i>target</i>
14/12/2020	Resultados finales

El siguiente diagrama de Gantt recoge la distribución de las tareas y los hitos en la línea temporal. Las tareas marcadas en morado son las PECs estipuladas en el Plan Docente de la asignatura. Las tareas marcadas en azul son las descritas en la Tabla 1 y los puntos azules marcan los hitos descritos en la Tabla 2. Se han relacionado entre sí las tareas que siguen una misma línea de trabajo y que, por lo tanto, necesitan tener la primera tarea finalizada para continuar con la siguiente.

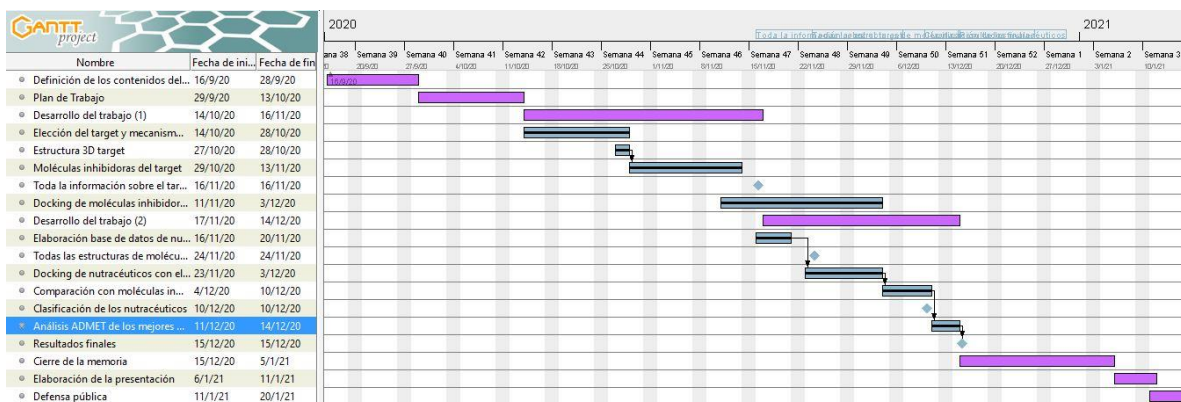


Figura 2. Diagrama de Gantt de las tareas del trabajo

1.5 Breve resumen de productos obtenidos

Los productos obtenidos en este trabajo se dividen en dos categorías:

- Documentos presentados a la Universitat Oberta de Catalunya para el seguimiento del trabajo y la evaluación:
 - **Plan de trabajo (PEC1)**: documento que recoge los objetivos concretos y la organización inicial de las tareas a realizar durante el TFM.
 - **Informes de seguimiento del desarrollo del trabajo (PEC2 y PEC3)**: documentos que recogen las tareas realizadas en cada bloque de trabajo y las desviaciones temporales con sus acciones de mitigación.
 - **Memoria del trabajo**: documento con la descripción del contexto, el desarrollo y el análisis de los resultados del trabajo.
 - **Presentación virtual**: documento multimedia (presentación de PowerPoint o vídeo) donde se explicarán de manera resumida los contenidos del trabajo.
- Productos obtenidos con el desarrollo del trabajo:
 - Base de datos de **moléculas inhibidoras** de la proteína *target*.
 - Base de datos de **flavonoles**.
 - **Estructura 3D** de la proteína *target* en formato PDB.
 - Imágenes de los **anclajes** de los nutraceuticos seleccionados contra el *target*.

1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

En el capítulo 2 de esta memoria se presenta una breve introducción sobre la enfermedad de Alzheimer donde se comentan las diferentes dianas terapéuticas que hay en estudio hoy en día.

En el capítulo 3 se habla de los nutraceuticos y se explica la elección de los flavonoles específicamente para estudiar en este trabajo.

En el capítulo 4 se detallan los pasos seguidos durante el desarrollo del trabajo.

En el capítulo 5 se recogen los resultados obtenidos y se hace una reflexión y discusión sobre los mismos.

En el capítulo 6 presenta las conclusiones del trabajo, junto a una reflexión sobre los objetivos alcanzados y un análisis del seguimiento de la planificación y metodología a lo largo del trabajo.

En el Anexo se recoge la lista de archivos relevantes para este trabajo, contenidos en el repositorio GitHub <https://github.com/riorval/TFM> donde están disponibles para su consulta si fuera necesaria.

2. La enfermedad de Alzheimer: breve introducción

Las enfermedades neurodegenerativas son las más frecuentes en personas de edad avanzada. Según la Organización Mundial de la Salud, existen en el mundo alrededor de 500 millones de personas que sufren demencia, y esta cifra aumenta cada año [5]. Este tipo de enfermedades son crónicas, progresivas e incapacitantes, afectan a la calidad de vida del paciente y frecuentemente acaban siendo mortales [27]. Pueden desencadenarse por diversos factores: predisposición genética, acumulación de proteínas anormales, acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), neuroinflamación por respuesta anormal de la microglía o destrucción de neuronas en partes específicas del cerebro [27], [28]. De entre los mecanismos implicados en las enfermedades neurodegenerativas existe un amplio conjunto que son comunes para varios de estos trastornos, por lo cual muchos investigadores se centran en estos *targets* con el objetivo de desarrollar estrategias de intervención para retrasar o prevenir la expansión de la neurodegeneración [28].

La enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más común. Actualmente afecta a alrededor de 40 millones de personas a nivel mundial y se calcula que para 2050 esta cifra podría triplicarse [3], [29]. Se trata de una enfermedad ligada a la edad, de avance progresivo e irreversible, caracterizada por la pérdida de memoria, de funciones cognitivas y cambios en el comportamiento y la personalidad [29], [30]. Presenta factores tanto genéticos como epigenéticos y ambientales: anomalías cardiovasculares, diabetes, accidentes cerebrales, aterosclerosis, etc. [9], [29].

El Alzheimer se asocia con varias alteraciones patológicas, como la acumulación de placas β -amiloides y la formación nudos neurofibrilares, la hiperfosforilación de la proteína tau, la deficiencia de neurotransmisor colinérgico central, neuroinflamación y disfunción mitocondrial [29], [30]. La implicación de varias enzimas y procesos bioquímicos hace que esta enfermedad presente alta complejidad, por lo que es muy difícil encontrar tratamientos adecuados.

Actualmente se comercializan dos tipos de fármacos para tratar los síntomas cognitivos del Alzheimer: inhibidores de la colinesterasa (Donepezil, Galantamine, Rivastigmine y Tacrine) para pacientes en estadios leves, moderados o graves de Alzheimer; y Memantine, un antagonista del N-metil-D-aspartato para pacientes con Alzheimer moderado a grave [3], [31]. Sin embargo, estos medicamentos no son capaces de parar el avance del proceso neurodegenerativo [30], por lo que se sigue investigando para encontrar una terapia efectiva que consiga ralentizar o parar el avance de la enfermedad.

2.1 Dianas terapéuticas del Alzheimer

Durante años los investigadores se han basado principalmente en dos hipótesis para explicar el proceso patológico de la enfermedad: la hipótesis de la cascada amiloide y la hipótesis de la hiperfosforilación de la proteína Tau.

La hipótesis de la cascada amiloide se basa en que la agregación de péptidos β -amiloides en el parénquima cerebral desencadena una secuencia de pasos que desemboca en la aparición de la enfermedad de Alzheimer [32]. Los péptidos β -amiloides se producen por escisión de la proteína precursora amiloide (APP) por parte de las enzimas β -secretasa (β -amyloid cleaving enzyme 1, BACE1) y γ -secretasa. Dichos péptidos acaban formando agregados $A\beta$ fibrilares insolubles, que son los mayores constituyentes de las placas seniles [30], [32]. Basándose en esta hipótesis los investigadores han ido identificando posibles dianas terapéuticas, entre las que se encuentran:

- **Proteína β -amiloide:** es una proteína transmembrana producida por la hidrólisis de la APP por la vía amiloidogénica. Este tipo de péptidos son el principal componente de las placas características del Alzheimer, y se ha observado que los oligómeros de $A\beta$ son todavía más tóxicos [33]. La terapia con anticuerpos monoclonales que detectan la $A\beta$ anormal para su eliminación parece ser la estrategia más prometedora de las que se están estudiando, aunque existen muchas otras terapias en desarrollo con este mismo *target*, y ninguna ha logrado superar la Fase III de ensayos clínicos [31].
- **APP (proteína precursora amiloide):** es la proteína que se procesa para generar productos amiloidogénicos por acción de las enzimas β -secretasa y γ -secretasa. Se ha observado que el fragmento N-terminal de APP puede iniciar procesos apoptóticos en las células. Se ha visto que también está implicada en los casos de Alzheimer familiar, una variante de inicio temprano de la enfermedad, provocado por mutaciones autosómicas dominantes de los genes Presenilin 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2), que se da en el 1% de los casos [34]. Una de las terapias en estudio que tiene esta proteína como *target* es la del fármaco Posiphen, un enantiómero de un inhibidor de la colinesterasa que, aunque no posee esta actividad, es un inhibidor translacional que reduce los niveles de APP y al que se le atribuyen propiedades neurotróficas [35].
- **BACE1 (β -amyloid cleaving enzyme 1):** es la β -secretasa que genera los péptidos $A\beta$ a partir de APP. Es uno de los principales *targets* en estudio para disminuir la cantidad de $A\beta$ en el cerebro y, por tanto, frenar el progreso de la enfermedad. Se están estudiando varios inhibidores específicos de esta proteína, aunque los que han llegado a Fase III no han mostrado beneficios clínicos y también han tenido efectos secundarios perjudiciales [33].
- **APOE4 (apolipoproteína E):** la proteína apoE tiene funciones de transporte de lípidos y homeostasis de colesterol. Existen tres

polimorfismos del gen que la codifica: APOE2, APOE3 y APOE4; Se ha observado que los pacientes con el alelo APOE4 tienen más posibilidades de desarrollar Alzheimer. Se ha visto que la proteína apoE4 está hipolipidada y es menos efectiva que la isoforma apoE3 en la inducción del eflujo de colesterol. Existen varias hipótesis sobre el mecanismo de acción de esta proteína en procesos patológicos, que incluyen su influencia en el metabolismo de A β . No se utilizan moléculas inhibitoras contra esta diana terapéutica, los investigadores están estudiando diferentes estrategias de tratamiento con anticuerpos, vectores, péptidos que mimetizan el lugar de unión a los receptores de apoE, etc. [36].

La otra característica principal del Alzheimer son los nudos neurofibrilares, formados principalmente por la proteína Tau. Se trata de una proteína altamente soluble que interacciona con la tubulina para estabilizar la estructura microtubular de las neuronas. Mutaciones que alteran la función y la expresión de las isoformas de esta proteína provocan la hiperfosforilación de Tau, lo que acaba formando dichos nudos, que son no solubles y pueden dañar las funciones citoplasmáticas, interferir en el transporte axonal y finalmente conducir a la muerte celular. Muchos investigadores por tanto han tomado la hipótesis de que esta es la causa de la enfermedad de Alzheimer [30]. Algunas de las dianas terapéuticas implicadas en esta vía son:

- **Tau:** la función de Tau es mantener la estructura neuronal mediante la estabilización de los microtúbulos que distribuyen nutrientes por la neurona. Se están investigando mecanismos para prevenir que Tau colapse y forme nudos, proceso que destruye los microtúbulos y, por ende, la neurona en sí. De los tratamientos en estudio, destaca AADvac1, una vacuna que estimula el sistema inmune para atacar a la forma anormal de la proteína Tau. Se ha observado que podría ralentizar la progresión de la enfermedad [31].
- **GSK3** (glycogen synthase kinase-3): es una kinasa de serina/treonina dirigida por prolina, que participa en procesos de metabolismo del glicógeno y de transcripción de genes. Su desregulación provoca la hiperfosforilación de Tau, además de un aumento de la producción de A β y respuesta inflamatoria mediada por la microglía, por lo que tiene un papel central en la patogénesis del Alzheimer. El litio inhibe GSK3 directamente por competición con los iones de magnesio e indirectamente por aumento de fosforilación de serina y autorregulación. Otros iones metálicos han mostrado una inhibición más potente de GSK3, de los cuales el zinc es de particular interés ya que se encuentra de manera natural en el tejido corporal, a diferencia de los otros iones. Sin embargo, el zinc es un cofactor de muchas otras enzimas y podría tener efectos indeseados. También se están estudiando otros inhibidores competidores de ATP en su sitio de unión a GSK3 [37], [38].
- **DYRK1A** (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A): es una proteína implicada en la generación de Tau y de

patologías amiloides. Se asocia con los nudos neurofibrilares en el Alzheimer. EHT5372 es un potente inhibidor de DYRK1A con alta selectividad sobre 339 kinasas. Inhibe la fosforilación de Tau mediada por DYRK1A y normaliza la fosforilación de Tau inducida por AB y la producción de AB estimulada por DYRK1A [39].

Otra hipótesis del desarrollo de la enfermedad es la reducción de la síntesis de acetilcolina, un neurotransmisor que utilizan las neuronas colinérgicas, con un papel importante en el sistema nervioso central y periférico. Estas son las dianas terapéuticas relacionadas con esta hipótesis:

- **AChE** (acetilcolinesterasa): esta enzima disminuye la cantidad de acetilcolina por hidrólisis. Durante la progresión de la enfermedad, una parte importante de las neuronas que se pierden son las colinérgicas de la parte anterior del cerebro, lo que va acompañado de un descenso de la acetilcolina. Algunas investigaciones se centran en la inhibición AChE con el objetivo de aumentar la concentración de acetilcolina en las sinapsis [30], [40]. Actualmente existen en el mercado cuatro fármacos inhibidores de la AChE: Donepezil, Galantamine, Rivastigmine y Tacrine. Estos fármacos se utilizan para tratar síntomas relacionados con la memoria, el lenguaje, el juicio y otros procesos de pensamiento. También se está estudiando el uso de un nutracéutico, la Huperzina A, un potente inhibidor de la AChE con actividad reversible aislado de una planta utilizada en la medicina tradicional china. [41].
- **Receptor 5-HT2A**: bloquea neurotransmisores como la acetilcolina, lo cual disminuye la disponibilidad de esta para la comunicación interneuronal. Mediante la inhibición de esta enzima puede aumentar la cantidad de acetilcolina y ayudar a las células nerviosas a mantener una comunicación normal. Pimavanserin es un agonista inverso para el receptor 5-HT2A. Imita la estructura de la serotonina y encaja con el locus de 5-HT2A, sin embargo, tiene el efecto contrario a la serotonina, reduce la comunicación entre neuronas. Esto puede tener reducir los síntomas de psicosis relacionada con la demencia [42], [43].

Tanto las placas de A β como los nudos de Tau causan una respuesta inmune en el cerebro, lo que desencadena un proceso de neuroinflamación. Una respuesta inflamatoria excesiva en el sistema nervioso central causa destrucción celular por aumento de los niveles de citocinas, proteasas, glutamato, radicales libres y la activación de las células de la microglia [27]. Este es un campo que ha despertado mucho interés en la investigación para frenar la progresión de la enfermedad. Algunos investigadores han estudiado el uso de una molécula llamada Sargramostim, que estimula el sistema inmune con el objetivo de proteger a las neuronas de las toxinas generadas durante la progresión de la enfermedad. Además, se están estudiando diversas citocinas inflamatorias como dianas terapéuticas:

- **IL-1B** (interleucina 1B): es una citocina clave en la respuesta inmune generada en la enfermedad. Se ha observado que empeora la patología provocada por A β y Tau. El entorno perpetuamente proinflamatorio provocado por la deposición de A β podría tener efectos beneficiosos y ayudar a su eliminación, aunque en otros estudios se ha visto que la inhibición de la respuesta proinflamatoria también podría ser beneficiosa. También hay estudios que afirman que podría utilizarse el sistema inmune innato para eliminar A β con el uso de citocinas antiinflamatorias [44].
- **IL-6** (interleucina 6): el efecto de IL-6 depende del entrono celular, aunque su desregulación está implicada en muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento. En el Alzheimer, los astrocitos y la microglía producen IL-6 en respuesta al daño inducido por A β , con lo que todavía promueven más formación de placas [45].

Además de las enzimas mencionadas anteriormente, existen muchas otras enzimas que se están estudiando como posibles dianas terapéuticas del Alzheimer, algunas de las cuales están también implicadas en procesos de neuroinflamación y de acumulación de A β :

- **Ciclofilina D**: es una parte integral del poro de permeabilidad mitocondrial. La apertura de este poro acaba provocando la muerte celular. La interacción con la proteína A β potencia el estrés mitocondrial, neuronal y sináptico. La ciclosporina A actúa como inhibidor ya que se une sobre el sitio activo de varias formas de ciclofilinas [46].
- **Receptor NMDA** (N-metil-D-aspartato): es un receptor de glutamato que se encuentra sobreactivado en pacientes con Alzheimer, lo que lleva a daño neuronal y deterioro de la plasticidad neuronal. En condiciones de sobreactivación, los iones Mg²⁺ que en condiciones normales bloquean los receptores NMDA, no pueden hacerlo. Actualmente, en pacientes en estadios moderados a severos de la enfermedad se utiliza el fármaco Memantine, que mejora la memoria, atención, razonamiento, lenguaje y la capacidad de realizar tareas sencillas. Regula la actividad del glutamato, un compuesto involucrado en el procesamiento y recuperación de información. Puede provocar efectos secundarios como dolor de cabeza, estreñimiento, confusión o mareos [47].
- **RAGE** (Receptor for Advanced Glycation Endproducts): existe la hipótesis de que uno de los motivos por los que A β se acumula en el cerebro de pacientes con Alzheimer es porque entra A β del sistema circulatorio al cerebro a través de la blood-brain barrier (BBB) vía RAGE. RAGE se activa con AGEs (Advanced Glycation Endproducts), lo que causa acumulación de A β , y provoca estrés oxidativo que lleva a disfunción mitocondrial, disfunción energética de la neurona y alteración del mecanismo de señalización. RAGE también magnifica la respuesta inflamatoria en el cerebro mediante

liberación de citocinas. Azeliragon es una molécula de pequeño tamaño biodisponible oralmente que inhibe RAGE. Su estudio terminó en 2019 donde se determinó que no era efectivo [31], [48].

- **Receptor de retinoides:** los retinoides son análogos del ácido retinoico (metabolito activo de la vitamina A) y son moduladores de la proliferación, diferenciación y morfogénesis de las células. Inhiben muchos aspectos de activación de la microglía, por lo que ayudan a disminuir la neuroinflamación y también promueven la regeneración de tejidos. Se ha observado una abundante presencia de receptores de retinoides tipo alfa y gamma en regiones del hipocampo, lo que sugiere que los retinoides también pueden tener un papel importante en la memoria. Acitretin es un retinoide aromático, agonista de receptores de retinoides, que tiene actividad anti-amiloidogénica mediante estimulación de la α -secretasa. Además, aumenta significativamente la IL-6, lo que estimula el sistema inmune para aliviar los problemas de memoria. Bexarotene es un agonista del receptor de retinoides tipo X del cual se ha observado que revierte el proceso de neurodegeneración, mejora la cognición y disminuye los niveles de A β [49].
- **BTK (Bruton's tyrosine kinase):** es un regulador de la fagocitosis de la microglía. Se ha encontrado una elevación de BTK en cerebros con Alzheimer, lo que se interpreta como una respuesta a la acumulación extracelular de A β . Ibrutinib es un inhibidor de BTK que se une al sitio de unión del ATP a BTK. Este fármaco puede unirse a otras 10 quinasas humanas, lo cual puede dar problemas porque su unión a la enzima es covalente [50].
- **CLK1 (cdc2-like kinases):** son un grupo de quinasas con especificidad dual muy conservada. Existen cuatro isoformas, de las que la CLK1 tiene un rol importante en la fisiopatología del Alzheimer, porque tiene una función reguladora del procesado del ARN por la fosforilación de proteínas ricas en serina y arginina, principalmente localizadas en el núcleo. Se están estudiando dos moléculas inhibitoras: una es un alcaloide marino (leucettamine B) que es un potente inhibidor de CLK1 y otras citocinas, el otro inhibidor es KH-CB19 y es específico de CLK1 y CLK4 [51].

Tabla 3. Dianas terapéuticas en estudio para el Alzheimer

Diana terapéutica	Estructura 3D	Inhibidores	Referencia
β-amiloide	1HZ3	CAD106 (inmunoterapia activa), CNP520, LY3002813, Crenezumab, Aducanumad, Thiethylperazine, ABvac40	[31], [43]
APP	5TPT	Posiphen	[35]
BACE1	2QZL	JNJ-54861911, Lanabecestat, Elenbecestat, Verubecestat	[31], [43]
APOE4	6NCN	No inhibidores	[3], [36]
Tau	6FAV	AADvac1, IONIS-MAPTRx, JNJ-63733657, RO7105705, ABBV-8E12	[31], [43]
GSK3	5HLN	Catión litio, Zinc, Indirubinas, Meridianis, Aminopirimidinas, Manzamines, Thiadiazolidinndiones	[37], [38]
DYRK1A	2WO6	EHT5372	[39]
AChE	4BDT	Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, Tacrine. Huperzine A (Nutracéutico)	[30], [31], [41]
Receptor 5-HT2A	6A94	Pimavanserin	[42], [43]
Citocinas inflamatorias	711B, 2IL6	Flavonoides (Nutracéuticos)	[44], [45]
Ciclofilina D	2Z6W	Ciclosporina A	[46]
Receptor NMDA	5UOW	Memantine	[47]
RAGE	3O3U	Azeliragon	[31], [48]
Receptor retinoides	4N5G, 3A9E, 1XAP, 2LBD	Acitretin, Bexarotene	[49]
BTK	3K54	Ibrutinib	[50]
CLK-1	6Q8K	Leucettamine B, KH-CB19	[51]
5-LOX	3O8Y	Zileuton, CNB-001, Flavocoxid	[52]

En la Tabla 3 se recogen todas las dianas terapéuticas sobre las que se realizó la investigación bibliográfica inicial de este trabajo con el objetivo de seleccionar una de ellas para el estudio. Las 17 son proteínas implicadas en el Alzheimer, aparecen en orden de mención en este trabajo, junto al código que identifica su estructura tridimensional en el portal Protein Data Bank [53], las moléculas inhibitoras que se han estudiado para estas dianas y las referencias bibliográficas de donde se ha extraído la información.

2.2 La enzima 5-lipoxigenasa

Como se ha comentado anteriormente, el Alzheimer es una enfermedad compleja en la que están implicados muchos mecanismos distintos de muerte celular, neuroinflamación, disminución de la neurogénesis, etc. Es por este motivo por el que muchos investigadores están optando por un enfoque permita influir en varios mecanismos al mismo tiempo. En este contexto, el sistema de los leucotrienos aparece como una opción muy interesante dado que este

conjunto de moléculas está implicado en procesos de neuroinflamación, neurodegeneración y neurogénesis [52].

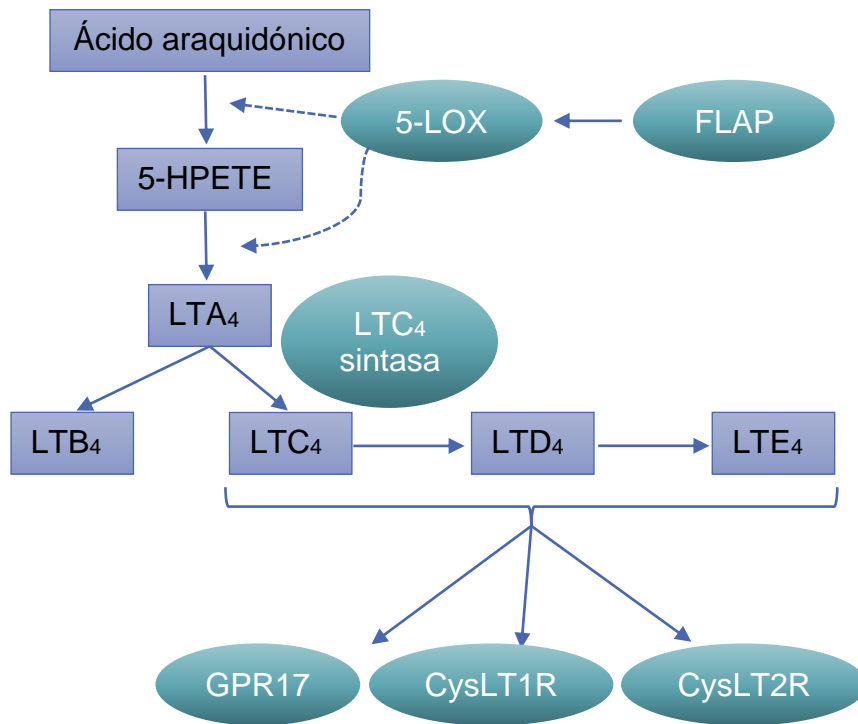


Figura 3. El sistema de los leucotrienos. Adaptado de Michael et al. 2019

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso poliinsaturado que proviene de la transformación de los fosfolípidos. El AA puede procesarse por distintas vías enzimáticas, una de las cuales acaba generando leucotrienos, que son metabolitos proinflamatorios. En la Figura 3 se detalla este proceso, que comienza con la transformación del AA en 5-HPETE (ácido 5-hidroxi-peroxi-eicosato-treónico) y posteriormente en LTA₄ (leucotrieno A₄), ambas reacciones catalizadas por la enzima 5-LOX (5-lipoxigenasa), que primero debe formar un complejo con la FLAP (proteína activadora de 5-LOX). Posteriormente, mediante la acción de la enzima LTC₄ sintasa, el LTA₄ se transforma en LTC₄, a partir del cual se forman los leucotrienos LTD₄ y LTE₄ que se unirán a los receptores de cisteinil-leucotrienos 1 y 2 (CysLT1R y CysLT2R) con diferentes afinidades y al receptor GPR17 (del inglés G-protein-coupled receptor 17) [52], receptores que se encuentran en varios tipos celulares y provocan distintas respuestas. En el cerebro concretamente, los leucotrienos inducen la proliferación de astrocitos y las células endoteliales al interactuar con estos metabolitos, aumentan su permeabilidad [54].

Varios investigadores se han interesado en el sistema de producción de los leucotrienos y su implicación en el Alzheimer. 5-LOX se encuentra entre las primeras enzimas que participan en esta vía metabólica, además, se ha detectado una mayor presencia de 5-LOX en cerebros humanos con Alzheimer, así como en modelos animales [52], por lo que esta enzima es una de las más investigadas en este campo.

Son varios los estudios en los que se ha visto que la inhibición farmacológica de 5-LOX puede contrarrestar la progresión del Alzheimer, actuando en mecanismos patofisiológicos que intervienen en la producción y deposición de A β y en la fosforilación de Tau. Estos estudios se han realizado en modelos animales, y han resultado en una reducción de los niveles de formación de placas A β en el cerebro y menor concentración de tau insoluble hiperfosforilada [55], reducción de A β soluble [56], mejora del aprendizaje y la memoria [57], etc. Todos estos mecanismos sugieren que 5-LOX puede ser un buen *target* para tratar el Alzheimer, y es por esto por lo que este trabajo se centra en la inhibición de esta enzima.

3. Nutracéuticos

Los productos naturales se han utilizado históricamente para obtener todo tipo de preparaciones medicinales. La idea de que los alimentos pueden tener la capacidad de prevenir o tratar enfermedades surgió hace 3000 años cuando Hipócrates dijo “Que la comida sea tu alimento y el alimento tu medicina” [58]. En 1989 surge el concepto “nutracéutico” a partir de dos terminologías: “nutrición” y “farmacéutico” [59].

Se conoce como nutraceuticos a aquellos alimentos o partes de un alimento o complementos alimenticios que tienen efectos beneficiosos para la salud y que pueden utilizarse para prevenir o tratar una enfermedad [4]. En los últimos años también se han incluido en este concepto los probióticos (microorganismos beneficiosos vivos que mejoran la salud y previenen enfermedades) y los prebióticos (nutrientes que modifican la flora microbiana del aparato digestivo estimulando el crecimiento de las bacterias beneficiosas o inhibiendo el de los microorganismos perjudiciales). Aunque hoy en día sigue existiendo confusión entre los términos “complemento dietético”, “alimentos enriquecidos” y “nutracéuticos”, la mayor diferencia entre estos conceptos reside en el propósito de su uso: los nutraceuticos tienen un uso más concreto, centrado en la prevención o tratamiento de una enfermedad específica y no tanto en la mejoría general de la salud [59], [60].

Hoy en día se siguen estudiando las propiedades beneficiosas que pueden presentar los compuestos de origen natural y además es frecuente que en el proceso de diseño de fármacos se utilice la estructura molecular de algunos compuestos naturales como guía para sintetizar nuevos compuestos terapéuticos [61]. Existen nutraceuticos que se utilizan como alternativa a los fármacos convencionales porque tienen menos posibilidades de provocar efectos secundarios [58].

Los nutraceuticos más utilizados son compuestos derivados de frutas y verduras. Comúnmente este tipo de compuestos tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, por lo que se han utilizado para prevenir o tratar una gran variedad de problemas de salud [59], [62]. Entre los nutraceuticos más estudiados están los polifenoles, que se clasifican según su número de anillos fenol y los grupos químicos unidos a ellos. Entre los polifenoles, el grupo más grande lo componen los flavonoides, que se subdividen en: flavanoles, flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas y antocianinas [9]. Algunos de los polifenoles más consumidos pertenecen a este grupo de flavonoides y están presentes en los frutos rojos (antocianinas), el chocolate negro (flavonoles), el vino y las uvas (resveratrol) o en el aceite de oliva (hidroxitirosol, oleuropeína) [5], [62].

En la actualidad se ha publicado una variedad de estudios sobre los efectos protectores de algunos estos compuestos en la prevención de enfermedades neurodegenerativas. Se ha evaluado la suplementación dietética con aceite de oliva virgen extra en ratas de edad avanzada y se han visto mejoras en su comportamiento. También se han llevado a cabo ensayos clínicos y estudios de

población donde se ha visto que los compuestos fenólicos tienen efectos protectores frente a trastornos cognitivos asociados con la edad [5], [63], [64].

3.1 Los flavonoles

Los flavonoles constituyen uno de los subgrupos de flavonoides más analizados debido a sus propiedades biológicas. Estas moléculas, como se puede ver en la Figura 4, se caracterizan por presentar un grupo cetona en el C₄ y una insaturación entre los carbonos C₂ y C₃, así como un grupo hidroxilo adicional en el carbono C₃, que también puede encontrarse glicosilado [64], [65]. Constituyen las piezas básicas con las que se sintetizan las proantocianinas y tienen una amplia variedad de patrones de metilación e hidroxilación, por lo cual son el subgrupo de flavonoides más ubicuo y abundante en frutas (uva, manzana, tomate, frutos rojos), verduras (cebolla, brócoli, lechuga, kale, espinacas) [64], té verde, té negro y vino tinto [16]. Su biosíntesis es un proceso fotosintético, por lo que suelen encontrarse en el tejido externo y aéreo de las plantas.

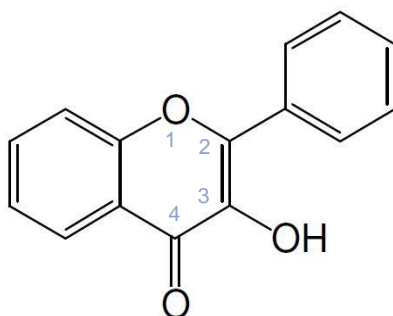


Figura 4. Estructura básica de un flavonol

Se les asocia una amplia variedad de beneficios para la salud, especialmente efectos antioxidantes, antiinflamatorios y reducción del riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares. Su capacidad antioxidante depende principalmente de su estructura química que les confiere un efecto protector contra el daño oxidativo de las células, lípidos y el ADN. El consumo de flavonoles también se asocia con un riesgo reducido de padecer accidentes cerebrovasculares y cáncer y a algunos de estos compuestos se los relaciona con propiedades neuroprotectoras [16], [64].

Los flavonoles más comúnmente consumidos y estudiados son: la quercetina, el kaempferol, la miricetina, la fisetina y la rutina [59], [64]. En algunas de estas moléculas se han observado actividades inhibitorias de la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa [66].

La quercetina es el mayor representante del subgrupo de los flavonoles dado que es la que se encuentra en mayor variedad de vegetales, como en verduras de hoja verde, vino tinto, té verde, manzanas y cebollas. Es un potente antioxidante, se ha visto que reduce la síntesis de enzimas inflamatorias en varios modelos animales y también actúa como agente antihistamínico para prevenir la aparición de alergias y asma [16], [67]. En algunos estudios se ha

observado que este flavonol presenta propiedades neuroprotectoras y que es capaz de reducir la producción de fibras de A β y la apoptosis inducida por A β [63].

Se ha observado en modelos animales que el consumo de rutina atenúa la producción de interleucinas. Este flavonol se utiliza ampliamente como nutriente fortificante de alimentos. Además de sus propiedades antiinflamatorias, se le asocian propiedades anticancerígenas, antivirales, antioxidantes, etc. [59], [67].

El kaempferol es un flavonoide especialmente abundante en el brócoli y se considera que mejora la osteoporosis. También tiene propiedades antiinflamatorias y de reducción de las ROS (especies reactivas de oxígeno). Además, se le atribuyen propiedades anticancerígenas. En modelos animales de edad avanzada se ha observado que inhibe la activación de las células T y de la ciclooxigenasa, lo que reduce la posibilidad de enfermedades hepáticas [16], [67].

Dadas las propiedades antiinflamatorias de los flavonoles y su abundancia en los alimentos vegetales, este trabajo se ha centrado en el estudio de estos compuestos naturales para su posible uso en la inhibición de la 5-LOX en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

4. Métodos

El presente proyecto consiste en dos áreas de investigación diferenciadas que convergen hacia el final del proyecto para obtener unos resultados que unen los datos obtenidos de estas investigaciones separadas: por una parte, se tenía que seleccionar una proteína diana implicada en la enfermedad del Alzheimer, conseguir su estructura 3D, buscar moléculas inhibitoras conocidas, etc. Por otra parte, se debía hacer una búsqueda de flavonoles para construir una base de datos en la que buscar aquellos que pudieran resultar idóneos para la inhibición de la proteína diana. En los siguientes apartados se describe el proceso seguido en cada paso del desarrollo del trabajo.

4.1 Elección del *target*

La elección de la proteína diana se hizo tras una búsqueda bibliográfica en la que se recogió información sobre 17 proteínas implicadas en la enfermedad de Alzheimer. Los resultados de esta búsqueda bibliográfica se encuentran detallados en la Tabla 3. De cada proteína se recogió información sobre su mecanismo de acción, se buscó su estructura tridimensional en la *Protein Data Bank* [20] y se anotaron algunos de sus inhibidores conocidos.

Para elegir el *target* se tuvo en cuenta que existiera la estructura 3D en la literatura, lo cual supondría un ahorro de tiempo en el total del trabajo. Se descartaron *targets* para los cuales se estuvieran investigando estrategias que no implicaran moléculas inhibitoras (como en el caso de ApoE [36]). Se trató de elegir un *target* para el cual se pudieran recoger suficientes inhibidores conocidos a partir de la literatura científica. Por otra parte, se descartaron la vía de la A β y la proteína Tau como dianas terapéuticas porque están muy ampliamente investigadas y hasta el momento no se ha encontrado una estrategia adecuada para inhibir sus efectos [52].

Una de las áreas de más interés en la investigación contra el Alzheimer en los últimos años es la neuroinflamación, que engloba varias vías metabólicas, entre las que se incluye el sistema de los leucotrienos, como se ha explicado anteriormente. En esta vía metabólica, la 5-lipoxigenasa (5-LOX) es una de las primeras enzimas implicadas y, además, se han visto asociaciones de cambios de niveles de esta proteína y la aparición de síntomas característicos del Alzheimer [68]. Por estos motivos 5-LOX fue la enzima con la que se decidió trabajar en este proyecto.

Se encontró en Protein Data Bank la estructura cristalizada de 5-LOX identificada con el código 3O8Y [69]. Esta estructura corresponde con una 5-LOX a la que se le han modificado los aminoácidos en las posiciones 653-655 para conseguir una proteína estable que permitiera su cristalización. La proteína presenta dos dominios: el dominio "C2-like" de unos 120 residuos que confiere a la proteína la capacidad de unirse a la membrana nuclear al interaccionar con iones de calcio; y el dominio catalítico, que es el más grande. Este dominio catalítico se compone principalmente de hélices α y contiene un ion de hierro catalítico, coordinado por tres histidinas (His-367, 372 y 550) así como el

carboxilato de cadena principal del C-terminal (I673). También presenta una hélice arqueada que protege el acceso al hierro catalítico. El sitio activo de esta enzima es una cavidad elongada sin acceso directo al solvente. Los investigadores que consiguieron cristalizar la 5-LOX estable describen la posición del sitio activo de la proteína con estos aminoácidos: L368, L373, L414, L607, I406, Y181, A603, A306, H600, T364, N407 y H432 [69].

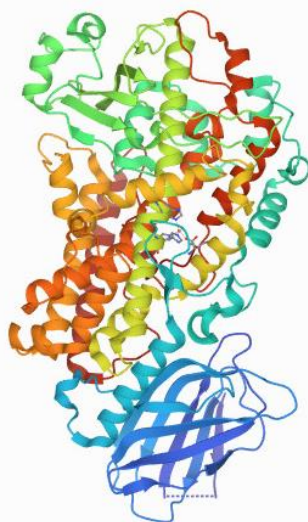


Figura 5. 5-LOX. PDB ID: 308Y.

4.2 Inhibidores conocidos de 5-LOX

Una vez seleccionada 5-LOX como diana terapéutica con la que trabajar, se procedió a la búsqueda de moléculas inhibitoras conocidas para dicho *target*. La búsqueda se realizó mediante la consulta de bases de datos de compuestos químicos: ChEMBL [21], ZINC [22], PubChem [13], DrugBank [10], Drugs.com [11] BindingDB [70] y PDB [20], además de la literatura disponible.

En la Tabla 4 se recogen todos los inhibidores de los que se encontró en la literatura su IC_{50} . Se buscó también la K_i (constante de inhibición) de los inhibidores de 5-LOX, pero no se pudo encontrar para todas las moléculas, tan sólo para CHEMBL3113617 y CHEMBL3113612, siendo $K_i = 8.4$ nM y $K_i = 9.4$ nM respectivamente. Por este motivo se decidió utilizar los datos obtenidos de IC_{50} para clasificar los inhibidores según su potencia. Para facilitar la interpretación de la potencia de inhibición de las moléculas se calcularon los valores de pIC_{50} (que corresponden al logaritmo negativo del IC_{50} en M). Los inhibidores se clasificaron en potentes ($pIC_{50} \geq 7$), poco potentes o inactivos ($pIC_{50} \leq 6$) e indeterminados o de difícil clasificación, donde puede haber inhibidores de ambos tipos (pIC_{50} entre 6 y 7). En la tabla se puede ver esta clasificación separada por líneas dobles.

Hubo tres moléculas de las que no se pudieron encontrar datos de potencia de inhibición: *balsalazide*, *mesalamine* y *olsalazine*. Los tres son

antiinflamatorios que se utilizan en la colitis ulcerativa. *Sulfasalazine* también se utiliza para tratar esta enfermedad, de este sí se pudo encontrar el IC₅₀.

De dos de estas moléculas inhibitoras se encontró la estructura cristalizada del conjunto inhibidor-proteína. Estas dos moléculas son: NDGA (*norhidroguaiaretic acid*) cuya estructura cristalizada conjunta con 5-LOX corresponde al PDB ID 6N2W [71]; y AKBA (*3-O-acetyl-11-keto-boswellic acid*) cuya estructura cristalizada conjunta con 5-LOX corresponde al PDB ID 6NCF [71]. NDGA es un producto natural que se comporta como inhibidor reductivo de 5-LOX y tiene efecto antioxidante, mientras que AKBA es un inhibidor no competitivo de 5-LOX que pertenece a la clase de inhibidores non-redox e interviene en presencia de ion de calcio con el sitio de unión a ácidos grasos [72].

Varios de estos inhibidores son compuestos naturales. La catequina es un flavonoide que se encuentra en la composición de un nutracéutico llamado Flavocoxid, el cual se ha observado que puede inhibir 5-LOX en modelos animales del Alzheimer [57]. *Puupehenone* es otro producto natural extraído de un organismo marino que tiene una alta capacidad antioxidante y antimicrobiana [73]. UP446 es una baicaleína aislada de una planta llamada *S. baicalensis* [74]. CNB-001 es un derivado de la curcumina, de tipo pirazol, al que se le atribuye la capacidad de reducir la A β intracelular [56].

Zileuton, también conocido como Zyflo, es el único inhibidor de 5-LOX aprobado para uso clínico, e inhibe a la enzima al interactuar con el complejo de hierro [55]. *Phenidone* es un inhibidor de 5-LOX que está bien caracterizado en la literatura y que Burnett et al. 2007 utilizaron para determinar la capacidad de inhibición de la catequina [74]. PF-4191834 es un inhibidor competitivo de 5-LOX que fue descartado en la Fase II de los ensayos clínicos [72].

Existen algunos estudios en los que se han descubierto inhibidores de 5-LOX mediante algoritmos de inteligencia artificial. Este es el caso de β -lapachone, un inhibidor específico de 5-LOX [75].

El objetivo de recoger información sobre los inhibidores conocidos de 5-LOX era tener un conjunto de compuestos de estructuras variadas y con distintas potencias de inhibición para hacer posteriormente el anclaje con la estructura de la proteína.

Tabla 4. Inhibidores conocidos de 5-LOX extraídos de la literatura

Nombre	ChEMBL	SMILES	Peso molecular (g/mol)	pIC ₅₀	IC ₅₀ (nM)	Ref.
CJ-13610	CHEMBL195309	<chem>CC1=NC=CN1C2=CC=C(C=C2)SC3=CC=CC(=C3)C4(CCOCC4)C(=O)N</chem>	393.51	8.9	1.15	[72]
CHEMBL3113617	CHEMBL3113617	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)n2cc(C(=O)C(=O)NCC(=O)O)c3ccccc32)cc1</chem>	400.41	8.1	8.60	[76]
CHEMBL3113612	CHEMBL3113612	<chem>COC(=O)CNC(=O)C(=O)c1cn(S(=O)(=O)c2ccc(C)cc2)c2ccccc12</chem>	414.44	8.0	9.70	[76]
Atreleuton	CHEMBL59356	<chem>C[C@H](C#Cc1ccc(Cc2ccc(F)cc2)s1)N(O)C(N)=O</chem>	318.40	7.6	2.30E+01	[77]
Setileuton	CHEMBL2105653	<chem>CC[C@](O)(c1nnc(NCc2ccc3c(-c4ccc(F)cc4)cc(=O)oc3c2)o1)C(F)(F)F</chem>	463.39	7.2	6.00E+01	[72]
CNB-001	CHEMBL258741	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C=CC2=CC(=NN2C3=CC=CC=C3)C=CC4=C(C=C(C=C4)O)OC)O</chem>	440.50	7.2	7.00E+01	[56]
NDGA	CHEMBL313972	<chem>C[C@@@H](Cc1ccc(O)c(O)c1)[C@H](C)Cc1ccc(O)c(O)c1</chem>	302.37	7.0	9.00E+01	[71], [72]
PF-4191834	CHEMBL4297416	<chem>Cn1nccc1-c1ccc(Sc2ccccc(C3(C(N)=O)CCOCC3)c2)cc1</chem>	393.51	6.6	2.29E+02	[72]
RG-6820		<chem>O=C(Cc1ccc(OCc2ccccc2)cc1)N(O)CCc1ccccc1</chem>	361.40	6.5	3.20E+02	[78]
Zileuton	CHEMBL93	<chem>CC(c1cc2ccccc2s1)N(O)C(N)=O</chem>	236.30	6.3	5.60E+02	[72]
Puupehenone	CHEMBL157844	<chem>CC1(C)CCC[C@@]2(C)[C@H]1CC[C@]1(C)OC3=CC(=O)C(O)=C(C3=C[C@@H]12</chem>	328.40	6.2	6.80E+02	[73]
AA-861	CHEMBL30481	<chem>CC1=C(C)C(=O)C(CCC#CCCC#CCO)=C(C)C1=O</chem>	326.44	5.8	1.70E+03	[52]
Phenidone	CHEMBL7660	<chem>O=C1CCN(c2ccccc2)N1</chem>	162.19	5.7	1.90E+03	[74]
β-lapachone	CHEMBL15192	<chem>CC1(C)CCC2=C(O1)C1=CC=CC=C1C(=O)C2=O</chem>	242.27	5.1	8.60E+03	[75]
AKBA	CHEMBL3401902	<chem>COC(=O)[C@@]1(C)[C@H](OC(C)=O)CC[C@@]2(C)[C@H]1CC[C@@]1(C)[C@@H]2C(=O)C=C2[C@@H]3[C@@H](C)[C@H](C)CC[C@@]3(C)CC[C@@]21C</chem>	526.76	4.8	1.50E+04	[71], [79]
Ácido meclofenámico	CHEMBL509	<chem>Cc1ccc(Cl)c(Nc2ccccc2C(=O)O)c1Cl</chem>	296.15	4.6	2.40E+04	[80]
Catequina	CHEMBL311498	<chem>C1C(C(OC2=CC(=CC(=C21)O)O)C3=CC(=C(C=C3)O)O)O</chem>	290.27	4.2	5.68E+04	[74]
Sulfasalazine	CHEMBL421	<chem>O=C(O)c1cc(/N=N/c2ccc(S(=O)(=O)Nc3ccccc3)cc2)ccc1O</chem>	389.40	4.0	1.00E+05	[81]
UP446	CHEMBL8260	<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=CC(=O)C3=C(O2)C=C(C(=C3O)O)O</chem>	270.24	4.0	1.07E+05	[74]
Balsalazide	CHEMBL1201346	<chem>O=C(O)CCNC(=O)c1ccc(/N=N/c2ccc(O)c(C(=O)O)c2)cc1</chem>	357.32	NA	NA	[82]
Mesalamine	CHEMBL704	<chem>Nc1ccc(O)c(C(=O)O)c1</chem>	153.14	NA	NA	[83]
Olsalazine	CHEMBL425	<chem>O=C(O)c1cc(/N=N/c2ccc(O)c(C(=O)O)c2)ccc1O</chem>	302.24	NA	NA	[84]

4.3 Base de datos de flavonoles

La búsqueda de flavonoles consistió inicialmente en la investigación en varias bases de datos de nutraceuticos y en la literatura. Con esto se pudo recoger una lista de 9 flavonoles naturales, que son los más abundantes y estudiados: quercetina, fisetina, kaempferol, miricetina, rutina, isorhamnetina, isoquercetina, troxerutina y taxifolina. Las estructuras moleculares de estos compuestos pueden verse representadas en la Tabla 7. Cinco de estos flavonoles (quercetina, fisetina, kaempferol, miricetina y taxifolina) tienen estructuras muy similares, que sólo varían en el número y posición de los grupos hidroxilo. La isorhamnetina también es muy similar, sólo cambia un grupo cetona con respecto a las anteriores. Los otros tres flavonoles (rutina, troxerutina e isoquercetina) son glicósidos flavonoles, por lo que su tamaño es mayor. La isoquercetina está formada por un glucósido y una quercetina. La troxerutina es un derivado de la rutina.

Dado que la lista obtenida resultaba ser muy reducida, se decidió hacer una búsqueda de flavonoles por estructura en SwissSimilarity [15] para intentar ampliarla. Para ello se utilizó la estructura de un flavonol genérico (SMILES: OC1=C(OC2=C(C=CC=C2)C1=O)C1=CC=CC=C1) correspondiente a la estructura representada en la Figura 4. En SwissSimilarity hay varias opciones de bases de datos donde realizar la búsqueda. Inicialmente se buscó en el apartado de nutraceuticos, procedente de DrugBank [10], [15], pero no se obtuvieron resultados. Posteriormente se buscó en el de medicamentos aprobados por la FDA (FDA approved drugs) también de DrugBank [10], [15] donde tampoco se obtuvieron coincidencias.

La búsqueda continuó con la base de datos ZINC drug like en SwissSimilarity [15], [22]. Se considera que una molécula es drug-like cuando posee las propiedades fisicoquímicas que permitirían que se convirtiera en fármaco si se encontrara un receptor de dicha molécula capaz de causar cambios en una enfermedad. Normalmente se trata de moléculas que cumplen la norma de Lipinski, que pueden tomarse de manera oral y que muestran un equilibrio entre hidrofiliidad y lipofiliidad [85]. De este conjunto de moléculas drug-like procedente de ZINC se obtuvo una lista de 400 moléculas con sus códigos SMILES. En la Tabla 5 se muestran los primeros 10 compuestos de la lista.

Tabla 5. Muestra de flavonoles obtenidos de la búsqueda en ZINC drug like

Código ZINC	Similaridad	SMILES
ZINC00057675	0.992	<chem>O=c1c(O)c(oc2c1cccc2)c1cccc1</chem>
ZINC02545408	0.98	<chem>O=c1c(O)c(oc2c1ccc1c2cccc1)c1cccc1</chem>
ZINC00039289	0.976	<chem>Oc1cccc1c1oc2cccc2c(=O)c1O</chem>
ZINC12462627	0.974	<chem>Fc1ccc(cc1)c1oc2cc(C)ccc2c(=O)c1O</chem>
ZINC00039120	0.97	<chem>Cc1ccc2c(c1)c(=O)c(c(o2)c1cccc1)O</chem>
ZINC00284551	0.969	<chem>Clc1ccc(cc1)c1oc2cccc2c(=O)c1O</chem>
ZINC04723689	0.968	<chem>Fc1ccc(cc1)c1oc2cccc2c(=O)c1O</chem>
ZINC01940177	0.967	<chem>Clc1ccc2c(c1)c(=O)c(c(o2)c1cccc1)O</chem>
ZINC62723865	0.965	<chem>O=c1c(O)c(oc2c1cccc2Cl)c1cccc1</chem>
ZINC04749958	0.961	<chem>Clc1cccc1c1oc2cccc2c(=O)c1O</chem>

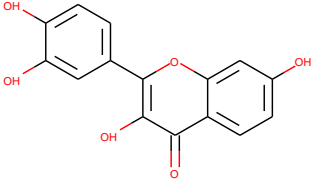
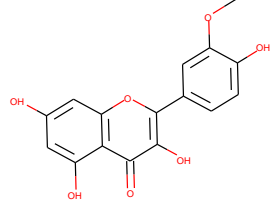
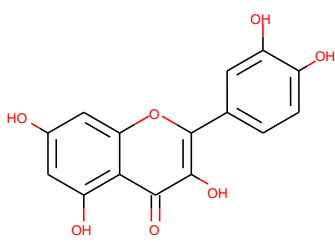
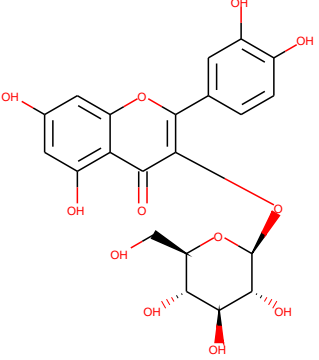
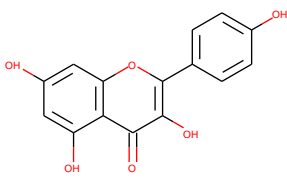
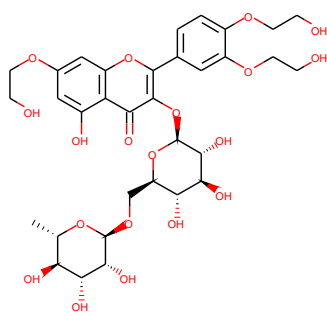
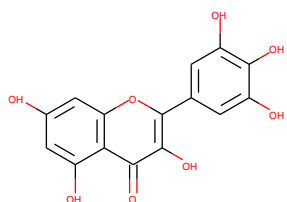
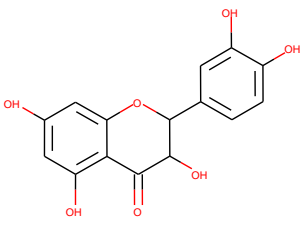
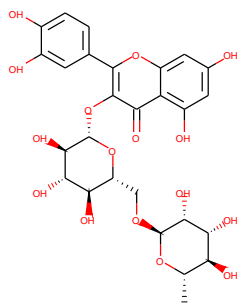
Se llevó a cabo la misma búsqueda con la base de datos de compuestos bioactivos con actividad menor a 10 μ M de ChEMBL en SwissSimilarity [15], [21], con lo que se obtuvo una segunda lista de 400 moléculas con sus códigos SMILES. En la Tabla 6, se muestran los 10 primeros compuestos de la lista.

Tabla 6. Muestra de flavonoles obtenidos en la búsqueda en ChEMBL

Código ChEMBL	Similaridad	SMILES
CHEMBL294009	0.993	<chem>OC1=C(OC2=CC=CC=C2C1=O)C1=CC=CC=C1</chem>
CHEMBL2420085	0.980	<chem>OC1=C(OC2=C(C=CC3=CC=CC=C23)C1=O)C1=C C=CC=C1</chem>
CHEMBL1097042	0.878	<chem>OC1=C2C3=C(C=CC2=CC=C1)C(=O)C=C(O3)C1= CC=CC=C1</chem>
CHEMBL144625	0.849	<chem>COC1=C(OC2=CC=CC=C2C1=O)C1=CC=CC=C1</chem>
CHEMBL2420089	0.746	<chem>COC1=C(OC2=C(C=CC3=CC=CC=C23)C1=O)C1= CC=CC=C1</chem>
CHEMBL2420102	0.713	<chem>COC1=CC=C(C=C1)C1=C(OC)C(=O)C2=CC=CC= C2O1</chem>
CHEMBL147552	0.712	<chem>OC1=CC=CC(=C1)C1=CC(=O)C2=CC=CC=C2O1</chem>
CHEMBL283196	0.641	<chem>C=C1C=C(OC2=C1C=CC1=CC=CC=C21)C1=CC= CC=C1</chem>
CHEMBL2420096	0.634	<chem>COc1ccc(cc1)c1c(O)c(=O)c2c(o1)ccc1cccc21</chem>
CHEMBL2420086	0.634	<chem>COc1ccc(cc1)c1c(O)c(=O)c2c(o1)c1cccc1cc2</chem>

Ambas listas de 400 flavonoles se combinaron en una única base de datos. Se comprobó que ninguna estructura estuviera repetida comparando sus códigos SMILES. La base de datos para realizar el cribado virtual acabó consistiendo en 800 flavonoles distintos.

Tabla 7. Estructuras 2D de los flavonoles naturales

Nombre	Estructura 2D	Nombre	Estructura 2D
Quercetina		Isorhamnetina	
Fisetina		Isoquercetina	
Kaempferol		Troxerutina	
Miricetina		Taxifolina	
Rutina			

4.4 Docking proteína-ligando

Una vez recogidas las bases de datos de compuestos inhibidores de 5-LOX y de flavonoles, comenzamos el proceso de *docking*, que consiste en el uso de un algoritmo informático que calcula cómo cada compuesto se une al *target* y con qué fuerza puede unirse.

En este trabajo, el *docking* se ha realizado con la plataforma online MTiOpenScreen [18]. Esta plataforma ofrece dos herramientas: MTiAutoDock, en la que se hace un *blind docking* de un máximo de 10 ligandos con la proteína de interés; y MTiOpenScreen, en la que se realiza un cribado virtual (*virtual screening*) de un máximo de 5000 ligandos indicándole al programa la posición del *docking* en la proteína (gracias a una “caja” teórica que marca dicha posición). La segunda opción resultaba más conveniente para este trabajo, dado que permitiría realizar el cribado de la base de datos de flavonoles construida en el paso anterior de una forma eficiente y sencilla, de modo que fue esta la herramienta utilizada tanto para el *virtual screening* de la base de datos de 800 flavonoles como para los *dockings* de los inhibidores y de los flavonoles naturales. La intención de utilizar la misma herramienta para todos los procesos de *docking* era la de minimizar errores por cambios en los algoritmos de distintas herramientas.

La herramienta de cribado virtual de MTiOpenScreen requiere que se le aporte la estructura de la proteína con la que se quieren estudiar la interacción con los potenciales ligandos, un archivo que contenga dichos ligandos e indicar las coordenadas de la caja de *docking* en la estructura de la proteína.

Para obtener tanto la estructura de la proteína como las coordenadas de la caja de *docking*, se aprovechó el conocimiento proporcionado por las dos estructuras cristalizadas del complejo proteína-inhibidor con dos inhibidores conocidos: PDB ID 6N2W, correspondiente a NDGA (*norhidroguaiaretic acid*) con 5-LOX [71]; y PDB ID 6NCF, que corresponde a AKBA (*3-O-acetyl-11-ketoboswellic acid*) con 5-LOX [71]. En la Figura 6 se encuentran representadas en dos dimensiones las estructuras de AKBA (izquierda) y NDGA (derecha).

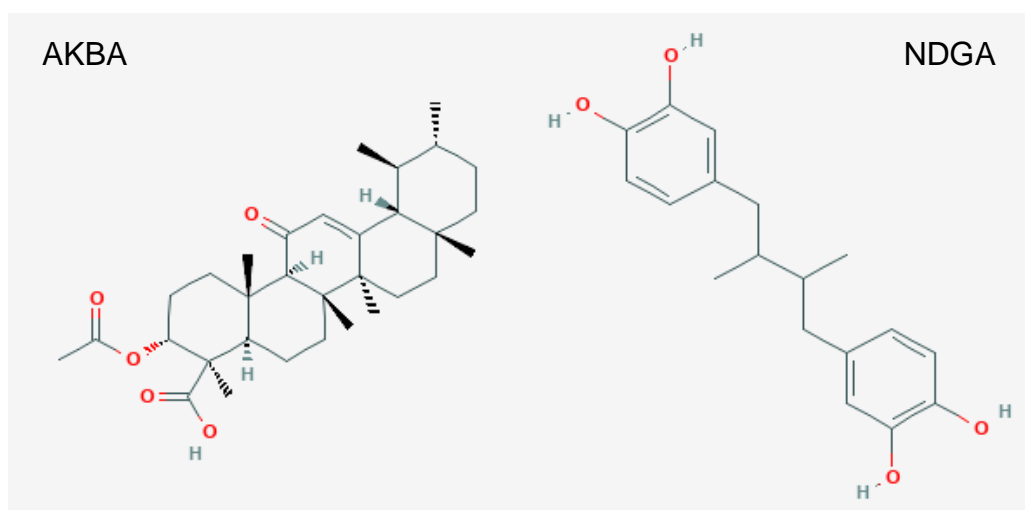


Figura 6. Estructuras 2D de AKBA y NDGA

El equipo de Gilbert et al. explica en su publicación de 2020, donde describe cómo se obtuvieron las estructuras cristalizadas de estos dos inhibidores junto a 5-LOX, que NDGA se posiciona cerca del bolsillo que rodea al sitio activo de la proteína, mientras que AKBA se posiciona entre las dos subunidades de la proteína [71]. En la Figura 7 se puede ver el distinto posicionamiento de los dos inhibidores: a la izquierda AKBA se resalta en azul sobre la estructura de 5-LOX; a la derecha se muestra a NDGA en color magenta situado en el sitio activo de 5-LOX en la estructura cristalizada.

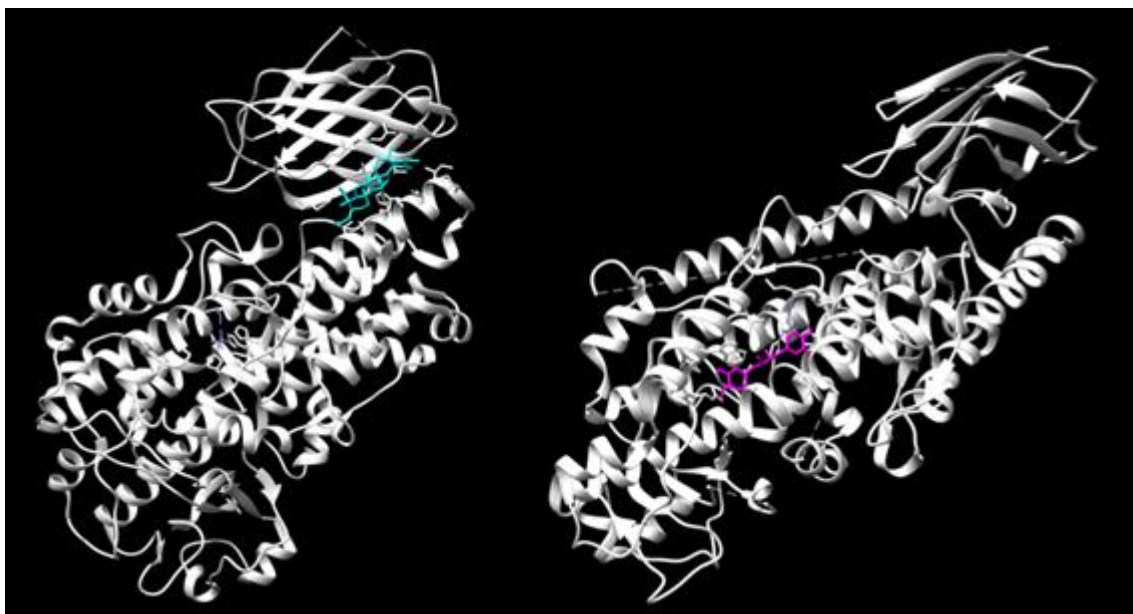


Figura 7. Estructuras cristalizadas de 5-LOX con dos inhibidores. Izq: en azul AKBA en 6NCF. Dcha: en magenta NDGA en 6N2W

En la Figura 8 se ve NDGA en magenta en su sitio de unión a 5-LOX, donde los aminoácidos marcados en azul son aquellos con los que interacciona este inhibidor, y los aminoácidos marcados en verde son los que Gilbert et al. señalaron en su publicación que rodeaban el sitio activo de la proteína [71].

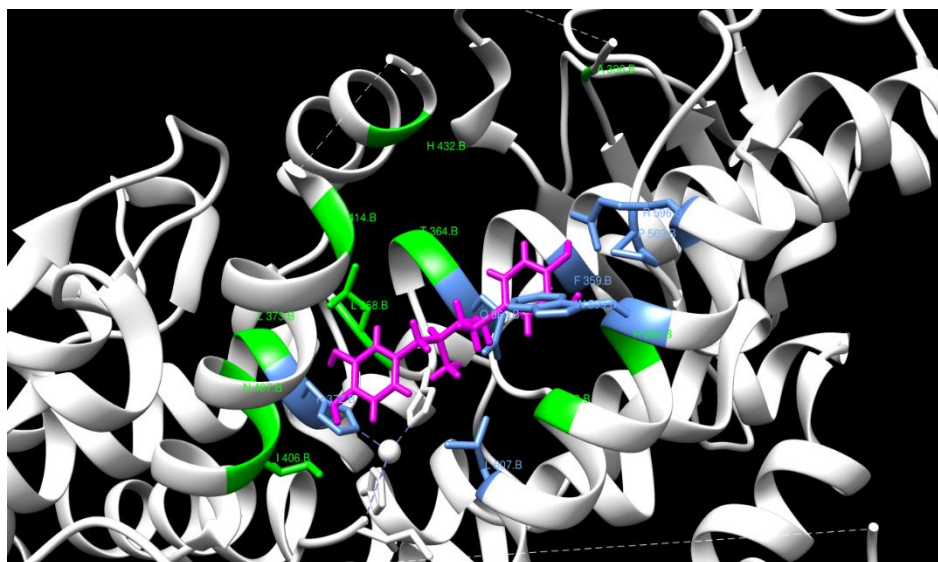


Figura 8. NDGA en la estructura cristalizada situado en el sitio activo de 5-LOX.

El hecho de que la posición de AKBA se situara tan lejana al sitio activo de la proteína se sumó al tamaño de este inhibidor y la complejidad de su estructura molecular, como puede observarse en la Figura 6, para descartar este inhibidor como referencia para hacer los *dockings*, dado que resulta más interesante encontrar moléculas que puedan unirse cerca del sitio activo de la proteína para hacer su función inhibidora. Además, se conocía por la literatura que algunos de los inhibidores recogidos en la Tabla 4 ejercen efecto en el complejo de hierro situado en el sitio activo de la proteína, como es el caso de Zileuton [55].

Por consiguiente, se utilizó la estructura 6N2W para calcular las coordenadas de la caja de *docking* basándose en la posición de NDGA en dicha estructura cristalizada. Para ello, primero se procesó el archivo PDB de 6N2W utilizando la herramienta UCSF Chimera [24]. Este archivo PDB representaba las dos copias de la proteína que conformaban la celdilla elemental del cristal: una de las dos copias (la cadena B) con el ligando acoplado y la otra no. Se eliminó, por lo tanto, la cadena A para conservar tan solo el conjunto de proteína (cadena B) e inhibidor NDGA, que se guardó en un nuevo archivo PDB. De este archivo se extrajeron las coordenadas del ligando que se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Coordenadas de la caja de *docking*

	X	Y	Z
Centro de la caja	35.86	65.30	38.34
Tamaño de la caja	17	18	26

Con intención de asegurar que el *docking* se realizaba correctamente, para obtener la estructura de la proteína se decidió utilizar este mismo archivo PDB obtenido originalmente de la estructura 6N2W, en lugar de la estructura de 5-LOX estable con PDB ID: 3O8Y representada en la Figura 5. Ambas estructuras representan a la misma proteína, pero al utilizar la proteína obtenida de 6N2W de donde se calculan las coordenadas, se garantiza que las coordenadas coincidan con el sitio de unión del inhibidor y se evitan errores por posibles cambios en el posicionamiento de la proteína representada en 3O8Y.

Para poder realizar un *docking* sin errores se han de procesar los archivos de estructura de las moléculas realizando los siguientes pasos: eliminar todos los átomos no protéicos (el solvente y los ligandos, que aparecen con el código HETATM en el archivo PDB) y protonar las moléculas a pH fisiológico (pH = 7,4). MTiOpenScreen ofrece dos posibilidades para aportar la estructura de la proteína: en formato PDB o en formato MOL2. En caso de utilizar el formato PDB, esta herramienta se encarga de preparar la estructura de la proteína para el *docking*, eliminando todos los HETATMs y añadiendo los hidrógenos correspondientes al pH fisiológico. Sin embargo, si se utiliza un MOL2, MTiOpenScreen no realiza ningún cambio sobre el archivo, por lo tanto, se ha de realizar la preparación de la proteína con otra herramienta.

Para obtener un PDB únicamente de la proteína, a partir del PDB obtenido de 6N2W con la cadena B y el inhibidor NDGA, se utilizó la herramienta UCSF Chimera para eliminar el ligando y las moléculas del solvente. Posteriormente, dado que la proteína tiene un átomo de Hierro en su centro activo, que aparece como HETATM en el archivo PDB, este archivo se modificó cambiando este

HETATM por el código ATOM para que MTiOpenScreen no lo eliminara al preparar la estructura de la proteína. Finalmente, el PDB resultante de este proceso fue el que se utilizó para todos los *dockings* con MTiOpenScreen.

Los *dockings* se organizaron en tres sesiones: la primera con los inhibidores, la segunda con los flavonoles naturales y la tercera con la base de datos de 800 flavonoles obtenidos de SwissSimilarity.

En el caso de los inhibidores conocidos, antes de realizar el *docking* se llevó a cabo una preselección de las moléculas a utilizar. El objetivo de hacer este *docking* era detectar una serie de interacciones con la proteína que se repitieran en varios inhibidores, por tanto, se buscó reunir un conjunto de inhibidores lo más variado posible evitando las redundancias estructurales y de potencia. Por eso se seleccionaron 11 inhibidores con diferentes potencias de inhibición (5 potentes, 3 débiles y 3 de potencia intermedia) y estructuras distintas entre ellos, que se pueden encontrar en las tablas Tabla 9 y Tabla 10.

Entre estos inhibidores se incluyó NDGA, del cual, como se menciona anteriormente, se dispone de la estructura cristalizada. Esto sirve para comprobar que el algoritmo de *docking* calcula de manera correcta la posición de este mismo inhibidor en la caja de *docking* proporcionada, mediante comparación de las posiciones obtenidas con el *docking* con la posición del ligando en la estructura cristalizada.

También se buscó incluir varios inhibidores por sus características específicas: zileuton por ser el único aprobado para su uso clínico; catequina porque es un producto natural con la estructura similar a los flavonoles (un flavanol); puupehenol se seleccionó también por ser un compuesto natural; phenidone se eligió porque se le considera un inhibidor específico y bien caracterizado de 5-LOX. El resto de los inhibidores seleccionados se eligieron siguiendo el criterio de la variabilidad de potencias de inhibición. Los inhibidores seleccionados para el *docking* se guardaron en una base de datos independiente para su posterior procesamiento en preparación para el *docking*.

MTiOpenScreen requiere que los ligandos proporcionados a partir de una base de datos personalizada estén protonados a pH fisiológico y con sus coordenadas 3D. Se pueden agregar hasta un máximo de 5000 compuestos en formato SDF. Para conseguir el documento SDF se utilizó OpenBabel [23] en su opción de línea de comandos, con el que se transformaron los códigos SMILES de las moléculas a SDF agregando los hidrógenos y las coordenadas 3D. Este proceso se realizó por separado para la base de datos de 11 inhibidores conocidos, la de 9 flavonoles naturales y la de 800 flavonoles de SwissSimilarity.

Con todos los datos preparados, se pudieron realizar las tres sesiones de cribado virtual con MTiOpenScreen. La herramienta MTiOpenScreen ofrece la opción de visualizar los resultados en 3D en su visor web y también la de descargar los resultados obtenidos de las 3 mejores posiciones para cada uno de los ligandos ordenados por energía de unión en un archivo en formato PDBQT. Tras finalizar cada una de las tres sesiones se descargaron los resultados en PDBQT para su posterior análisis.

Tabla 9. Inhibidores de 5-LOX seleccionados para docking

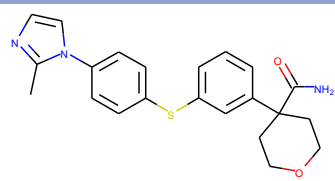
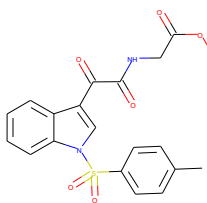
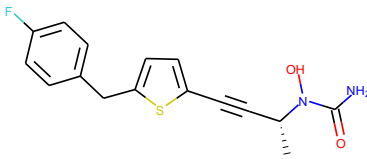
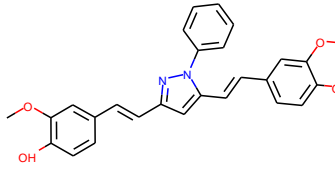
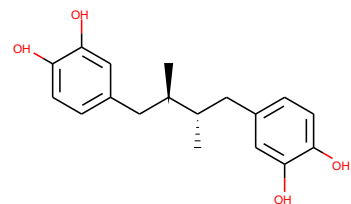
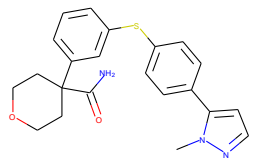
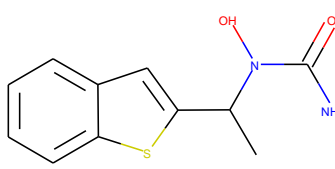
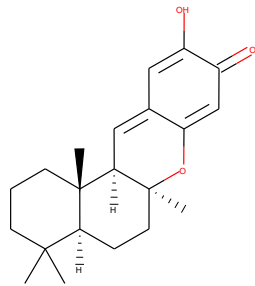
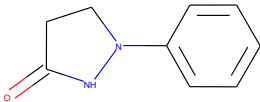
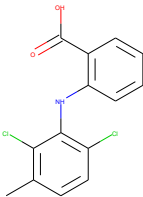
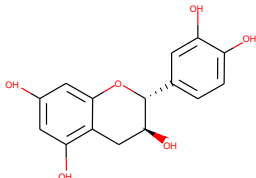
Nombre	Estructura 2D	Peso molecular (g/mol)	pIC ₅₀	IC ₅₀ (nM)
CJ-13610		393.51	8.9	1.15
CHEMBL3113612		414.44	8.0	9.70
Atreleuton		318.40	7.6	2.30E+01
CNB-001		440.50	7.2	7.00E+01
NDGA		302.37	7.0	9.00E+01
PF-4191834		393.51	6.6	2.29E+02
Zileuton		236.30	6.3	5.60E+02

Tabla 10. Inhibidores de 5-LOX seleccionados para docking (continuación)

Nombre	Estructura 2D	Peso molecular (g/mol)	pIC ₅₀	IC ₅₀ (nM)
Puupehenone		328.40	6.2	6.80E+02
Phenidone		162.19	5.7	1.90E+03
Ácido meclofenámico		296.15	4.6	2.40E+04
Catequina		290.27	4.2	5.68E+04

4.5 Estudio de las interacciones

Para poder llevar a cabo el análisis de las interacciones de los ligandos con 5-LOX se partía de los archivos PDBQT resultantes de las tres sesiones de *docking*. Con la herramienta Open Babel se separaron dichos archivos en PDB individuales que representaban la posición del ligando en cada una de las tres posiciones generadas por MTiOpenScreen.

Del inhibidor NDGA se tomaron los PDB de los tres modelos generados por MTiOpenScreen. Del resto de ligandos (inhibidores, flavonoles y flavonoles naturales) se tomó el primero de los tres modelos propuestos dado que ese es el modelo con mejor energía de unión para cada ligando. En el caso de los flavonoles de la base de datos de 800 moléculas obtenida de SwissSimilarity se eligieron los 25 primeros flavonoles de la clasificación por energía de unión realizada por MTiOpenScreen. Estos PDB individuales seleccionados se unieron al PDB de 5-LOX utilizando OpenBabel para obtener un conjunto de archivos PDB que contuvieran, cada uno, un ligando posicionado en su sitio de unión de la proteína calculado por MTiOpenScreen. En este proceso se eliminaron los hidrógenos para poder calcular las interacciones con la menor cantidad de

artefactos posible. También se tuvo en cuenta que el átomo de hierro de la proteína apareciera de nuevo como HETATM en el PDB. En total se generaron 47 archivos PDB: 3 de NDGA dockeado, 10 de los otros inhibidores, 9 de los flavonoles naturales y 25 de los flavonoles de SwissSimilarity. Además, también se tomó el PDB de NDGA con 5-LOX cristalizados para hacer un análisis de las interacciones de este inhibidor con la proteína en la posición que se obtuvo experimentalmente en el estudio de Gilbert et al. 2020 [71].

Se utilizó la herramienta online PLIP [25] para estudiar las interacciones contenidas en estos archivos PDB. Para cada conjunto de proteína-ligando, PLIP genera un archivo de texto con tablas que recogen las interacciones entre los átomos del ligando y de la proteína, indicando de qué tipo de interacción se trata. También ofrece la oportunidad de ver los resultados directamente en su página web y genera representaciones gráficas del posicionamiento de los ligandos y sus interacciones con los residuos de la proteína.

Para recoger las interacciones de los archivos de texto generados por PLIP y posteriormente analizarlas se generó un script en R [26], disponible en el siguiente enlace de GitHub: <https://github.com/riorval/TFM>. Se recopiló de cada interacción el residuo de la proteína con que se interacciona (número y tipo de aminoácido) y el tipo de interacción.

Inicialmente se compararon las interacciones de NDGA cristalizado con las de los tres modelos de NDGA dockeado para comprobar cuántas de estas se conservaban. De las que se mantenían, se hizo una comparación con las del resto de los inhibidores y se guardó la lista de aquellas que seguían conservándose entre NDGA y el resto de los inhibidores. Con esta lista de interacciones conservadas, se analizaron las de los flavonoles naturales y las de los 25 flavonoles de la base de datos personalizada. De este modo, se buscó qué flavonoles presentaban más interacciones en común con los inhibidores conocidos de la proteína.

Los resultados obtenidos durante cada paso del proceso de estudio de las interacciones se analizarán en el apartado de resultados de esta memoria.

4.6 Estudio de propiedades ADMET

Los flavonoles con mayor número de interacciones conservadas se seleccionaron para hacer un análisis de sus propiedades ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) utilizando la herramienta online pkCSM [19].

Esta herramienta tan sólo requiere la introducción del código SMILES de la molécula de la que se quieren calcular las propiedades y devuelve una tabla con los 6 descriptores que calcula para cada molécula y otra tabla con las 30 propiedades: 7 de absorción, 4 de distribución, 7 de metabolismo, 2 de excreción y 10 de toxicidad. En la Tabla 11 pueden verse las 30 propiedades ADMET en detalle.

Tabla 11. Propiedades ADMET que calcula pkCSM

Propiedad	Nombre Modelo	Unidades
Absorción	Solubilidad en agua	Numérica (log mol/L)
	Permeabilidad Caco2	Numérica (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)
	Absorción intestinal (humano)	Numérica (% Absorbido)
	Permeabilidad Piel	Numérica (log Kp)
	Sustrato P-glicoproteína	Categórica (Sí/No)
	Inhibidor P- glicoproteína I	Categórica (Sí/No)
	Inhibidor P- glicoproteína II	Categórica (Sí/No)
Distribución	VDss (humano)	Numérica (log L/kg)
	Fraction unbound (humano)	Numérica (Fu)
	Permeabilidad BBB	Numérica (log BB)
	Permeabilidad CNS	Numérica (log PS)
Metabolismo	Sustrato CYP2D6	Categórica (Sí/No)
	Sustrato CYP3A4	Categórica (Sí/No)
	Inhibidor CYP1A2	Categórica (Sí/No)
	Inhibidor CYP2C19	Categórica (Sí/No)
	Inhibidor CYP2C9	Categórica (Sí/No)
	Inhibidor CYP2D6	Categórica (Sí/No)
	Inhibidor CYP3A4	Categórica (Sí/No)
Excreción	Eliminación Total	Numérica (log ml/min/kg)
	Sustrato OCT2 Renal	Categórica (Sí/No)
Toxicidad	Toxicidad AMES	Categórica (Sí/No)
	Max. Dosis tolerada (humano)	Numérica (log mg/kg/día)
	Inhibidor hERG I	Categórica (Sí/No)
	Inhibidor hERG II	Categórica (Sí/No)
	Toxicidad Aguda Oral Rata (LD50)	Numérica (mol/kg)
	Toxicidad Crónica Oral Rata (LOAEL)	Numérica (log mg/kg_bw/ día)
	Hepatotoxicidad	Categórica (Sí/No)
	Sensibilización Piel	Categórica (Sí/No)
	Toxicidad <i>T.Pyriiformis</i>	Numérica (log ug/L)
	Toxicidad Minnow	Numérica (log mM)

5. Resultados

En este trabajo se ha adoptado una estrategia similar a la de la búsqueda de fármacos por estructura para encontrar flavonoles que puedan utilizarse para inhibir la proteína 5-LOX, una posible diana terapéutica en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Para ello, se creó una base de datos de flavonoles y se recogió información sobre inhibidores conocidos de 5-LOX para hacer con ellos un *docking* con la proteína y, de ese modo, poder utilizar las interacciones comunes entre dichos inhibidores como referencia para filtrar qué flavonoles interactúan de forma similar con la proteína de interés. En los siguientes apartados se explican los resultados obtenidos durante el desarrollo del trabajo.

5.1 Interacciones de NDGA cristalizado y NDGA en el *docking*

Como se ha comentado en la metodología, se obtuvo una estructura cristalizada de un complejo de 5-LOX con uno de sus inhibidores conocidos, llamado NDGA (del inglés Norhidroguaiaretic Acid). Se utilizó dicha estructura para calcular la zona donde hacer el *docking* (caja de *docking*) de los inhibidores y los flavonoles de la base de datos que se construyó.

En el *docking* de los inhibidores se incluyó el NDGA para poder comparar los resultados de los tres modelos de *docking* generados por la herramienta MTiOpenScreen.

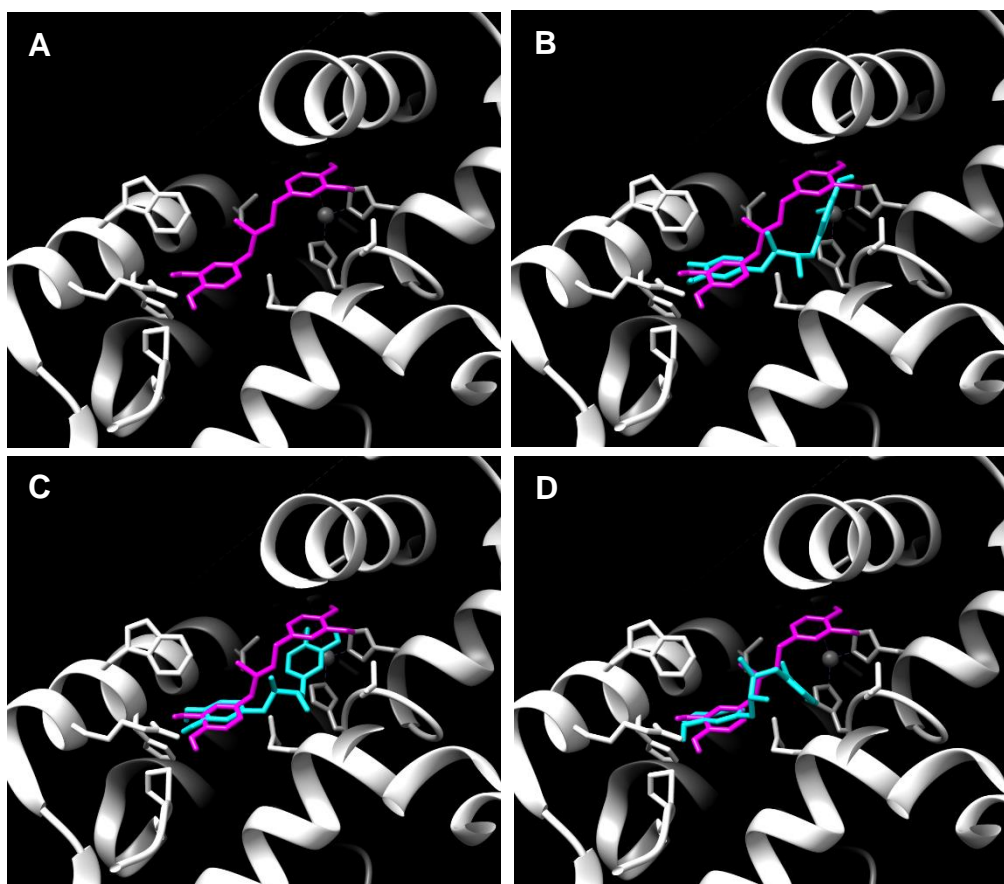


Figura 9. Posiciones NDGA: (A)Cristalizado en 6N2W. (B)Modelo 1 docking. (C)Modelo 2 docking. (D)Modelo 3 docking.

En la Figura 9 puede verse el posicionamiento del inhibidor en los tres modelos en comparación con su posición en la estructura cristalizada. La imagen A representa únicamente el NDGA (en magenta) de la estructura cristalizada 6N2W [71] posicionado en la proteína 5-LOX (en blanco). En las imágenes B, C y D se puede ver la misma estructura de NDGA cristalizado (en magenta) comparado con la posición del mismo inhibidor en los modelos 1, 2 y 3 respectivamente (en azul). Como puede observarse en estas imágenes, el algoritmo de *docking* ha posicionado el ligando en la zona correcta de la proteína. En los tres modelos se puede ver que uno de los anillos de NDGA se superpone con el de la estructura cristalizada, y en los modelos 1 y 2 (imágenes B y C) puede verse que la cadena ocupa un espacio similar a la de la estructura cristalizada. En el modelo 3 (imagen D) el inhibidor está doblado y ocupando menos espacio.

En general la visualización de la posición de NDGA en la caja de *docking* nos indica que el algoritmo ha funcionado de manera adecuada. Sin embargo, para cerciorarse de que los modelos obtenidos por MTiOpenScreen son válidos, se llevó a cabo una comparación de las interacciones del NDGA cristalizado con los modelos obtenidos de *docking*.

Tal como se explica en el apartado de estudio de las interacciones en la metodología de este trabajo, para poder llevar a cabo este estudio se recopilaron los datos obtenidos de PLIP utilizando R. En la Tabla 12 se detallan las interacciones detectadas en la estructura cristalizada de NDGA con 5-LOX en las primeras dos columnas, junto a las interacciones conservadas (incluyendo tipo de interacción, número y tipo de aminoácido) de los tres modelos generados con MTiOpenScreen. Como se ve en la tabla, la estructura cristalizada tiene 9 interacciones con 7 aminoácidos diferentes de la proteína.

Tabla 12. Interacciones NDGA cristalizado y modelos de *docking*

Tipo de interacción	NDGA cristal	NDGA Modelo 1	NDGA Modelo 2	NDGA Modelo 3
Interacción hidrofóbica	363GLN	X	X	X (x2)
Interacción hidrofóbica	599TRP			X
Interacción hidrofóbica	599TRP			X
Interacción hidrofóbica	607LEU		X	
Puente de Hidrógeno	372HIS	X	X	
Puente de Hidrógeno	569PRO			
Puente de Hidrógeno	596ARG	X	X	X
Puente de Hidrógeno	596ARG	X	X	X
pi-Stacking	359PHE	X	X	X

Al comparar estas interacciones (eliminando las repeticiones) con los 3 modelos generados por el servidor de *docking*, vemos que se conservan las interacciones con 6 de los 7 aminoácidos con los que interacciona en la estructura cristalizada. El único aminoácido con el que no se conserva la interacción es el puente de hidrógeno con 569PRO. Los dos puentes de hidrógeno con 596ARG se conservan en los tres modelos de *docking* de NDGA. Las dos interacciones hidrofóbicas con 599TRP sólo se conservan con el tercer modelo. En los tres modelos se conserva la interacción hidrofóbica con 363GLN, siendo esta interacción doble en el tercero. El pi-stacking con 359PHE también está conservado en los tres modelos. Los modelos 1 y 2 conservan el puente de

hidrógeno con la 372HIS, y sólo el modelo 2 conserva la interacción hidrofóbica con 607LEU.

En la Figura 10 se representa la estructura de NDGA cristalizado en magenta, rodeado por los 7 residuos con los que interacciona en azul.

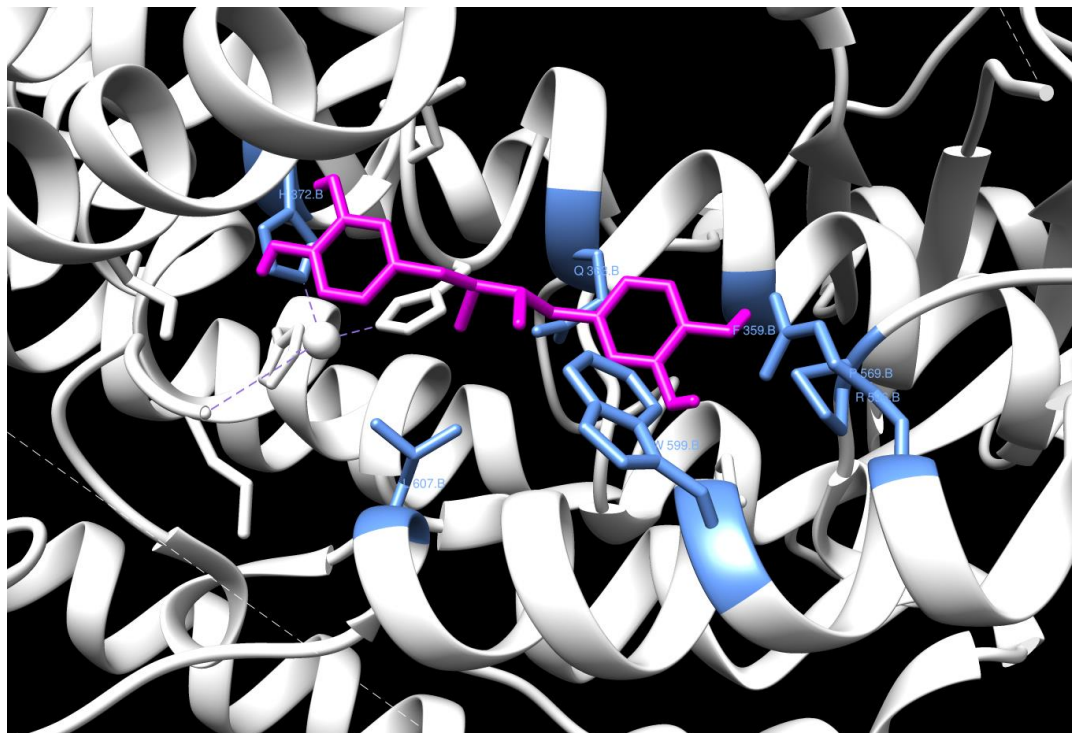


Figura 10. NDGA cristalizado con los aminoácidos con los que interacciona.

5.2 Interacciones de los inhibidores conocidos de 5-LOX

Tras comprobar que la mayoría de las interacciones se conservan entre la estructura cristalizada y los modelos de NDGA, se procedió a analizar cuáles de estas interacciones se conservaban en los inhibidores conocidos.

De la lista de 6 interacciones obtenida en el paso anterior, se observó que se mantenían las interacciones con 5 de estos aminoácidos en el resto de los inhibidores conocidos de la proteína. El puente de hidrógeno con 372HIS se pierde.

De estos inhibidores se observó que: puupehenone conserva 4 interacciones (363GLN, 599TRP, 607LEU y 596ARG), phenidone conserva 3 (363GLN, 599TRP y 359PHE) y ChEMBL3113612 conserva 3 (363GLN, 599TRP y 596ARG). Atreleuton, catequina, CJ-13610 y PF-4191834 conservan 2 de las interacciones, mientras que CNB-001, ácido meclofenámico y zileuton conservan sólo 1. Además, se comprobó que el puente de hidrógeno con 569PRO, interacción presente en la estructura cristalizada de NDGA, pero no en sus modelos de *docking*, sólo se encuentra como puente de hidrógeno en la catequina, aunque también se encuentran interacciones hidrofóbicas con 569PRO en la catequina, CNB-001, atreleuton y zileuton.

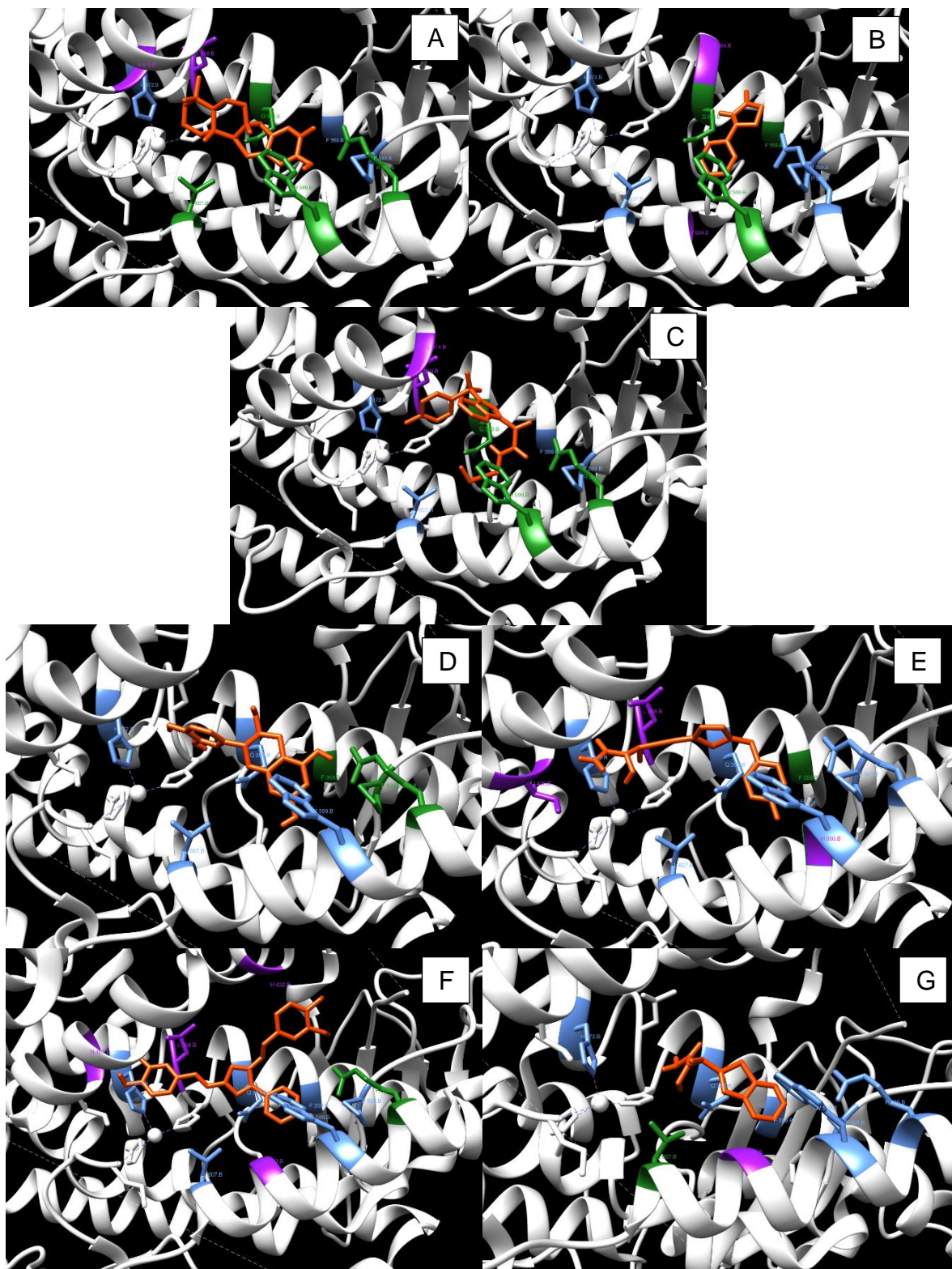


Figura 11. Inhibidores dockeados con sus interacciones (A) Puupehenone (B) Phenidone (C) CHEMBL3113612 (D) Catequina (E) Atreleuton (F) CNB-001 (G) Zileuton

En la Figura 11 se representan 7 de los inhibidores dockeados. Las imágenes A, B y C corresponden a Puupehenone, Phenidone y CHEMBL3113612 (los tres inhibidores que conservaron el mayor número de interacciones) En las otras cuatro imágenes, se representan los cuatro inhibidores que conservaron interacciones con 569PRO: en la D la catequina, que conserva en total 3 interacciones comparando con la estructura de NDGA cristalizada; en la E atreleuton, en la F CNB-001 y en la G zileuton. En todas las imágenes existe un código de color: rojo para cada inhibidor; verde para los aminoácidos conservados con los que interacciona cada inhibidor; azul para los aminoácidos con los que interacciona NDGA pero no el inhibidor; morado para aquellos aminoácidos con los que interacciona cada inhibidor pero no interaccionaba NDGA.

Al comparar las interacciones conservadas entre los distintos inhibidores se pudo ver que no existen diferencias del número de interacciones conservadas entre inhibidores con distintas potencias, de modo que no podría establecerse una correlación ente estos dos aspectos.

También se comprobó en cuántos inhibidores se repetía cada interacción: 359PHE está en 5 inhibidores, 363GLN está también en 5, 596ARG en 4, 599TRP en 4 y 607LEU en 3. Con esta información, se seleccionaron las cinco interacciones más conservadas entre los inhibidores conocidos:

Tabla 13. Interacciones conservadas en los inhibidores.

Tipo de interacción	Residuo
Interacción hidrofóbica	363GLN
Interacción hidrofóbica	599TRP
Interacción hidrofóbica	607LEU
Puente de hidrógeno	596ARG
Pi-Stacking	359PHE

5.3 Interacciones de los flavonoles

En este trabajo se construyó una base de datos de flavonoles dividida en dos bloques: por una parte, se obtuvo una lista de nueve flavonoles naturales comúnmente estudiados, que se encuentran representados en la Tabla 7, y por otra, se construyó una base de datos de 800 flavonoles a partir de búsqueda por similitud de estructura en la plataforma SwissSimilarity.

Posteriormente se llevó a cabo el *docking*: por un lado, de los 9 flavonoles naturales, y por otro, se hizo un cribado virtual de la base de datos de 800 flavonoles, de los cuales se seleccionaron los 25 que mejor energía de *docking* presentaron, los cuales se encuentran recogidos en la Tabla 14, donde se les asigna un número (ID) para facilitar su identificación durante el resto del trabajo.

De este modo, se disponía de un conjunto de 9 flavonoles naturales y 25 flavonoles resultantes del cribado virtual de los cuales analizar sus interacciones con la proteína 5-LOX. Para ello, al igual que se hizo con los inhibidores, se utilizó

la herramienta online PLIP, y los resultados obtenidos se recogieron y analizaron con R.

Tabla 14. 25 flavonoles seleccionados en el virtual screening.

ID	Identificador flavonol	Energía docking (kcal/mol)	ID	Identificador flavonol	Energía docking (kcal/mol)
1	CHEMBL466800	-10.4	14	CHEMBL479233	-9.2
2	CHEMBL466807	-10.4	15	CHEMBL2420086	-9.2
3	CHEMBL2392938	-10.1	16	CHEMBL312790	-9.2
4	CHEMBL460598	-9.8	17	ZINC00039304	-9.2
5	CHEMBL2420084	-9.6	18	ZINC00038942	-9.1
6	CHEMBL523885	-9.5	19	CHEMBL477562	-9.1
7	ZINC00039307	-9.4	20	ZINC05162588	-9.1
8	CHEMBL478439	-9.3	21	CHEMBL478440	-9.1
9	CHEMBL2420082	-9.3	22	ZINC13608151	-9.1
10	ZINC00057692	-9.3	23	CHEMBL2420083	-9.1
11	CHEMBL476731	-9.3	24	ZINC01707743	-9.1
12	ZINC00039294	-9.3	25	CHEMBL2420092	-9.1
13	ZINC00057885	-9.2			

Se utilizó la lista de interacciones de la Tabla 13. Interacciones conservadas en los inhibidores. para filtrar los flavonoles de ambos grupos descritos. Por un lado, al buscar estas 5 interacciones conservadas en las de los 9 flavonoles naturales, se pudo ver que todos estos flavonoles presentan al menos dos interacciones con la proteína de las de que se buscaban. Tres de estos flavonoles naturales (isorhamnetina, kaempferol y quercetina) presentan 4 interacciones de las 5 de la lista, siendo las mismas para los tres. En la Tabla 15 se detallan todas las interacciones de estos tres flavonoles naturales con 5-LOX.

Tabla 15. Interacciones en los flavonoles naturales seleccionados

		Quercetina	Kaempferol	Isorhamnetina
Interacciones conservadas con los inhibidores	363GLN <i>Hidrofóbica</i>	X	X	X
	599TRP <i>Hidrofóbica</i>	X	X	X
	596ARG <i>Puente Hidrógeno</i>	X	X	X
	359PHE <i>pi-Stacking</i>	X	X	X
Conservada con NDGA cristalizado	569PRO <i>Hidrofóbica</i>	X	X	X
No conservadas con los inhibidores	600HIS <i>Puente Hidrógeno</i>	X	X	X
	363GLN <i>Puente Hidrógeno</i>	X	X	X
	364THR <i>Puente Hidrógeno</i>	X	X	
	368LEU <i>Hidrofóbica</i>		X	X

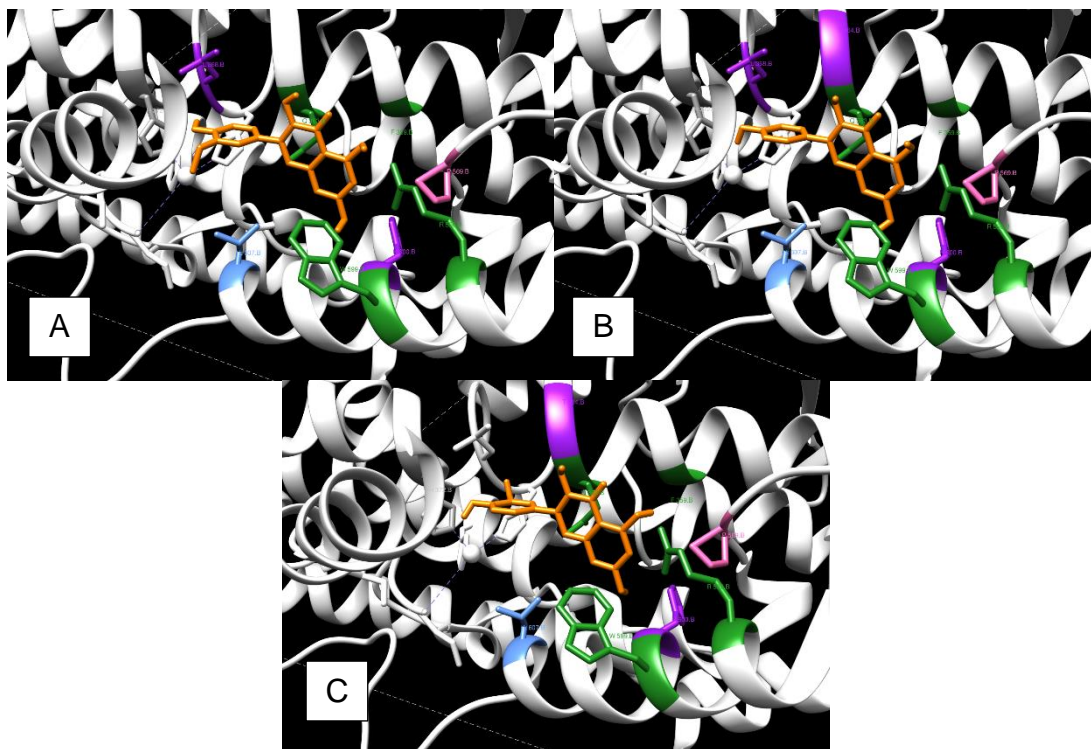


Figura 12. Flavonoles naturales dockeados en 5-LOX. (A) Isorhamnetina (B) Kaempferol (C) Quercetina

En la Figura 12 pueden verse representados los tres flavonoles naturales seleccionados: en la imagen A se encuentra la isorhamnetina, en la B el kaempferol y en la C la quercetina. En estas imágenes, los flavonoles se representan en naranja y los aminoácidos siguen un código de color según sus interacciones: en verde, las interacciones que estos flavonoles tienen en común con los inhibidores; en morado las interacciones de los flavonoles que no se corresponden con las de los inhibidores; en rosa, las interacciones que los flavonoles tienen en común con la estructura cristalizada de NDGA pero no los inhibidores; y en azul, los aminoácidos con los que interaccionan los inhibidores, pero no estos flavonoles.

Por otro lado, al buscar las 5 interacciones de la lista entre las de los primeros 25 flavonoles seleccionados de la base de datos personalizada, se observa que CHEMBL476731 (ID 11) no presenta ninguna interacción en común con los inhibidores. Sólo 6 de los 24 flavonoles restantes mantienen 4 de las 5 interacciones estudiadas, todos ellos tienen al menos una o dos por duplicado. En la Tabla 16. Interacciones de los flavonoles seleccionados de la base de datos se detallan todas las interacciones de estos 6 flavonoles con la proteína 5-LOX, dividiéndolas por categorías: interacciones en común con los inhibidores; las que se conservan con NDGA cristalizado pero no aparecen en la lista de la Tabla 13; las que el aminoácido coincide con las interacciones buscadas, pero el tipo de interacción no; y finalmente las interacciones de estos flavonoles que no aparecen en la lista obtenida de los inhibidores.

Tabla 16. Interacciones de los flavonoles seleccionados de la base de datos

		CHEMBL 2420083 (ID 23)	CHEMBL 477562 (ID 19)	ZINC 00039294 (ID 12)	ZINC 00039304 (ID 17)	ZINC 01707743 (ID 24)	ZINC 05162588 (ID 20)
Interacciones conservadas con los inhibidores	363GLN x2 <i>Hidrofóbica</i>	X	X	X	X	X	X
	599TRP <i>Hidrofóbica</i>	X		X	X	X	X
	607LEU <i>Hidrofóbica</i>	X	X	X	X (x2)	X	X
	596ARG x2 <i>Puente Hidrógeno</i>		X			X	
	359PHE <i>pi-Stacking</i>	X	X	X	X		X
Conservadas con NDGA cristalizado	372HIS <i>Puente Hidrógeno</i>			X	X		
	569PRO <i>Hidrofóbica</i>					X	
Aminoácido conservado pero no el tipo de interacción	363GLN <i>Puente Hidrógeno</i>	X	X	X	X	X	X
	359PHE <i>Hidrofóbica</i>					X	
	372HIS <i>pi-Stacking</i>				X	X	X
No conservadas con los inhibidores	367HIS <i>pi-Cation</i>	X		X			
	368LEU <i>Hidrofóbica</i>	X		X	X		
	364THR <i>Puente Hidrógeno</i>		X				
	432HIS <i>Puente Hidrógeno</i>						X

En la Figura 13 se representan estos 6 flavonoles en amarillo, en su posición de *docking* con 5-LOX. Los aminoácidos siguen un código de colores según sus interacciones con los flavonoles y con los inhibidores: en verde las interacciones que estos flavonoles tienen en común con los inhibidores; en morado las de los flavonoles que no se corresponden con las de los inhibidores; en rosa, las interacciones que los flavonoles tienen en común con la estructura cristalizada de NDGA pero no con los inhibidores; y en azul, los aminoácidos con los que interaccionan los inhibidores, pero no estos flavonoles.

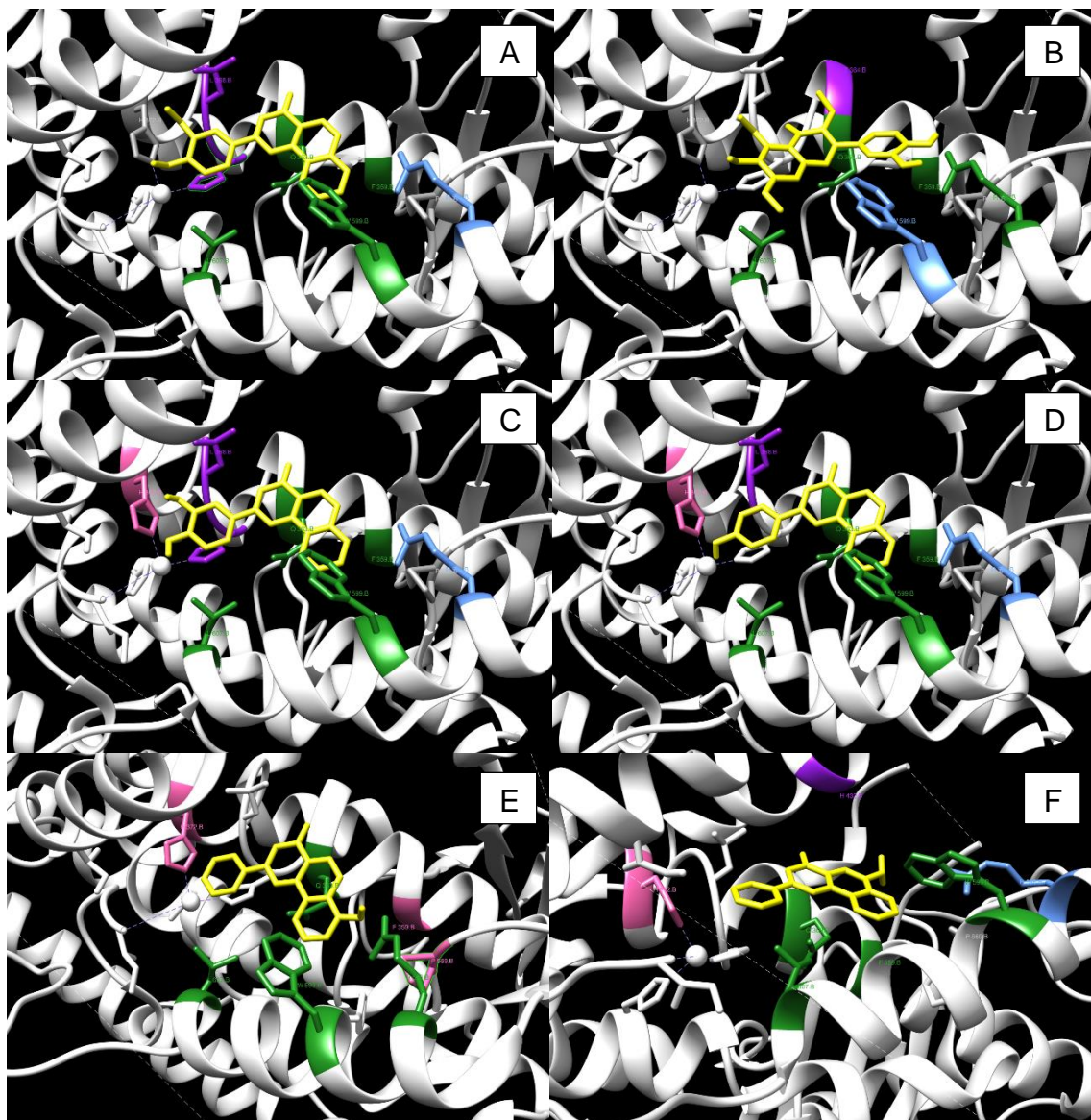


Figura 13. Flavonoles seleccionados de la base de datos: (A) ID 23 (B) ID 19 (C) ID 12 (D) ID 17 (E) ID 24 (F) ID 20

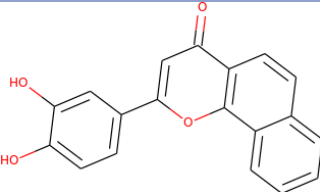
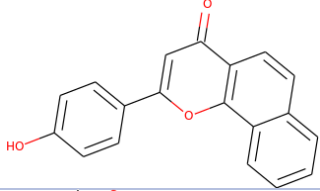
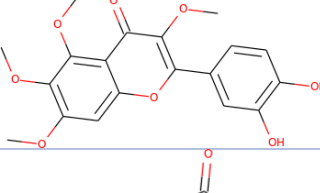
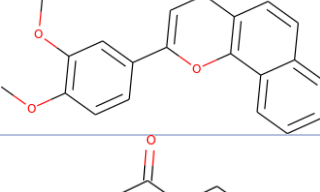
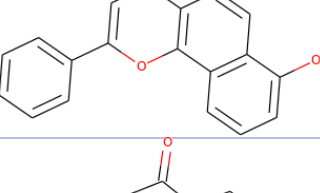
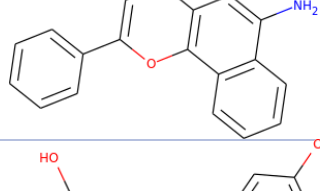
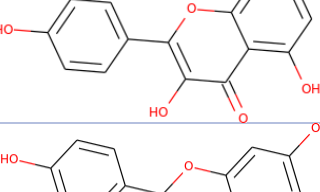
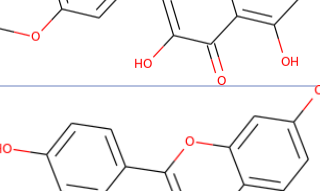
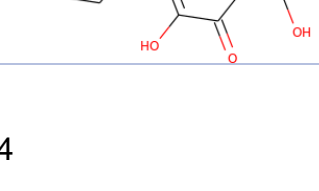
5.4 Flavonoles para ADMET

Este trabajo se basa en el estudio de las interacciones de distintas moléculas con la proteína 5-LOX. Con ello, se formula la hipótesis de que cuanto más parecidas sean las interacciones de una molécula a las que presentan los inhibidores de 5-LOX, más probable es que dicha molécula tenga también una actividad inhibidora sobre 5-LOX.

El estudio de interacciones expuesto en el apartado anterior permitió llevar a cabo un filtrado de los flavonoles recogidos al principio del trabajo para elegir aquellos con más interacciones en común con aquellas que se conservan en los inhibidores. El resultado fue un conjunto de 9 flavonoles en total (6 de la base de datos de SwissSimilarity y 3 naturales) todos ellos con 4 interacciones en común

con la lista de 5 conservadas (Tabla 13). La Tabla 17 recoge 9 flavonoles ordenados según su energía de unión a 5-LOX en kcal/mol.

Tabla 17. Flavonoles seleccionados para análisis ADMET

Flavonol	Energía anclaje (kcal/mol)	Estructura 2D	Peso molecular (g/mol)
ZINC00039294 (ID 12)	-9.3		304.301
ZINC00039304 (ID 17)	-9.2		288.302
CHEMBL477562 (ID 19)	-9.1		374.345
CHEMBL2420083 (ID 23)	-9.1		332.355
ZINC01707743 (ID 24)	-9.1		288.302
ZINC05162588 (ID 20)	-9.1		287.318
Quercetina	-7.7		302.238
Kaempferol	-7.6		286.239
Isorhamnetina	-7.5		316.265

5.5 Resultados del análisis ADMET

Con el objetivo de determinar la idoneidad de los flavonoles elegidos para su uso como inhibidores de 5-LOX en la prevención del Alzheimer, se llevó a cabo un análisis de las propiedades farmacocinéticas de cada uno de los 9 compuestos que se listan en la Tabla 17.

Las propiedades farmacocinéticas de un compuesto, o propiedades ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad), son las que describen cómo este compuesto se comportará en el organismo, desde su entrada hasta llegar al *target*, si llega a alcanzarlo, y también posteriormente en su eliminación [85]. En el proceso de diseño de fármacos resulta esencial realizar una predicción de estas propiedades para poder determinar cuáles de los compuestos candidatos continuarán estudiándose[86].

En este trabajo se ha utilizado la herramienta computacional pkCSM para predecir un total de 30 propiedades ADMET, las cuales se listan en la Tabla 11. Esta herramienta online utiliza un algoritmo de *machine learning* para predecir estas propiedades farmacocinéticas a partir de las propiedades moleculares (contenido de toxicóforos, lipofilicidad, peso molecular, etc.) y de patrones de distancia entre átomos de cada molécula [19]. En los siguientes apartados se exponen los resultados de las predicciones realizadas por pkCSM para cada uno de los 9 flavonoles seleccionados en el estudio de interacciones.

5.5.1 Propiedades moleculares de pkCSM

La herramienta online pkCSM tan solo requiere la introducción del código SMILES de cada molécula para realizar sus predicciones. A partir de esto, calcula una serie de descriptores que caracterizan la molécula. En la Tabla 18 se recogen las propiedades moleculares mostradas por pkCSM en cada predicción:

Tabla 18. Propiedades físico-químicas calculadas por pkCSM

Compuesto	Peso molecular	LogP	Nº Enlaces rotativos	Nº Aceptores	Nº Donantes	Área de superficie
ZINC00039294	304.301	4.0244	1	4	2	130.407
ZINC00039304	288.302	4.3188	1	3	1	125.612
CHEMBL477562	374.345	2.9056	5	8	2	153.639
CHEMBL2420083	332.355	4.6304	3	4	0	143.775
ZINC01707743	288.302	4.3188	1	3	1	125.612
ZINC05162588	287.318	4.1954	1	3	1	126.158
Quercetina	302.238	1.9888	1	7	5	122.108
Kaempferol	286.239	2.2824	1	6	4	117.313
Isorhamnetina	316.265	2.2910	2	7	4	128.792

El LogP representa la lipofilicidad, es decir, el ratio en equilibrio de la concentración del compuesto entre una fase líquida y una fase oleosa [86]. LogP tiene una influencia significativa en las propiedades farmacocinéticas de los compuestos.

El número de aceptores y donantes de puentes de hidrógeno influye en el tipo de interacciones que tendrá la molécula dentro del organismo. Estas

propiedades caracterizan la permeabilidad a través de las membranas biológicas, de tal manera que, si un compuesto tiene la capacidad de formar muchos puentes de hidrógeno con su entorno, puede ser desfavorable para su absorción [86].

En cuanto al número de enlaces rotativos, son aquellos enlaces fuera de los anillos que unen aquellos átomos que no son hidrógeno, y pueden representar la flexibilidad de la molécula e influir en su biodisponibilidad [87].

Por último, el área de superficie se refiere a la superficie polar de la molécula, un descriptor comúnmente investigado que está relacionado con la formación de puentes de hidrógeno y es importante para la permeabilidad y biodisponibilidad de un fármaco [88].

5.5.2 Absorción

Cuando un fármaco entra en el organismo, debe atravesar las membranas de muchas células hasta alcanzar su sitio de acción. Las propiedades relacionadas con la absorción de este análisis sirven para describir cómo entrará cada compuesto en el organismo y por qué tejido se absorberá. Con pkCSM se calculan 7 propiedades de absorción: 3 categóricas y 4 numéricas [19]. En la Tabla 19 se detallan los resultados de su predicción en los 9 flavonoles.

La solubilidad en agua se calcula como logS de una molécula en agua a 25°C [19]. La eficacia de un fármaco suele depender de su solubilidad, ya que, si el compuesto tiene una solubilidad pobre, se eliminará del organismo antes de haber llegado a actuar en su tejido diana [86]. En la Tabla 19 se puede ver que las moléculas que presentan mejor solubilidad son los tres flavonoles naturales y el flavonol CHEMBL477562 (ID 19).

Caco-2 es una línea celular inmortalizada de células de adenocarcinoma epitelial colorrectal humano que se utiliza para predecir *in vitro* la absorción de fármacos administrados oralmente. Se calcula como el logaritmo del coeficiente de permeabilidad aparente (log Papp; log cm/s) [89]. Las moléculas que presentan mejores cifras de permeabilidad son CHEMBL477562 (ID 19) y CHEMBL2420083 (ID 23).

Se considera que un compuesto con absorción intestinal menor al 30% tiene absorción pobre [19]. En el caso de estos 9 flavonoles, todos presentan porcentajes de absorción mayores del 70%, por lo que no supondrían un problema en este aspecto. Por otra parte, la permeabilidad en piel en este caso no sería relevante, dado que los flavonoles no se administrarían por vía cutánea.

La glicoproteína P es una enzima transportadora que actúa como una barrera biológica e impide la entrada de toxinas y xenobióticos a las células. Si un compuesto es sustrato de esta enzima, podrá acceder a las células para llevar a cabo su función [86]. En este caso, todos los flavonoles son sustratos de la glicoproteína P excepto CHEMBL2420083 (ID 23), que es inhibidor de dicha proteína. Las moléculas que inhiben a la glicoproteína P pueden influir en la farmacocinética de otros compuestos, lo cual podría ser una ventaja o un

inconveniente. Los únicos flavonoles inocuos para esta proteína son los tres flavonoles naturales (quercetina, Isorhamnetina y kaempferol).

Tabla 19. Propiedades de Absorción de los flavonoles seleccionados

Compuesto	Solubil. en agua (log mol/L)	Permeab. Caco2 (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)	Absorción intestinal (humano) (% Absorbido)	Permeab. Piel (log Kp)	Sustrato glicopr. P	Inhibidor glicopr. P I	Inhibidor glicopr. P II
ZINC00039294	-4.780	0.569	92.841	-2.722	Sí	No	Sí
ZINC00039304	-5.746	1.386	95.292	-2.685	Sí	No	Sí
CHEMBL477562	-3.441	1.420	80.433	-2.735	Sí	No	Sí
CHEMBL2420083	-4.283	1.411	99.830	-2.734	No	Sí	Sí
ZINC01707743	-6.386	1.243	94.386	-2.736	Sí	No	Sí
ZINC05162588	-5.198	1.260	94.649	-2.764	Sí	No	Sí
Quercetina	-2.925	-0.229	77.207	-2.735	Sí	No	No
Kaempferol	-3.040	0.032	74.290	-2.735	Sí	No	No
Isorhamnetina	-3.000	-0.003	76.014	-2.735	Sí	No	No

5.5.3 Distribución

Tras la absorción, la molécula se distribuye a su sitio de acción a través de los sistemas circulatorios: el sistema sanguíneo y el linfático. Los parámetros que forman parte de este bloque intentan describir cómo llegará la molécula a los tejidos y a qué tejidos llegará con mayor facilidad. El algoritmo de pkCSM calcula cuatro propiedades de distribución, todas ellas son predicciones numéricas [19].

La VD_{ss} es el volumen de distribución, que se define como el volumen teórico que la dosis total de un fármaco necesitaría para distribuirse uniformemente y dar las mismas concentraciones en tejidos y en plasma. Si es alto, significa que este fármaco se distribuye más en tejido que en plasma. Se calcula como el logaritmo del volumen de distribución (log L/kg) [19]. En la Tabla 20 se puede ver que los tres flavonoles naturales, que presentan log VD_{ss} mayores que 0.45, se distribuyen mejor en tejido, mientras que los flavonoles ZINC00039294 (ID 12), CHEMBL477562 (ID 19), ZINC01707743 (ID 24) y ZINC05162588 (ID 20), todos con log VD_{ss} menores que -0.15, tendrían mayores concentraciones en plasma que en tejido.

Los fármacos en plasma pueden encontrarse en dos estados: libres o ligados a proteínas del plasma. La mayoría de los fármacos se mantienen en equilibrio entre estos dos estados, sin embargo, los fármacos unidos a proteínas del plasma no tienen efecto farmacológico, dado que las moléculas en este estado serán menos eficientes para atravesar las membranas celulares o difundirse [85]. La fracción libre (F_u del inglés fraction unbound) representa el valor predicho de la parte que se encontraría en plasma sin unirse a proteínas de la sangre [19]. Los flavonoles con mejores predicciones de fracción libre son ZINC00039304 (ID 17) y CHEMBL2420083 (ID 23).

La barrera entre el cerebro y la sangre (BBB del inglés blood-brain barrier) es aquella que protege al cerebro de los compuestos exógenos [90]. En el caso

de este trabajo, la permeabilidad BBB es especialmente importante, dado que se busca actuar sobre las enzimas 5-LOX localizadas precisamente en el cerebro, el órgano donde se dan lugar todos los mecanismos patológicos involucrados en el Alzheimer. La permeabilidad BBB se mide *in vivo* en animales modelo. El algoritmo de pkCSM calcula la permeabilidad BBB como el ratio logarítmico de concentraciones del fármaco en el cerebro y el plasma. Se considera que si un fármaco tiene un logBB mayor que 0.3 tiene una muy buena permeabilidad de la BBB, mientras que si tiene un valor menor que -1 su distribución en el cerebro será pobre [19]. En el caso de los flavonoles que se estudian, ninguno tiene un logBB mayor que 0.3, el único que presenta un valor cercano es ZINC01707743 (ID 24), como se ve en la Tabla 20. Sin embargo, dos de los flavonoles naturales presentan valores que indican una pobre distribución en el cerebro: quercetina y isorhamnetina.

En ocasiones la medición de la permeabilidad BBB resulta complicada. La permeabilidad CNS (del inglés Central Nervous System) es una medida más directa que se realiza *in situ* mediante perfusión cerebral del compuesto inyectado en la arteria carótida. Se mide como logPS y se considera que si un compuesto tiene un logPS mayor que -2 es capaz de penetrar el Sistema Nervioso Central, mientras que si presenta un logPS menor que -3 no es capaz de penetrarlo [19]. Esta medida también es especialmente relevante en este caso, dado que lo ideal sería elegir flavonoles que puedan penetrar el Sistema Nervioso Central. Cinco de los flavonoles tienen dicha capacidad: ZINC00039294 (ID 12), ZINC00039304 (ID 17), CHEMBL2420083 (ID 23), ZINC01707743 (ID 24) y ZINC05162588 (ID 20). Sin embargo, los dos flavonoles naturales que presentaban peor permeabilidad de la BBB también tienen una pobre permeabilidad CNS, además de CHEMBL477562 (ID 19).

Tabla 20. Propiedades de Distribución de los flavonoles seleccionados

Compuesto	VDss (humano) (log L/kg)	Fracción libre (humano) (Fu)	Permeabilidad BBB (log BB)	Permeabilidad CNS (log PS)
ZINC00039294	-0.411	0.153	-0.159	-1.743
ZINC00039304	-0.060	0.263	0.250	-1.494
CHEMBL477562	-0.273	0.099	-0.966	-3.774
CHEMBL2420083	-0.010	0.29	0.202	-1.337
ZINC01707743	-0.651	0.165	0.284	-1.472
ZINC05162588	-0.437	0.202	0.194	-1.413
Quercetina	1.559	0.206	-1.098	-3.065
Kaempferol	1.274	0.178	-0.939	-2.228
Isorhamnetina	1.123	0.091	-1.135	-3.188

5.5.4 Metabolismo

Las propiedades relacionadas con el metabolismo de una molécula determinan cómo ésta se descompondrá dentro del organismo y qué enzimas se encargarán de hacerlo. Los citocromos P450 (CYP450) son una superfamilia de proteínas que contienen el grupo hemo encargadas de catalizar las reacciones

oxidativas de muchos compuestos [85]. Se encuentran principalmente en el hígado y son cruciales para la detoxificación del organismo. Dos isoformas de esta enzima, la 2D6 y la 3A4, son las principales responsables del metabolismo de muchos fármacos. Además, una gran variedad de fármacos se activa o desactiva por acción de algunas isoformas de esta enzima, por lo que aquellos compuestos que sean inhibidores del CYP450 pueden tener efectos negativos en el metabolismo de fármacos, lo que provoca que su uso esté contraindicado. Se considera que un compuesto es inhibidor de P450 si la concentración requerida para llegar a una inhibición del 50% es menor a 10uM [19]. El algoritmo de pkCSM predice si un compuesto será sustrato de CYP2D6 y CYP3A4 o inhibidor de cinco isoformas del CYP450: 1A2, 2C19, 2C9, 2D6 y 3A4.

En la Tabla 21 se puede ver que entre los 9 flavonoles que se han tomado para este estudio, ninguno sería sustrato de CYP2D6, y sólo 5 serían sustratos de CYP3A4: ZINC00039294 (ID 12), ZINC00039304 (ID 17), CHEMBL2420083 (ID 23), ZINC01707743 (ID 24) y ZINC05162588 (ID 20). Estos resultados señalan que las dos isoformas de CYP450 más importantes en el metabolismo de fármacos no tendrían efecto sobre los tres flavonoles naturales y CHEMBL477562 (ID19). Sin embargo, existen muchas otras isoformas de CYP450 que no están incluidas en esta predicción de pkCSM, de modo que estos datos no tendrían por qué suponer que se descarten estos flavonoles.

En cuanto a la inhibición de los CYP450, se puede observar que el CYP1A2 es inhibido por los 9 flavonoles. El resto de las isoformas de CYP450 no se inhibirían con ninguno de los tres flavonoles naturales (quercetina, isorhamnetina y kaempferol), y del resto de flavonoles, CHEMBL477562 (ID 19) sería el que inhibiría menor número de isoformas de CYP450, por detrás de los flavonoles naturales ya mencionados.

Tabla 21. Propiedades de Metabolismo de los flavonoles seleccionados

Compuesto	Sustrato CYP2D6	Sustrato CYP3A4	Inhibidor CYP1A2	Inhibidor CYP2C19	Inhibidor CYP2C9	Inhibidor CYP2D6	Inhibidor CYP3A4
ZINC00039294	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No
ZINC00039304	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
CHEMBL477562	No	No	Sí	No	No	No	Sí
CHEMBL2420083	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No
ZINC01707743	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí
ZINC05162588	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí
Quercetina	No	No	Sí	No	No	No	No
Kaempferol	No	No	Sí	No	No	No	No
Isorhamnetina	No	No	Sí	No	No	No	No

En esta misma tabla puede observarse que los flavonoles que inhiben la menor cantidad de isoformas de CYP450, son los que no son sustratos de CYP2D6 y CYP3A4.

5.5.5 Excreción

La excreción es el término que se utiliza para referirse a la eliminación irreversible de un fármaco en el organismo. Este proceso reduce la concentración del fármaco en su sitio de acción. Una eliminación lenta ayuda a acumular la concentración de fármaco necesaria para mantener sus efectos terapéuticos. El riñón es el principal órgano para la excreción de fármacos y sus metabolitos a través de la orina, aunque algunas moléculas pueden eliminarse a través del intestino en la excreción biliar o hepática [85]. El algoritmo de pkCSM hace predicciones de dos variables relacionadas con la excreción: sustrato sus OCT2 renal (categórica) y la eliminación total (numérica) [19].

La enzima OCT2 (Organic Cation Transporter 2) es una proteína de transporte renal que tiene un papel importante en la eliminación de fármacos por vía renal. Los sustratos de OCT2 también tienen el potencial de causar efectos adversos con inhibidores de dicha proteína [19]. En el caso de los flavonoles que se estudian en esta parte del trabajo, ninguno sería sustrato de esta enzima. Esto no quiere decir que su eliminación sea difícil, sin embargo, es un buen indicativo de que no interaccionarán con otros fármacos administrados.

La eliminación total se mide por la constante de proporcionalidad CL_{tot} y ocurre por combinación de eliminación hepática y renal. También influye en la biodisponibilidad de los compuestos y en la dosis requerida. En la Tabla 22 se recogen los datos de log(CL_{tot}) para los 9 flavonoles estudiados. Puede verse que CHEMBL477562 (ID 19) es el que presenta el mayor valor, y ZINC00039294 (ID 12) el menor. Estos valores pueden dar una idea de cuánto tiempo permanecerán estos compuestos en el organismo.

Tabla 22. Propiedades de Excreción de los flavonoles seleccionados

Compuesto	Eliminación Total (log ml/min/kg)	Sustrato OCT2 Renal
ZINC00039294	0.307	No
ZINC00039304	0.369	No
CHEMBL477562	0.875	No
CHEMBL2420083	0.475	No
ZINC01707743	0.374	No
ZINC05162588	0.435	No
Quercetina	0.407	No
Kaempferol	0.477	No
Isorhamnetina	0.508	No

5.5.6 Toxicidad

La toxicidad de un fármaco se refiere al daño que puede causar en un organismo. Los efectos tóxicos dependen de la dosis y pueden afectar a todo un sistema o a un solo órgano. Las dosis que producen toxicidad suelen ser mayores que las requeridas para conseguir la eficacia terapéutica del compuesto

[91]. El algoritmo de pkCSM calcula 10 de estas propiedades: la mitad son categóricas y la otra mitad numéricas [19], predicciones que se recogen en la Tabla 23.

El test AMES es una prueba ampliamente utilizada para determinar el potencial mutagénico de un compuesto. Se utiliza una bacteria *Salmonella typhimurium* para realizar este ensayo y se usa la mutagenicidad en la bacteria para determinar si el compuesto es carcinógeno [92]. En la Tabla 23 se observa que 5 de los flavonoles tendrían potencial mutagénico. Sólo los tres flavonoles naturales y CHEMBL477562 (ID 19) son negativos.

La dosis máxima tolerada en humanos muestra la estimación del umbral de dosis tóxica. Este valor sirve como guía para calcular las dosis con las que probar nuevos fármacos en la fase I de ensayos clínicos. Se considera que si el valor es menor o igual a $0.477 \log(\text{mg/kg/día})$ es bajo y si es mayor, es alto [19], de modo que cuanto mayor es el valor, menor toxicidad presenta ese compuesto. El único flavonol que presenta una dosis máxima tolerada baja es ZINC00039294 (ID 12).

El bloqueo de los canales de potasio codificados por el gen hERG (del inglés human ether-à-go-go gene) por influencia de fármacos es la principal causa de arritmias, prolongación de la repolarización ventricular y torsades de pointes (un tipo de taquicardia ventricular poco frecuente), trastornos que pueden resultar fatales [93]. Muchos inhibidores de estos canales se han descartado en el proceso de desarrollo de fármacos porque su uso no se recomienda. De los flavonoles que se estudian en este trabajo, ninguno presentaría acción inhibitoria del hERG I, y sólo los flavonoles que no pertenecen a la lista de flavonoles naturales más utilizados inhiben a hERG II.

La dosis letal (LD_{50}) de un compuesto es una medida de su toxicidad aguda y se utiliza para relacionar la toxicidad entre moléculas distintas. LD_{50} se calcula como la cantidad de un compuesto necesaria para causar la muerte del 50% de un grupo de prueba de animales de laboratorio [19]. En la Tabla 23 se puede ver que todos los flavonoles estudiados presentan valores de toxicidad aguda predichos muy similares.

La toxicidad crónica es de interés cuando se busca un fármaco que vaya a utilizarse en tratamientos a largo plazo. El término LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect) identifica la dosis más baja a la que se observan efectos adversos [19]. Aunque estas cifras deberían interpretarse en relación con la concentración bioactiva y la duración del tratamiento, en la Tabla 23 podemos ver que los tres flavonoles naturales y CHEMBL477562 (ID 19) son los que presentan valores más altos, lo que indica que sus LOAEL serán mayores que las del resto de compuestos de este análisis.

El daño hepático provocado por el consumo de fármacos es un factor importante a tener en cuenta en el desarrollo de fármacos. Si un compuesto genera al menos un efecto patológico en el hígado que pueda llevar a una disrupción de la función normal de este órgano, se considera que es hepatotóxico

y por tanto su uso no se recomienda. Los tres flavonoles naturales y CHEMBL477562 (ID 19) son los únicos que no provocarían daños hepáticos.

La sensibilización de la piel se tiene en cuenta en caso de fármacos aplicados de manera tópica. En el caso que se estudia en este trabajo, este factor no sería relevante, pero, de todas formas, ninguno de los flavonoles estudiados provocaría problemas de sensibilización de la piel.

Dos parámetros importantes en el descubrimiento de fármacos son las toxicidades en *Tetrahymena pyriformis* y en Minnow, que son las concentraciones de un compuesto necesarias para inhibir al 50% el crecimiento de la bacteria *T. Pyriformis*, un protozoo muy utilizado en ensayos de toxicidad, y del pez *Pimephales promelas*, conocido como fathead Minnow [94].

Para *T. Pyriformis*, se calcula como el logaritmo negativo de IGC₅₀ (*Inhibition Growth Concentration*). Cuando el valor pIGC₅₀ es mayor que -0.5 log ug/L, el compuesto se considera tóxico. Si se toma este criterio, todos los flavonoles presentan grados de toxicidad muy similares en esta bacteria, lo que indica que tienen propiedades antibacterianas, pero no quiere decir que sean tóxicos en humanos [94].

La toxicidad Minnow es importante en la evaluación de toxicidad medioambiental en agua de un compuesto [95]. Los valores de concentración letal LC₅₀ representan la concentración necesaria para causar la muerte del 50% de Minnows. El algoritmo de pkCSM calcula este tipo de toxicidad como el logaritmo de LC50 [19]. Se considera que un compuesto presenta alta toxicidad si su log LC50 es menor que -0.3, por lo tanto, los flavonoles CHEMBL2420083 (ID 23) y ZINC01707743 (ID 24) serían altamente tóxicos en el medio acuático, especialmente el primero de estos dos.

Tabla 23. Propiedades de Toxicidad de los flavonoles seleccionados

Compuesto	Tox. AMES	Max. Dosis (humano) (log mg/kg/día)	Inhib. hERG I	Inhib. hERG II	Tox. Aguda Oral Rata (LD ₅₀) (mol/kg)	Tox. Crónica Oral Rata (LOAEL) (log mg/kg_b w/ día)	Hepatotoxicidad	Sens. Piel	Tox. T.Pyriformis (log ug/L)	Tox. Minnow (log mM)
ZINC00039294	Sí	0.179	No	Sí	2.704	1.097	Sí	No	0.306	1.104
ZINC00039304	Sí	0.526	No	Sí	2.428	1.967	Sí	No	0.332	0.002
CHEMBL477562	No	0.766	No	Sí	2.466	2.893	No	No	0.285	0.047
CHEMBL2420083	Sí	0.651	No	Sí	2.618	1.876	Sí	No	0.287	-2.482
ZINC01707743	Sí	0.543	No	Sí	2.374	0.933	Sí	No	0.313	-0.500
ZINC05162588	Sí	0.744	No	Sí	2.506	1.296	Sí	No	0.294	0.192
Quercetina	No	0.499	No	No	2.471	2.612	No	No	0.288	3.721
Kaempferol	No	0.531	No	No	2.449	2.505	No	No	0.312	2.885
Isorhamnetina	No	0.576	No	No	2.407	2.499	No	No	0.296	2.206

5.6 Selección final de flavonoles

Tras el análisis de las propiedades ADMET de los 9 flavonoles filtrados con el estudio de las interacciones con la proteína 5-LOX, se pueden observar ciertos patrones que sirven para agrupar estas moléculas según su comportamiento en el organismo.

Se puede ver que, en conjunto, los tres flavonoles naturales (quercetina, isorhamnetina y kaempferol), presentan unas propiedades farmacocinéticas muy similares. Los perfiles de éstos indican que son los más inofensivos para el organismo: no son inhibidores de los CYP450, excepto de la isoforma 1A2, y tampoco resultan tóxicos, excepto en la de la bacteria *T. Pyriformis*. Esto tiene sentido dado que son compuestos que se consumen habitualmente en los alimentos naturales [59], [64].

Además de estos tres, uno de los seis flavonoles procedentes de la base de datos creada con SwissSimilarity, presenta propiedades ADMET similares a los naturales. Se trata de CHEMBL477562 (ID 19), con nombre IUPAC 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,6,7-tetramethoxychromen-4-one. Aunque su estructura molecular difiere de las de los tres flavonoles naturales (Tabla 17), en la Tabla 18 puede verse que, de los flavonoles de la base de datos personalizada, es el que tiene una lipofilicidad (LogP) más similar a los naturales. Esto influye en que se absorba como lo hacen los otros tres, aunque su similitud con estos va más allá: su perfil de toxicidad es muy similar, tan sólo cambia en la capacidad de inhibición de hERG II (Tabla 23); y su comportamiento con respecto a los CYP450 es prácticamente el mismo, cambiando sólo que es capaz de inhibir, además del CYP1A2, a la isoforma 3A4 de esta enzima, mientras los tres flavonoles naturales no lo hacen.

En cuanto al resto de flavonoles de la base de datos personalizada, sus perfiles ADMET revelan que no serían buenos candidatos para utilizar como compuesto farmacológico. Especialmente cuatro de ellos: ZINC00039294 (ID 12), CHEMBL2420083 (ID 23), ZINC01707743 (ID 24) y ZINC05162588 (ID 20). Estos compuestos presentan muchas interacciones con los CYP450 y también podrían suponer tóxicos para los humanos por sus predicciones de toxicidad AMES, inhibición de hERG II y hepatotoxicidad. Además, CHEMBL2420083 (ID 23) y ZINC01707743 (ID 24) podrían ser tóxicos en medios acuáticos, lo cual los hace menos favorables en caso de su comercialización como fármaco. Debido a las predicciones de sus propiedades ADMET, estos cuatro compuestos quedarían descartados para futuros ensayos.

Se mantienen, por tanto, los cuatro flavonoles que han presentado las mejores características ADMET: quercetina, isorhamnetina, kaempferol y CHEMBL477562 (ID 19). Hay dos propiedades especialmente interesantes para este trabajo en las que se encuentran diferencias entre estos compuestos. Se trata de las permeabilidades BBB y CNS; propiedades que determinan si un compuesto sería capaz de entrar al cerebro, lo cual resulta crucial en la búsqueda de un tratamiento para el Alzheimer. Por ello son determinantes en la elección de aquellos compuestos que continúen en los posteriores análisis y ensayos de desarrollo del fármaco.

En la Tabla 20 se puede ver que quercetina y isorhamnetina presentan valores de permeabilidad BBB (log BB) menores a -1, lo que indica que su permeabilidad a través de la barrera entre el cerebro y la sangre sería pobre. Esto significaría que, aunque estos flavonoles pudieran ser buenos inhibidores de 5-LOX, si no entran en el cerebro no pueden ejercer su función terapéutica. Además, al analizar sus predicciones de permeabilidad CNS, se puede ver que sus valores de logPS son menores que -3, por lo que tampoco serían capaces de penetrar el Sistema Nervioso Central incluso mediante perfusión cerebral. Por estos motivos habría que descartar estos dos flavonoles para el tipo de tratamiento que se busca.

También existen diferencias relevantes entre los dos flavonoles que restan (kaempferol y CHEMBL477562 (ID 19)). Además de que CHEMBL477562 (ID 19) presenta más propiedades desfavorables que kaempferol, ya que sería inhibidor de CYP3A4 y de hERG II, la principal característica que haría que se descartara es que tampoco tendría permeabilidad CNS, tal y como ocurría con quercetina e isorhamnetina.

Por estos motivos, kaempferol es el flavonol que mejores propiedades ADMET reúne de los estudiados en este análisis, dado que es un compuesto seguro, con baja toxicidad, buena capacidad de absorción y posibilidad de atravesar la barrera BBB y llegar al cerebro donde tendría que ejercer su función terapéutica.

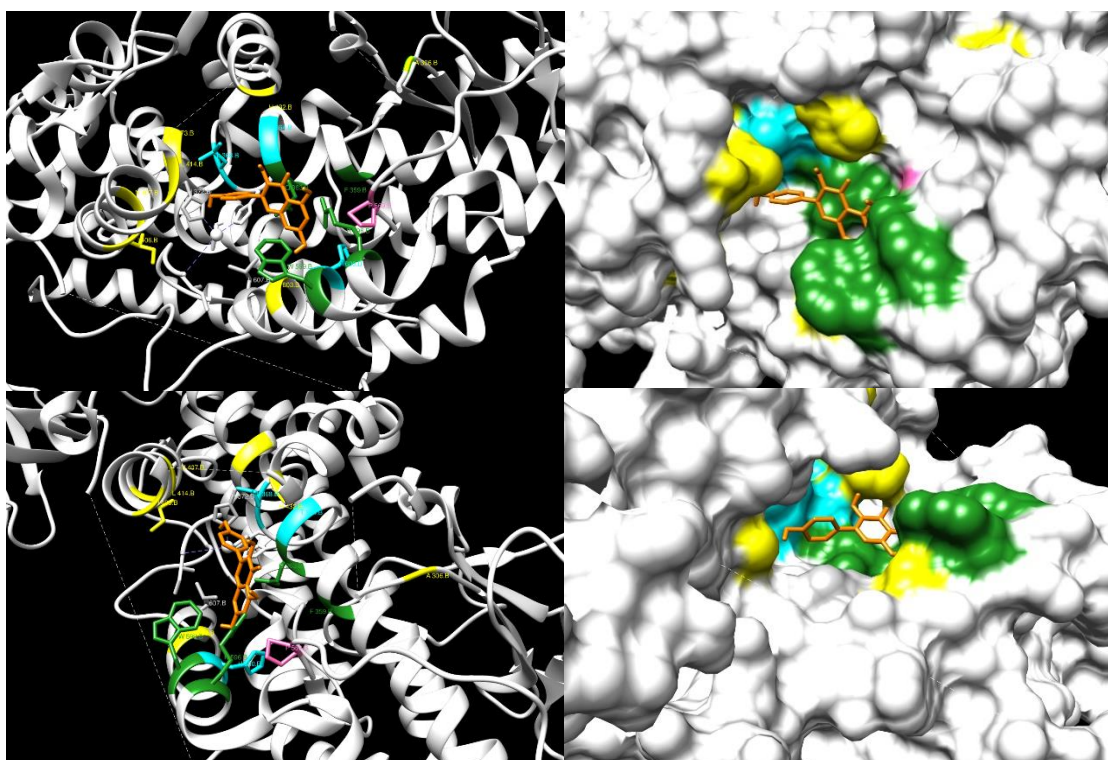


Figura 14. Kaempferol situado en el bolsillo del sitio activo de 5-LOX

Por último, se ha representado este flavonol situado en el bolsillo que rodea el sitio activo de 5-LOX en la Figura 14. En las dos imágenes de la derecha se representa la superficie proteína para dar una idea más clara de qué forma toma

el bolsillo del sitio activo y cómo se sitúa el inhibidor en su interior. En las cuatro imágenes, en naranja se representa el kaempferol, y los aminoácidos siguen un código de color según las interacciones en las que están involucrados: en verde las interacciones que tiene kaempferol en común con las conservadas con los inhibidores; en rosa el aminoácido 569PRO, con el que interaccionan tanto kaempferol como NDGA (el inhibidor que se había cogido como referencia para los *dockings*) en la estructura cristalizada 6N2W [71]; en amarillo los aminoácidos que Gilbert, et al., describieron que rodeaban el sitio activo de la proteína [69]; y en azul, de estos aminoácidos que rodean el sitio activo, aquellos con los que interacciona kaempferol.

6. Conclusiones

6.1 Conclusiones del trabajo

Tras desarrollar las tareas de este trabajo y analizar los resultados obtenidos, a continuación, se resumen las conclusiones a las que se ha llegado:

- La proteína 5-lipoxigenasa podría ser una buena candidata como diana terapéutica en el tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer por los mecanismos patológicos en los que está implicada.
- Se han estudiado diferentes maneras de construir bases de datos personalizadas de moléculas que cumplan unos requisitos concretos, como la búsqueda por similitud o el uso de literatura científica. El método de construcción de cada base de datos depende en gran medida del contenido que se requiera.
- Las técnicas utilizadas en desarrollo de fármacos por estructura serían adecuadas para el filtrado de una base de datos personalizada con el objetivo de elegir aquellos flavonoles que puedan actuar sobre la proteína de interés.
- Del conjunto de flavonoles estudiado en este trabajo, el kaempferol ha sido el candidato más favorable tanto por interacciones con 5-LOX como por sus propiedades ADMET para continuar un posible estudio de desarrollo de fármacos para tratar el Alzheimer.

6.2 Logro de los objetivos

Al inicio de este trabajo se marcaron dos objetivos principales: seleccionar una proteína relacionada con el Alzheimer que sirva de diana terapéutica con la que trabajar y formular una hipótesis sobre qué nutracéutico sería la mejor opción de tratamiento. Llegados al final del desarrollo de este trabajo, se puede decir que ambos objetivos principales se han conseguido a grandes rasgos.

Tras revisar numerosos artículos científicos sobre la enfermedad de Alzheimer se decidió elegir la enzima 5-LOX como la diana terapéutica con la que trabajar con la intención de decantarse por una visión más innovadora en la investigación de dianas para tratar el Alzheimer. Se buscó su estructura 3D y también se investigaron inhibidores conocidos de esta proteína, que se recogieron en una pequeña base de datos.

Por otro lado, en cuanto a los nutracéuticos, nos centramos en los flavonoles por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, lo que ha hecho que algunos investigadores ya los hayan incluido en algunos estudios sobre enfermedades neurodegenerativas, incluido el Alzheimer. Sin embargo, esta elección hizo que tuviera que realizarse un cambio de estrategia en la construcción de la base de datos de nutracéuticos, dado que al buscar flavonoles

en listas de nutracéuticos existentes, no se obtuvieron resultados. Finalmente se tomaron un conjunto de 800 flavonoles utilizando la herramienta SwissSimilarity para poder disponer de una base de datos lo suficientemente amplia, además de los 9 flavonoles naturales que pudieron encontrarse en la literatura científica.

Tras este reajuste de la construcción de una base de datos con la que trabajar, el resto de los objetivos marcados para dicho bloque de trabajo pudieron cumplirse: análisis de la interacción de los flavonoles con el *target*, comparación de estas interacciones con la de los inhibidores conocidos y análisis de las propiedades ADMET de los flavonoles clasificados en el proceso anterior.

Finalmente se ha podido formular una hipótesis en la que se propone al kaempferol como un candidato de inhibidor de 5-LOX con el que tratar o prevenir el Alzheimer.

6.3 Seguimiento de la planificación y metodología

En líneas generales el trabajo se ha llevado a cabo conforme a lo planificado al inicio, exceptuando algunas tareas que se han extendido en el tiempo más de lo que inicialmente se había marcado. Sin embargo, estas desviaciones no han acabado afectando al desarrollo total del trabajo.

Las dos desviaciones principales de la planificación original han sido la construcción de la base de datos de nutracéuticos, que se cambió a una base de datos exclusivamente de flavonoles, y el proceso de anclaje de las distintas moléculas con la proteína 5-LOX, que tuvo que repetirse con diferentes parámetros para conseguir unos resultados con el menor número de errores.

6.4 Perspectivas futuras

Las técnicas de bioinformática empleadas en este trabajo supondrían un punto de partida en el proceso de diseño de un fármaco. Aunque el trabajo no ha profundizado más por limitaciones temporales, se podría ampliar y mejorar de muchas maneras distintas.

Podría elegirse más de un inhibidor como referencia para el *docking*, por ejemplo, se podría utilizar el inhibidor AKBA que se descartó durante las primeras fases de análisis del trabajo, para repetir los pasos que se han hecho tomando el lugar de unión de NDGA a 5-LOX como referencia. Adicionalmente, podría llevarse a cabo un *blind docking* de los inhibidores conocidos sobre toda la superficie de la proteína para encontrar posiblemente otros lugares de unión a esta.

También podrían ampliarse las dos bases de datos construidas durante el trabajo: la de los inhibidores de 5-LOX podría extenderse si se continuara con la búsqueda bibliográfica, lo que aportaría más variedad de compuestos y potencias de inhibición, además, mediante la investigación bibliográfica se podrían clasificar los inhibidores según su lugar de acción en la proteína; la base de datos de flavonoles podría construirse siguiendo otros métodos (utilizando

listas de flavonoles de la literatura científica), ampliando la búsqueda de flavonoles a otras bases de datos de compuestos, y también podría construirse una base de datos que no incluyera únicamente flavonoles, sino otro tipo de flavonoides.

Por otra parte, si se dispusiera de una base de datos más amplia de flavonoides, podrían seleccionarse más compuestos tras la clasificación resultante del cribado virtual para poder realizar un estudio estadístico de las interacciones de estos compuestos y de los inhibidores, así como de las propiedades ADMET.

Se ha de tener en cuenta también que, como se ha comentado anteriormente, los análisis computacionales no son más que el inicio de la investigación, posteriormente sería imprescindible realizar ensayos *in vitro* y, más adelante, *in vivo* de aquellos compuestos seleccionados como candidatos de tratamiento.

7. Glosario

5-LOX (5-lipoxigenasa): enzima que inicia el sistema por el cual el ácido araquidónico se transforma en leucotrienos.

AA (ácido araquidónico): ácido graso poliinsaturado que es sustrato de la enzima 5-lipoxigenasa.

ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad): propiedades farmacocinéticas de un compuesto que definen como éste se comportará dentro del organismo.

APP (del inglés *Amyloid Precursor Protein*): proteína precursora amiloide, de la que se generan los péptidos A β que forman gran parte de las placas amiloides del parénquima cerebral.

ATOM: código utilizado en los archivos en formato PDB para referirse a los átomos pertenecientes a la proteína.

BBB (del inglés *Blood-Brain Barrier*): red de vasos sanguíneos y tejido que está formada por células muy próximas en el espacio y ayuda a mantener las sustancias nocivas fuera del tejido cerebral.

Binding mode: Anglicismo que significa la manera en que un compuesto puede unirse al sitio activo del *target*.

Blind docking: Proceso de *docking* en el que se intenta calcular en qué lugar de toda la superficie de la proteína es más probable que se una un ligando. Este proceso suele utilizarse cuando no se conoce el sitio activo de la proteína.

CYP450 (citocromo P450): superfamilia de proteínas encargadas de la oxidación de la mayoría de los fármacos y compuestos exógenos, que se localizan principalmente en el hígado y tienen un papel importante en el metabolismo de fármacos.

Docking: Técnica de acoplamiento molecular que se usa para predecir cómo una proteína interacciona con un ligando.

Formato MOL2: formato de archivo que almacena toda la información necesaria de características de los átomos, posición y conectividad en una molécula. Es el formato generalmente utilizado para los *dockings*.

Formato PDB (del inglés *Protein Data Bank*): formato de archivo donde se especifican las coordenadas de los átomos de moléculas biológicas como las proteínas. Contienen un encabezado donde se describen otras características importantes y también pueden incluir información sobre ligandos, moléculas del solvente, iones metálicos, etc.

Formato SDF (del inglés *Structure-Data File*): formato basado en el formato MOL (similar al MOL2) que puede almacenar varias moléculas en un solo archivo.

Formato SMILES (del inglés *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*): especificación de introducción lineal molecular simplificada. Es una especificación para describir sin ambigüedades la estructura de una molécula usando cadenas ASCII cortas.

HETATM: código utilizado en los archivos en formato PDB para referirse a los átomos no pertenecientes a la proteína (ligandos, solvente, iones metálicos, etc)

IC₅₀: Concentración a la que un fármaco puede inhibir un proceso biológico particular en un 50%.

Leucotrienos: Metabolitos generados a partir del ácido araquidónico que tienen efecto proinflamatorio.

NDGA (norhidroguaiaretic acid): uno de los inhibidores conocidos de 5-LOX, del cual se obtuvieron datos de su posición con 5-LOX en la estructura cristalizada PDB ID 6N2W para su uso en este trabajo [71].

NMR (del inglés *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*): Técnica analítica utilizada para determinar la estructura molecular de proteínas y otros compuestos.

pIC₅₀: Transformación matemática del IC₅₀ tal que $pIC_{50} = -\log(IC_{50})$, con IC₅₀ en M. Se utiliza para facilitar la interpretación de la potencia de inhibición de una molécula.

QSAR (del inglés *Quantitative Structure Activity Relationship*): Relación cuantitativa de estructura y actividad. Son modelos matemáticos que buscan la predicción de propiedades biológicas o físico-químicas de compuestos químicos a partir de sus propiedades experimentales.

Target: Anglicismo que se usa para referirse a una diana terapéutica, es decir, la entidad biológica a la cual un fármaco se une para llevar a cabo su efecto.

Virtual screening: Cribado virtual. Técnica computacional utilizada en el diseño y descubrimiento de fármacos para hacer búsquedas en librerías de moléculas con el objetivo de identificar aquellas moléculas que puedan unirse a una diana terapéutica.

8. Bibliografía

- [1] S. K. Wooller, G. Benstead-Hume, X. Chen, Y. Ali, y F. M. G. Pearl, «Bioinformatics in translational drug discovery», *Biosci. Rep.*, vol. 37, n.º 4, 31 2017, doi: 10.1042/BSR20160180.
- [2] S. Ou-Yang, J. Lu, X. Kong, Z. Liang, C. Luo, y H. Jiang, «Computational drug discovery», *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 33, n.º 9, Art. n.º 9, sep. 2012, doi: 10.1038/aps.2012.109.
- [3] A. Atri, «The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management», *Med. Clin. North Am.*, vol. 103, n.º 2, pp. 263-293, mar. 2019, doi: 10.1016/j.mcna.2018.10.009.
- [4] J. K. Aronson, «Defining “nutraceuticals”: neither nutritious nor pharmaceutical», *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 83, n.º 1, pp. 8-19, 2017, doi: 10.1111/bcp.12935.
- [5] R. Hornedo-Ortega *et al.*, «Phenolic Compounds Characteristic of the Mediterranean Diet in Mitigating Microglia-Mediated Neuroinflammation», *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 12, 2018, doi: 10.3389/fncel.2018.00373.
- [6] A. Santini *et al.*, «Nutraceuticals: opening the debate for a regulatory framework», *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 84, n.º 4, pp. 659-672, 2018, doi: 10.1111/bcp.13496.
- [7] G. Sliwoski, S. Kothiwale, J. Meiler, y E. W. Lowe, «Computational Methods in Drug Discovery», *Pharmacol. Rev.*, vol. 66, n.º 1, pp. 334-395, ene. 2014, doi: 10.1124/pr.112.007336.
- [8] C. Liao, M. Sitzmann, A. Pugliese, y M. C. Nicklaus, «Software and resources for computational medicinal chemistry», *Future Med. Chem.*, vol. 3, n.º 8, pp. 1057-1085, jun. 2011, doi: 10.4155/fmc.11.63.
- [9] A. Y. Sun, Q. Wang, A. Simonyi, y G. Y. Sun, «Botanical phenolics and brain health», *Neuromolecular Med.*, vol. 10, n.º 4, pp. 259-274, 2008, doi: 10.1007/s12017-008-8052-z.
- [10] D. S. Wishart *et al.*, «DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018», *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, n.º D1, pp. D1074-D1082, ene. 2018, doi: 10.1093/nar/gkx1037.
- [11] «Drugs.com | Prescription Drug Information, Interactions & Side Effects», *Drugs.com*. <https://www.drugs.com/> (accedido nov. 14, 2020).
- [12] «FooDB». <https://foodb.ca/> (accedido oct. 12, 2020).
- [13] S. Kim *et al.*, «PubChem 2019 update: improved access to chemical data», *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, n.º D1, pp. D1102-D1109, 08 2019, doi: 10.1093/nar/gky1033.
- [14] «ChEMBL Database». <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (accedido oct. 11, 2020).
- [15] V. Zoete, A. Daina, C. Bovigny, y O. Michielin, «SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening», *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 56, n.º 8, pp. 1399-1404, ago. 2016, doi: 10.1021/acs.jcim.6b00174.
- [16] «Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues», *Eur. J. Biol. Res.*, vol. 7, n.º 2, pp. 108-123, 2017, doi: <http://doi.org/10.5281/zenodo.545778>.
- [17] P. M. Selzer, R. J. Marhöfer, y O. Koch, *Applied Bioinformatics*, Second Edition. Springer International Publishing, 2018.

- [18] C. M. Labbé *et al.*, «MTiOpenScreen: a web server for structure-based virtual screening», *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, n.º W1, pp. W448-454, jul. 2015, doi: 10.1093/nar/gkv306.
- [19] D. E. V. Pires, T. L. Blundell, y D. B. Ascher, «pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures», *J. Med. Chem.*, vol. 58, n.º 9, pp. 4066-4072, may 2015, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104.
- [20] H. M. Berman *et al.*, «The Protein Data Bank», *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, n.º 1, pp. 235-242, ene. 2000, doi: 10.1093/nar/28.1.235.
- [21] M. Davies *et al.*, «ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities», *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, n.º Web Server issue, pp. W612-W620, jul. 2015, doi: 10.1093/nar/gkv352.
- [22] T. Sterling y J. J. Irwin, «ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone», *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 55, n.º 11, pp. 2324-2337, nov. 2015, doi: 10.1021/acs.jcim.5b00559.
- [23] N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, y G. R. Hutchison, «Open Babel: An open chemical toolbox», *J. Cheminformatics*, vol. 3, n.º 1, p. 33, oct. 2011, doi: 10.1186/1758-2946-3-33.
- [24] E. F. Pettersen *et al.*, «UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis», *J. Comput. Chem.*, vol. 25, n.º 13, pp. 1605-1612, oct. 2004, doi: 10.1002/jcc.20084.
- [25] S. Salentin, S. Schreiber, V. J. Haupt, M. F. Adasme, y M. Schroeder, «PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler», *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, n.º Web Server issue, pp. W443-W447, jul. 2015, doi: 10.1093/nar/gkv315.
- [26] R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2017.
- [27] A. P. de Araújo Boleti, T. M. de Oliveira Flores, S. E. Moreno, L. dos Anjos, M. R. Mortari, y L. Migliolo, «Neuroinflammation: An overview of neurodegenerative and metabolic diseases and of biotechnological studies», *Neurochem. Int.*, vol. 136, p. 104714, jun. 2020, doi: 10.1016/j.neuint.2020.104714.
- [28] V. P. Dadhania, P. P. Trivedi, A. Vikram, y D. N. Tripathi, «Nutraceuticals against Neurodegeneration: A Mechanistic Insight», *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 14, n.º 6, pp. 627-640, 2016, doi: 10.2174/1570159x14666160104142223.
- [29] P. H. Reddy *et al.*, «Protective Effects of Indian Spice Curcumin Against Amyloid- β in Alzheimer's Disease», *J. Alzheimers Dis. JAD*, vol. 61, n.º 3, pp. 843-866, 2018, doi: 10.3233/JAD-170512.
- [30] Sergi Gómez-Ganau, Jesús Vidente de Julián Ortiz, y Rafael Gozalbes, «Recent advances in computational approaches for designing potential anti-alzheimer's agents.», en *Computational Modeling of Drugs Against Alzheimer's Disease*, vol. 132, Springer International Publishing, 2018, pp. 25-59.
- [31] J. Weller y A. Budson, «Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment», *F1000Research*, vol. 7, 2018, doi: 10.12688/f1000research.14506.1.
- [32] E. Karran, M. Mercken, y B. D. Strooper, «The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics»,

- Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, n.º 9, Art. n.º 9, sep. 2011, doi: 10.1038/nrd3505.
- [33] L. Fan *et al.*, «New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease», *Front. Neurol.*, vol. 10, p. 1312, 2019, doi: 10.3389/fneur.2019.01312.
- [34] S. Sindi, F. Mangialasche, y M. Kivipelto, «Advances in the prevention of Alzheimer's Disease», *F1000Prime Rep.*, vol. 7, may 2015, doi: 10.12703/P7-50.
- [35] A. F. Teich *et al.*, «Translational inhibition of APP by Posiphen: Efficacy, pharmacodynamics, and pharmacokinetics in the APP/PS1 mouse», *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.*, vol. 4, n.º 1, pp. 37-45, 2018, doi: 10.1016/j.trci.2017.12.001.
- [36] M. Safieh, A. D. Korczyn, y D. M. Michaelson, «ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease», *BMC Med.*, vol. 17, n.º 1, p. 64, 20 2019, doi: 10.1186/s12916-019-1299-4.
- [37] C. Hooper, R. Killick, y S. Lovestone, «The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease», *J. Neurochem.*, vol. 104, n.º 6, pp. 1433-1439, mar. 2008, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x.
- [38] H. Eldar-Finkelman y A. Martinez, «GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS», *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 4, 2011, doi: 10.3389/fnmol.2011.00032.
- [39] S. Coutadeur *et al.*, «A novel DYRK1A (dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease: effect on Tau and amyloid pathologies in vitro», *J. Neurochem.*, vol. 133, n.º 3, pp. 440-451, may 2015, doi: 10.1111/jnc.13018.
- [40] T. M. Rees y S. Brimijoin, «The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer's disease», *Drugs Today Barc. Spain 1998*, vol. 39, n.º 1, pp. 75-83, ene. 2003, doi: 10.1358/dot.2003.39.1.740206.
- [41] H. Zhang *et al.*, «Potential therapeutic targets of huperzine A for Alzheimer's disease and vascular dementia.», *Chem. Biol. Interact.*, 2008, doi: 10.1016/j.cbi.2008.04.049.
- [42] C. Ballard, J. M. Youakim, B. Coate, y S. Stankovic, «Pimavanserin in Alzheimer's Disease Psychosis: Efficacy in Patients with More Pronounced Psychotic Symptoms», *J. Prev. Alzheimers Dis.*, vol. 6, n.º 1, pp. 27-33, 2019, doi: 10.14283/jpad.2018.30.
- [43] «Treatment Horizon», *Alzheimer's Disease and Dementia*. <https://alz.org/alzheimers-dementia/investigacion/treatment-horizon> (accedido oct. 17, 2020).
- [44] H. Sarlus y M. T. Heneka, «Microglia in Alzheimer's disease», *J. Clin. Invest.*, vol. 127, n.º 9, pp. 3240-3249, sep. 2017, doi: 10.1172/JCI90606.
- [45] C. Domingues, O. A. B. da Cruz E Silva, y A. G. Henriques, «Impact of Cytokines and Chemokines on Alzheimer's Disease Neuropathological Hallmarks», *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 14, n.º 8, pp. 870-882, 2017, doi: 10.2174/1567205014666170317113606.
- [46] H. Du *et al.*, «Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease», *Nat. Med.*, vol. 14, n.º 10, pp. 1097-1105, oct. 2008, doi: 10.1038/nm.1868.
- [47] W. Danysz y C. G. Parsons, «The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease:

- preclinical evidence», *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, vol. 18, n.º S1, pp. S23-S32, sep. 2003, doi: 10.1002/gps.938.
- [48] A. H. Burstein, M. Sabbagh, R. Andrews, C. Valcarce, I. Dunn, y L. Altstiel, «Development of Azeliragon, an Oral Small Molecule Antagonist of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts, for the Potential Slowing of Loss of Cognition in Mild Alzheimer's Disease», *J. Prev. Alzheimers Dis.*, vol. 5, n.º 2, pp. 149-154, 2018, doi: 10.14283/jpad.2018.18.
- [49] K. Shudo, H. Fukasawa, M. Nakagomi, y N. Yamagata, «Towards Retinoid Therapy for Alzheimer's Disease», *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 6, n.º 3, pp. 302-311, jun. 2009, doi: 10.2174/156720509788486581.
- [50] J. Keaney, J. Gasser, G. Gillet, D. Scholz, y I. Kadiu, «Inhibition of Bruton's Tyrosine Kinase Modulates Microglial Phagocytosis: Therapeutic Implications for Alzheimer's Disease», *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. Neuroimmune Pharmacol.*, vol. 14, n.º 3, pp. 448-461, 2019, doi: 10.1007/s11481-019-09839-0.
- [51] P. Jain, C. Karthikeyan, N. H. Moorthy, D. Waiker, A. K. Jain, y P. Trivedi, «Human CDC2-like kinase 1 (CLK1): A novel target for Alzheimer's disease», *Curr. Drug Targets*, vol. 15, feb. 2014, doi: 10.2174/1389450115666140226112321.
- [52] J. Michael, J. Marschallinger, y L. Aigner, «The leukotriene signaling pathway: a druggable target in Alzheimer's disease», *Drug Discov. Today*, vol. 24, n.º 2, pp. 505-516, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2018.09.008.
- [53] H. M. Berman *et al.*, «RCSB PDB: Homepage», *The Protein Data Bank*, 2000. <https://www.rcsb.org/> (accedido nov. 14, 2020).
- [54] R. Ciccarelli *et al.*, «Cysteinyl-leukotrienes are released from astrocytes and increase astrocyte proliferation and glial fibrillary acidic protein via cys-LT1 receptors and mitogen-activated protein kinase pathway», *Eur. J. Neurosci.*, vol. 20, n.º 6, pp. 1514-1524, sep. 2004, doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03613.x.
- [55] A. Di Meco, E. Lauretti, A. N. Vagnozzi, y D. Praticò, «Zileuton restores memory impairments and reverses amyloid and tau pathology in aged AD mice», *Neurobiol. Aging*, vol. 35, n.º 11, pp. 2458-2464, nov. 2014, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.016.
- [56] E. Valera, R. Dargusch, P. A. Maher, y D. Schubert, «Modulation of 5-Lipoxygenase in Proteotoxicity and Alzheimer's Disease», *J. Neurosci.*, vol. 33, n.º 25, pp. 10512-10525, jun. 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5183-12.2013.
- [57] A. Bitto *et al.*, «Effects of COX1-2/5-LOX blockade in Alzheimer transgenic 3xTg-AD mice», *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI*, vol. 66, n.º 5, pp. 389-398, may 2017, doi: 10.1007/s00011-017-1022-x.
- [58] S. Ruchi, «Role of nutraceuticals in health care: A review», *Int. J. Green Pharm. IJGP*, vol. 11, n.º 03, Art. n.º 03, oct. 2017, doi: 10.22377/ijgp.v11i03.1146.
- [59] N. A. Helal, H. A. Eassa, A. M. Amer, M. A. Eltokhy, I. Edafiogho, y M. I. Nounou, «Nutraceuticals' Novel Formulations: The Good, the Bad, the Unknown and Patents Involved», *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, vol. 13, n.º 2, pp. 105-156, 2019, doi: 10.2174/1872211313666190503112040.
- [60] E. K. Kalra, «Nutraceutical--definition and introduction», *AAPS PharmSci*, vol. 5, n.º 3, p. E25, 2003, doi: 10.1208/ps050325.

- [61] A. L. Harvey, R. Edrada-Ebel, y R. J. Quinn, «The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era», *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 14, n.º 2, pp. 111-129, feb. 2015, doi: 10.1038/nrd4510.
- [62] M. J. J. Ronis, K. B. Pedersen, y J. Watt, «Adverse Effects of Nutraceuticals and Dietary Supplements», *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 58, pp. 583-601, 06 2018, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052844.
- [63] N. Ansari y F. Khodaghali, «Natural Products as Promising Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease: Molecular Mechanism Aspect», *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 11, n.º 4, pp. 414-429, jul. 2013, doi: 10.2174/1570159X11311040005.
- [64] A. N. Panche, A. D. Diwan, y S. R. Chandra, «Flavonoids: an overview», *J. Nutr. Sci.*, vol. 5, p. e47, 2016, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [65] M. Quiñones, M. Miguel, y A. Aleixandre, «Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular», *Nutr. Hosp.*, vol. 27, n.º 1, pp. 76-89, feb. 2012.
- [66] Dr. A. Tapas, D. M. Sakarkar, y R. Kakde, «Flavonoids as Nutraceuticals: A Review», *Trop. J. Pharm. Res. ISSN 1596-5996 Vol 7 Num 3*, vol. 7, sep. 2008, doi: 10.4314/tjpr.v7i3.14693.
- [67] M.-H. Pan, C.-S. Lai, y C.-T. Ho, «Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids», *Food Funct.*, vol. 1, n.º 1, pp. 15-31, oct. 2010, doi: 10.1039/C0FO00103A.
- [68] J. Chu y D. Praticò, «The 5-Lipoxygenase as modulator of Alzheimer's γ -secretase and therapeutic target», *Brain Res. Bull.*, vol. 126, n.º Pt 2, pp. 207-212, sep. 2016, doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.03.010.
- [69] N. C. Gilbert *et al.*, «The structure of human 5-lipoxygenase», *Science*, vol. 331, n.º 6014, pp. 217-219, ene. 2011, doi: 10.1126/science.1197203.
- [70] M. K. Gilson, T. Liu, M. Baitaluk, G. Nicola, L. Hwang, y J. Chong, «BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology», *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, n.º Database issue, pp. D1045-D1053, ene. 2016, doi: 10.1093/nar/gkv1072.
- [71] N. C. Gilbert *et al.*, «Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products», *Nat. Chem. Biol.*, vol. 16, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2020, doi: 10.1038/s41589-020-0544-7.
- [72] M. Zhang, Z. Xia, y A. Yan, «Computer modeling in predicting the bioactivity of human 5-lipoxygenase inhibitors», *Mol. Divers.*, vol. 21, n.º 1, pp. 235-246, feb. 2017, doi: 10.1007/s11030-016-9709-4.
- [73] K. Hagiwara *et al.*, «Puupehenol, a Potent Antioxidant Antimicrobial Meroterpenoid from a Hawaiian Deep-Water Dactylospongia sp. Sponge», *J. Nat. Prod.*, vol. 78, n.º 2, pp. 325-329, feb. 2015, doi: 10.1021/np500793g.
- [74] B. Burnett, Q. Jia, Y. Zhao, y R. Levy, «A Medicinal Extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu* Acts as a Dual Inhibitor of Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase to Reduce Inflammation», *J. Med. Food*, vol. 10, pp. 442-51, oct. 2007, doi: 10.1089/jmf.2006.255.
- [75] T. Rodrigues *et al.*, «Machine intelligence decrypts β -lapachone as an allosteric 5-lipoxygenase inhibitor», *Chem. Sci.*, vol. 9, n.º 34, pp. 6899-6903, ago. 2018, doi: 10.1039/C8SC02634C.
- [76] P. Prasher, Pooja, y P. Singh, «Lead modification: Amino acid appended indoles as highly effective 5-LOX inhibitors», *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 22, n.º 5, pp. 1642-1648, mar. 2014, doi: 10.1016/j.bmc.2014.01.027.

- [77] J. J. Reid, «ABT-761 (Abbott)», *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000, vol. 2, n.º 1, pp. 68-71, ene. 2001.
- [78] F. C. Huang *et al.*, «Differential effects of a series of hydroxamic acid derivatives on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase from neutrophils and 12-lipoxygenase from platelets and their in vivo effects on inflammation and anaphylaxis», *J. Med. Chem.*, vol. 32, n.º 8, pp. 1836-1842, ago. 1989, doi: 10.1021/jm00128a027.
- [79] U. Siemoneit *et al.*, «On the interference of boswellic acids with 5-lipoxygenase: Mechanistic studies in vitro and pharmacological relevance», *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 606, n.º 1, pp. 246-254, mar. 2009, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.01.044.
- [80] A. M. Boctor, M. Eickholt, y T. A. Pugsley, «Meclofenamate sodium is an inhibitor of both the 5-lipoxygenase and cyclooxygenase pathways of the arachidonic acid cascade in vitro», *Prostaglandins. Leukot. Med.*, vol. 23, n.º 2, pp. 229-238, ago. 1986, doi: 10.1016/0262-1746(86)90190-3.
- [81] S. Tornhamre, C. Edenius, G. Smedegård, B. Sjöquist, y J. Åke Lindgren, «Effects of sulfasalazine and a sulfasalazine analogue on the formation of lipoxygenase and cyclooxygenase products», *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 169, n.º 2, pp. 225-234, oct. 1989, doi: 10.1016/0014-2999(89)90019-8.
- [82] Rask-Madsen J, Bukhave K, Laursen LS, y Lauritsen K, «5-Lipoxygenase inhibitors for the treatment of inflammatory bowel disease. -», *Europe PMC*, ene. 01, 1992. <http://europepmc.org/article/MED/1359745> (accedido nov. 12, 2020).
- [83] J. C. Sircar, C. F. Schwender, y M. E. Carethers, «Inhibition of soybean lipoxygenase by sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid: a possible mode of action in ulcerative colitis», *Biochem. Pharmacol.*, vol. 32, n.º 1, pp. 170-172, ene. 1983, doi: 10.1016/0006-2952(83)90673-1.
- [84] N. Oh, B. K. E. J, y A.-R. I, «Inhibition of 5-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in human neutrophils by sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid.», *Dig. Dis. Sci.*, vol. 32, n.º 6, pp. 577-582, jun. 1987, doi: 10.1007/bf01296156.
- [85] H. A. Zhong, «ADMET Properties: Overview and Current Topics», en *Drug Design: Principles and Applications*, A. Grover, Ed. Singapore: Springer, 2017, pp. 113-133.
- [86] Balakumar Chandrasekaran, Sara Nidal Abed, Omar Al-Attraqchi, Kaushik Kuche, y Rakesh K. Tekade, «Computer-Aided Prediction of Pharmacokinetic (ADMET) Properties», *Dos. Form Des. Parameters*, pp. 731-755, ene. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-814421-3.00021-X.
- [87] F. Ntie-Kang, «An in silico evaluation of the ADMET profile of the StreptomeDB database», *SpringerPlus*, vol. 2, jul. 2013, doi: 10.1186/2193-1801-2-353.
- [88] D. Lagorce, D. Douguet, M. A. Miteva, y B. O. Villoutreix, «Computational analysis of calculated physicochemical and ADMET properties of protein-protein interaction inhibitors», *Sci. Rep.*, vol. 7, n.º 1, Art. n.º 1, abr. 2017, doi: 10.1038/srep46277.
- [89] R. Gozalbes, M. Jacewicz, R. Annand, K. Tsaioun, y A. Pineda-Lucena, «QSAR-based permeability model for drug-like compounds», *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 19, n.º 8, pp. 2615-2624, abr. 2011, doi: 10.1016/j.bmc.2011.03.011.

- [90] «Definition of blood-brain barrier - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute», feb. 02, 2011. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/blood-brain-barrier> (accedido ene. 02, 2021).
- [91] A. L. Riley y S. Kohut, «Drug Toxicity», en *Encyclopedia of Psychopharmacology*, I. P. Stolerman, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010, pp. 441-441.
- [92] W. Föllmann, G. Degen, F. Oesch, y J. G. Hengstler, «Ames Test», en *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, S. Maloy y K. Hughes, Eds. San Diego: Academic Press, 2013, pp. 104-107.
- [93] S. Wang, H. Sun, H. Liu, D. Li, Y. Li, y T. Hou, «ADMET Evaluation in Drug Discovery. 16. Predicting hERG Blockers by Combining Multiple Pharmacophores and Machine Learning Approaches», *Mol. Pharm.*, vol. 13, n.º 8, pp. 2855-2866, ago. 2016, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00471.
- [94] Rowaiye A, Onuh O, y Asala T, «In Silico Identification of Potential Allosteric Inhibitors of the SARS-CoV-2 Helicase», *ChemRxiv*, 2020, doi: DOI: 10.26434/chemrxiv.12570551.v2.
- [95] «Hero of Aquatic Toxicology: The Fathead Minnow», *Situ Biosciences LLC*, may 15, 2017. <https://www.situbiosciences.com/2017/05/15/hero-of-aquatic-toxicology-the-fathead-minnow/> (accedido ene. 02, 2021).

9. Anexo

Los documentos relevantes para este trabajo pueden encontrarse en el siguiente repositorio de GitHub: <https://github.com/riorval/TFM.git>

A continuación, se listan los archivos que contiene dicho repositorio:

- "Targets_Alzheimer.xlsx": lista de las dianas terapéuticas del alzheimer exploradas para el TFM
- "FlavonolesChEMBL.csv": lista de 400 flavonoles obtenidos de SwissSimilarity - ChEMBL bioactive compounds (<10uM)
- "FlavonolesZINCdruglike.csv": lista de 400 flavonoles obtenidos de SwissSimilarity - ZINC drug like
- "Flavonoles_naturales.xlsx": lista 9 flavonoles naturales
- "Moleculas inhibidoras 5lox.xlsx": lista inhibidores 5-lox y lista de los seleccionados para el docking
- "5lox6n2wChainB_FeATOM.pdb": estructura de la proteína utilizada en los dockings con MTiOpenScreen
- "get_center_sizee_Rita.py": script de python modificado del script proporcionado por el tutor para obtener las dimensiones de la caja de docking
- "read_write_SMILES.R": script en R para crear archivos independientes con el SMILES de los flavonoles en las listas de 400
- "plip_txt_R.R": script en R para leer los archivos de texto obtenidos de Plip y obtener las interacciones de cada ligando con 5-LOX
- "estudio_interacciones.R": script en R donde se detallan los pasos seguidos para estudiar las interacciones de inhibidores y de flavonoles con 5-LOX