



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA Y BIOINFORMÁTICA

**ESTRATEGIA COMPUTACIONAL PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE COMPUESTOS *MULTITARGET*: APLICACIONES EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad
de Concepción para optar al grado de Magíster en Bioquímica y
Bioinformática**

POR: PAULINA VICTORIA VALENZUELA HORMAZÁBAL

PROFESOR GUÍA: DR. DAVID MAURICIO RAMÍREZ SÁNCHEZ

Marzo, 2025
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

A mi abuela, Ilda Valenzuela, por enseñarme
a ser fuerte, a luchar por mis derechos
y por su amor eterno, que sigue guiándome
desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar expresando mi profundo agradecimiento a Claudio, mi pareja y compañero de vida. Su apoyo ha sido fundamental en todo este proceso. Gracias por estar siempre a mi lado, por darme ánimos cuando pensaba que no podía más, y por recordarme que todo es posible. Tu confianza en mí me ha dado la fuerza para seguir adelante. También quiero agradecer a Happy, mi perrito, su cariño y energía han sido un gran apoyo para superar los momentos más difíciles.

A mis padres, Claudia y Cristian, y a mi hermana Bárbara, a quienes, aunque la distancia nos separe, los siento siempre cerca. Gracias por su apoyo incondicional y por darme todo su amor y energía para que pudiera seguir adelante. Su orgullo por mí ha sido un gran motor en este camino.

A mi tutor, el Dr. David Ramírez, le agradezco por ser más que un mentor académico. Su dedicación, paciencia y constante apoyo me han sido de gran ayuda. Ha sido una inspiración para mí, no solo por su profesionalismo, sino por su calidad humana, siempre dispuesto a guiarme en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio, el equipo de Ramírez Lab, les agradezco por su apoyo tanto profesional como personal. No solo me han ayudado en el trabajo, sino que he encontrado en ellos una verdadera amistad y solidaridad.

A mi abuela Ilda Valenzuela, que desde el cielo sigue siendo una fuente de inspiración. Gracias por enseñarme que los límites están solo en nuestra mente y que, con determinación, todo se puede lograr. Este logro también es tuyo.

Finalmente, me agradezco a mí misma por todo el esfuerzo, la dedicación y la resiliencia que me han permitido llegar hasta aquí. A pesar de las dificultades, hoy puedo celebrar el cierre de una etapa importante en mi vida profesional. Este logro también es fruto de mi perseverancia y de no rendirme frente a la adversidad.

A todas las personas que, de alguna manera, han formado parte de este proceso, les agradezco profundamente. Su apoyo, ya sea directo o indirecto, ha sido clave para llegar hasta aquí.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	6
INDICE DE TABLAS	9
INDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN	15
1. Enfermedades neurodegenerativas	15
2. Enfermedad de Alzheimer	16
3. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer	18
Hipótesis colinérgica.....	18
Hipótesis de la cascada amiloide	19
Hipótesis de la proteína Tau.....	20
4. Tratamientos actuales para EA	22
5. Evolución del Descubrimiento de Fármacos	24
6. Importancia de las herramientas computacionales	27
7. Casos de éxito en el descubrimiento de compuestos con actividad multitarget	33
8. Importancia de la validación experimental	37
HIPOTESIS DE TRABAJO	40
OBJETIVOS.....	41
Objetivo General	41
Objetivos específicos	41
METODOLOGIA	42
OE1. Elaborar una librería de moléculas a partir de una combinación de bases de datos gratuitas y comerciales para buscar y clasificar compuestos con similitudes a los fármacos.	43
A1.1 Construcción de la librería de moléculas	43
A1.2 Filtrar librería de molecular a través del QED	44

A1.3 Creación de la librería de moléculas	45
OE2. Desarrollar modelos de farmacóforos comunes entre <i>targets</i> claves en la EA.	46
A2.1. Búsqueda de compuestos activos de <i>targets</i> claves en la EA	46
A2.2. Generación de Hipótesis de Farmacóforos.	46
OE3. Realizar campañas de cribados virtuales basados en farmacóforos comunes de la librería de moléculas generada.	48
A3.1 Cribado Virtual con <i>Machine Learning</i>	48
A3.2 Cribado virtual basado en farmacóforo.	49
OE4. Realizar <i>Docking</i> molecular y cálculos de energía libre de unión de los candidatos más prometedores en los <i>targets</i> clave.	50
A4.1 <i>Docking</i> Molecular	50
A4.2 Cribado cruzado de moléculas mediante <i>docking</i> XP	51
A4.3. Cálculos de energía libre MM-GBSA y selección de Hits	52
OE5. Evaluar la capacidad antioxidante de los mejores 21 compuestos seleccionados, así como su actividad frente a AChE.	53
A5.1. Estudio cinético de Interacción de moléculas con AChE	53
A5.2. Evaluación del estrés oxidativo	54
RESULTADOS.....	56
OE1. Elaborar una librería de moléculas a partir de una combinación de bases de datos gratuitas y comerciales para buscar y clasificar compuestos con similitudes a los fármacos.	56
A1.1 Construcción de la librería de moléculas	56
A1.2 Filtrar librería de molecular a través del QED	57
A1.3 Creación de la librería de moléculas	58
OE2. Desarrollar modelos de farmacóforos comunes entre <i>targets</i> claves en la EA.	59
A2.1. Búsqueda de compuestos activos de <i>targets</i> claves en la EA	59
A2.2. Generación de Hipótesis de Farmacóforos.	63
OE3. Realizar campañas de cribados virtuales basados en farmacóforos comunes de la librería de moléculas generada.	67
A3.1 Cribado Virtual con <i>Machine Learning (ML)</i>	67

A3.2 Cribado virtual basado en farmacóforo (PBVS).....	70
OE4. Realizar Docking molecular y cálculos de energía libre de unión de los candidatos más prometedores en los targets clave.....	79
A4.1 <i>Docking</i> Molecular	79
A4.2 Cribado cruzado de moléculas mediante <i>docking</i> XP	83
A4.3. Cálculos de energía libre de unión (MM-GBSA) y selección de Hits.	84
OE5. Evaluar la capacidad antioxidante de los mejores 21 compuestos seleccionados, así como su actividad frente a AChE.	92
A5.1. Estudio cinético de Interacción de moléculas con AChE	92
A5.2. Evaluación del estrés oxidativo	98
DISCUSIÓN.....	105
CONCLUSIONES	109
GLOSARIO	112
REFERENCIAS	114
ANEXOS.....	130

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de moléculas descargadas por cada Base de Datos comercial.	56
Tabla 2: Cuartiles de los valores QED para compuestos de la quimiotéca .	58
Tabla 3: Compuestos Activos Asociados a target por Código UniProt.	60
Tabla 4: Umbrales de actividad biológica de pChEMBL asignados para cada target	60
Tabla 5: Total de clústeres asociados a cada target	63
Tabla 6: Matriz del Phase Screen Score para los compuestos del target AChE tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.	72
Tabla 7: Matriz del Phase Screen Score para los compuestos del target BACE1 tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.	72
Tabla 8: Matriz del Phase Screen Score para los compuestos del target CB2 tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.	73
Tabla 9: Matriz del Phase Screen Score para los compuestos del target GSK-3 β tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.	73
Tabla 10: Matriz del Phase Screen Score para los compuestos del target MAO-A tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.	74
Tabla 11: Matriz del Phase Screen Score para los compuestos del target Rn- α 7 tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.	74
Tabla 12: Ranking de moléculas según la sumatoria de energías de unión $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$	85
Tabla 13: Total de 13 clústeres generados con las 57 moléculas analizadas.	89
Tabla 14: Resultados de IC ₅₀ en el ensayo de inhibición de AChE y BuChE	95
Tabla 15: Porcentajes de atrapamiento de radicales libres en el ensayo DPPH ⁺	100
Tabla 16: Porcentajes de atrapamiento de radicales libres en el ensayo ABTS ⁺	102

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la sinapsis colinérgica. Acetilcolina es liberada por la neurona presináptica, interactúa con receptores nicotínicos en la postsináptica y es degradada por la acetilcolinesterasa en colina y acetato, regulando la señalización neuronal.....	19
Figura 2: Esquema de la cascada amiloides. BACE-1 y γ -secretasa escinden APP, generando A β . Los péptidos A β se acumulan y forman placas amiloides, contribuyendo a la disfunción neuronal en el Alzheimer.	20
Figura 3: Esquema de la hiperfosforilación de Tau. Representación esquemática del papel de la proteína Tau en la desintegración de microtúbulos.	21
Figura 4: Línea de tiempo de Inhibidores actuales que están en uso clínico. Acompañado con los años en los que recibieron la aprobación de la FDA. Adaptada Pravin, N., & Jozwiak, K. (2022).....	24
Figura 5: Etapas principales en el desarrollo clásico de un medicamento. .	29
Figura 6: Flujo de trabajo de cribado virtual, selección de moléculas y validación in vitro (Adaptada de Oddsson et al., 2020).	34
Figura 7: Descripción general del cribado virtual basado en estructuras para ligandos duales de A _{2A} AR/MAO-B (Adaptada de (Jaiteh et al., 2018))......	36
Figura 8: Flujo de trabajo para la búsqueda de moléculas prometedoras a multitarget.....	42
Figura 9: Histograma con cuartiles QED. En el rectángulo coloreado de celeste se marca la región de moléculas correspondiente al cuartil 4 (Q4). 58	58
Figura 10: Farmacóforos generados para los blancos moleculares claves en EA.	66
Figura 11: Gráfico de torta que muestra el porcentaje de la probabilidad que una molécula se clasifique como activa (probabilidad ≥ 0.8) en azul, o inactiva (probabilidad < 0.8) en verde. El total de molecular cribadas con este modelo de ML fue de 13,972,570 compuestos.	68
Figura 12: En el embudo se observa en negro los filtros que ya se han desarrollado, además en la tabla se observa el número de moléculas obtenido del filtrado de Cribado Virtual con ML en cada blanco molecular clave.	69
Figura 13: Distribución de los valores normalizados del Total shape screening score (TSSs) para cada uno de los seis targets evaluados (AChE, BACE-1, CB2, GSK-3 β , MAO-A y Rn- α 7). Los histogramas muestran la concentración de datos en los diferentes rangos de similitud, donde los valores más altos (de 0.5 a 0.75 y de 0.75 a 1) indican una mayor correspondencia con los farmacóforos generados.....	76

Figura 14: Resultados del análisis PBVS de segunda etapa para las moléculas correspondientes a cada uno de los blancos asociados. (A-F) Número de compuestos presentados como una función del número de farmacóforos con los que coincidieron después del PBVS de segunda etapa en Phase. 77

Figura 15: En el embudo se observa en negro los filtros que ya se han desarrollado, además en la tabla se observa el número de moléculas obtenidas hasta el filtrado mediante PBVS en cada *target* clave. 79

Figura 16: Representación de los seis blancos moleculares con sus respectivos ligandos de referencia y residuos clave. Los blancos moleculares y sus ligandos son: (A) AChE con DHI (PDB ID: 4M0E); (B) BACE-1 con ZQS (PDB ID: 7MYI); (C) CB2 con KO8 (PDB ID: 8GUT); (D) GSK-3 β con 6VL (PDB ID: 7SXJ); (E) MAO-A con HRM (PDB ID: 2Z5Y); y (F) Rn- α 7 con PNU (PDB ID: 7EKT). Los residuos clave del sitio de unión se muestran resaltados, ilustrando las interacciones moleculares específicas. Las interacciones están representadas por colores: interacciones hidrofóbicas (magenta), enlaces de hidrógeno (amarillo), Pi staking (celeste) y puentes de agua (gris). 81

Figura 17: En el embudo se observa en negro los filtros que ya se han desarrollado, además en la tabla se observa el número de moléculas con obtenidas hasta el filtrado de *docking* molecular en cada *target* clave. 83

Figura 18: Distribución de Energías de Unión $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$: Selección de Moléculas con energías más favorables. En el rectángulo celeste se destacan las moléculas con valores negativos de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$, correspondientes a las energías de unión más favorables. 88

Figura 19: Moléculas seleccionadas organizadas por clústeres significativos. Cada molécula se presenta con su estructura, identificador y nombre comercial entre paréntesis, además de la sumatoria de la energía de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ (kcal/mol). 90

Figura 20: En el embudo se observa que ya se ha aplicado toda la metodología de virtual screening hasta encontrar los 21 compuestos candidatos. 91

Figura 21: Resultados del ensayo de Ellman para los compuestos M3 y M4 frente a AChE. Se muestra una placa de 96 pocillos, donde las columnas A, B, C y D corresponden a las diluciones del compuesto M3, mientras que las columnas E, F, G y H corresponden a las diluciones del compuesto M4. 94

Figura 22: Curvas concentración-respuesta y de Lineweaver-Burk para AChE en presencia de los compuestos M3 ($IC_{50} = 6.67 \pm 0.03 \mu\text{M}$) y E3 ($IC_{50} = 8.84 \pm 0.04 \mu\text{M}$). (A) La curva concentración-respuesta muestra el perfil de inhibición de AChE con concentraciones crecientes de M3 y E3. (B) El gráfico de Lineweaver-Burk ilustra el recíproco de la velocidad ($1/V$) frente al recíproco de la concentración del sustrato ($1/[S]$), revelando un patrón de

inhibición no competitiva para ambos compuestos. Las muestras fueron evaluadas por triplicado..... 97

Figura 23: Gráficas de concentración-respuesta en AChE para los compuestos M1, M2, M6 y M14, con IC₅₀ menor a 100 µM, las muestras fueron evaluadas por triplicado..... 98

Figura 24: Cambio de coloración de M3 durante el ensayo ABTS^{•+} en tres concentraciones diferentes: 20 µg/mL (16%), 50 µg/mL (51.18%) y 100 µg/mL (76.06%), mostrando un aumento en el atrapamiento de radicales libres. .104

RESUMEN

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afecta la memoria y las funciones cognitivas, asociada con la acumulación de placas de beta-amiloide y la disminución de la actividad colinérgica. Dado que los tratamientos actuales son limitados, los enfoques *multitarget*, que buscan diseñar moléculas para actuar sobre varios blancos terapéuticos simultáneamente, se presentan como una estrategia prometedora. En este estudio, se priorizaron 6 blancos terapéuticos relevantes, y se aplicaron métodos combinados de Cribado Virtual Basado en Ligandos (LBVS) y Basado en Estructura (SBVS) para encontrar potenciales compuestos multitarget. Esto permitió reducir una base de datos inicial de 14 millones de compuestos a 21 moléculas candidatas para validación experimental. Se realizaron ensayos biológicos, incluyendo el método de Ellman para evaluar el IC_{50} frente a AChE y ensayos ABTS y DPPH para medir el atrapamiento de radicales libres. Los compuestos E3 y M3 fueron las moléculas destacadas, con IC_{50} de $8.84 \pm 0.04 \mu\text{M}$ y $6.67 \pm 0.03 \mu\text{M}$, respectivamente. Adicionalmente, M3 mostró un 76% de atrapamiento de radicales libres. Este estudio demuestra cómo los métodos computacionales para cribado virtual permiten identificar eficientemente moléculas que pueden llegar a convertirse en *multitarget*. E3 y M3 destacan por su actividad biológica, abriendo nuevas posibilidades para tratamientos efectivos en Alzheimer.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a neurodegenerative condition that affects memory and cognitive functions, associated with the accumulation of beta-amyloid plaques and a decrease in cholinergic activity. Given the limitations of current treatments, multitarget approaches, which aim to design molecules capable of acting on multiple therapeutic targets simultaneously, emerge as a promising strategy. In this study, six relevant therapeutic targets were prioritized, and combined methods of Ligand-Based Virtual Screening (LBVS) and Structure-Based Virtual Screening (SBVS) were applied to identify potential multitarget compounds. This approach reduced an initial database of 14 million compounds to 21 candidate molecules for experimental validation. Biological assays were performed, including the Ellman method to evaluate IC_{50} against AChE and ABTS and DPPH assays to measure free radical scavenging activity. Compounds E3 and M3 stood out, with IC_{50} values of $8.84 \pm 0.04 \mu\text{M}$ and $6.67 \pm 0.03 \mu\text{M}$, respectively. Additionally, M3 showed 76% free radical scavenging activity. This study demonstrates how computational virtual screening methods efficiently identify molecules with potential multitarget capabilities. E3 and M3 stand out for their biological activity, opening new possibilities for effective Alzheimer's treatments.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson, están estrechamente asociadas al proceso de envejecimiento, aumentando su incidencia con la edad. Estas patologías se caracterizan por una disfunción selectiva y pérdida progresiva de sinapsis y neuronas, consecuencia de la acumulación de proteínas patológicamente alteradas que se depositan principalmente en el cerebro y la médula espinal (Kovacs, 2019). Este deterioro de las redes neuronales, agravado por la limitada capacidad regenerativa de las neuronas debido a su naturaleza terminalmente diferenciada, afecta tanto la salud física como mental (Wilson et al., 2023).

El colapso de los circuitos de comunicación neuronal provoca alteraciones progresivas de la memoria, la cognición, el comportamiento y las funciones motoras y sensoriales. Estas patologías, que forman parte de un grupo heterogéneo de trastornos neurológicos que impactan profundamente la calidad de vida de millones de personas en todo el mundo (Wilson et al., 2023). A pesar de los avances en la comprensión de las interacciones genéticas, epigenéticas y ambientales involucradas que constituyen a su desarrollo, la falta de terapias efectivas para detener su progresión sigue

siendo un desafío global (Agnello & Ciaccio, 2022; Chen et al., 2016; Johnson, 2015; Kosik et al., 1986; Kritsilis et al., 2018; Neumann et al., 2006).

2. Enfermedad de Alzheimer

La demencia, que implica una disminución significativa de las capacidades cognitivas que afecta las actividades cotidianas, incluye a la Enfermedad de Alzheimer (EA) como la forma más prevalente, representando al menos dos tercios de los casos en personas mayores de 65 años. Esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por una progresiva degeneración y pérdida de células nerviosas en el cerebro, lo que conduce a una disminución de habilidades cognitivas como la memoria, el razonamiento y la capacidad de realizar tareas cotidianas, lo que representa un desafío tanto para la atención médica como para la investigación (Arrué et al., 2022; Peřinová et al., 2020; Querfurth & LaFerla, 2010) .

A nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 55 millones de personas en el mundo padecen algún tipo de demencia, siendo el 60-70% atribuible al Alzheimer, destacando así su impacto global. Cada año, se registran casi diez millones de casos nuevos, y la demencia se ha convertido en una de las principales causas de discapacidad y

dependencia entre las personas mayores (*OMS-Demencia, 2023*). En los Estados Unidos, se estima que 6,2 millones de personas padecen demencia por EA, y este número se proyecta que crezca a 12,7 millones para el año 2050. A nivel global, se prevé que el número de personas con demencia por EA alcance los 150 millones para esa misma fecha (*Cummings et al., 2023*). Más del 60% de las personas con demencia viven en países de ingresos medianos y bajos, lo que resalta la desigualdad en la distribución de la enfermedad. En términos económicos, la demencia representó un costo global de 1,3 billones de dólares en 2019, siendo aproximadamente el 50% de este monto atribuible al apoyo brindado por cuidadores informales (*OMS-Demencia, 2023*). En Chile al año 2017, alrededor de 200,000 individuos se ven afectados por esta enfermedad, evidenciando la necesidad de abordar este problema a nivel local (*Livingston et al., 2020; Plan Nacional de Demencia, 2017*). Estas cifras subrayan cómo EA impacta tanto a nivel individual como en la sociedad en su conjunto.

A nivel patológico, se manifiesta con la acumulación de péptidos β -amiloide 40 ($A\beta_{40}$) o β -amiloide 42 ($A\beta_{42}$) formando placas seniles (SP), así como la presencia de proteína Tau hiperfosforilada que se aglomera en ovillos neurofibrilares (NFT) dentro de las células neuronales degeneradas. Estos procesos desencadenan respuestas inflamatorias que contribuyen a la pérdida de células neuronales y afectan el sistema colinérgico, esencial

para la función cerebral normal (Briggs et al., 2016; Peřinová et al., 2020; Pravin & Jozwiak, 2022; Von Bernhardi & Eugenín, 2004).

3. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer

La EA, una enfermedad compleja que involucra varias hipótesis, como la acumulación de A β y la hiperfosforilación de la proteína Tau. Estas teorías, junto con la hipótesis colinérgica, son esenciales para investigar tratamientos y estrategias preventivas efectivas.

Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica plantea que la disminución de la actividad colinérgica, es decir, la reducción de la acción de la acetilcolina (ACh) en el cerebro, contribuye al deterioro cognitivo en el Alzheimer, afectando procesos como la memoria y el aprendizaje. Dos blancos terapéuticos clave son la acetilcolinesterasa (AChE) responsable de degradar la ACh (H. R. Liu et al., 2015; Marucci et al., 2021) y el receptor nicotínico alfa-7 (Rn- α 7) que regula la actividad colinérgica (Zhao et al., 2021). La inhibición de la AChE prolonga la acción de la ACh, mientras que la modulación del Rn- α 7 mejora la transmisión sináptica y reduce la inflamación, representando ambos enfoques prometedores en el tratamiento de la enfermedad (Figura 1).

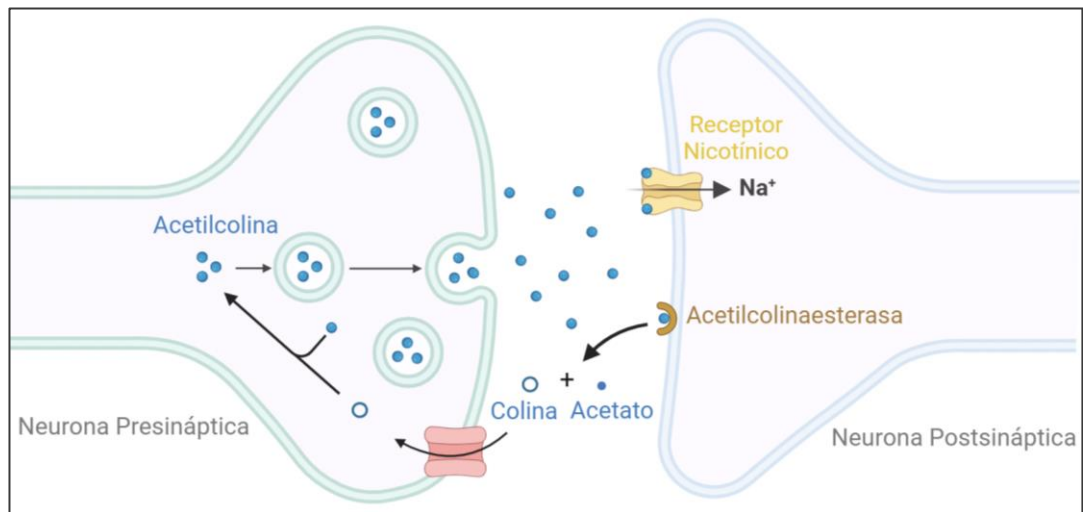


Figura 1: Esquema de la sinapsis colinérgica. Acetilcolina es liberada por la neurona presináptica, interactúa con receptores nicotínicos en la postsináptica y es degradada por la acetilcolinaesterasa en colina y acetato, regulando la señalización neuronal.

Hipótesis de la cascada amiloide

La hipótesis de la cascada amiloide propone que el procesamiento anómalo de la proteína precursora de amiloide (APP) genera el péptido $\text{A}\beta$ (Hardy & Selkoe, 2002) especialmente $\text{A}\beta_{42}$ que se acumula formando placas amiloides en el cerebro, como se observa en la Figura 2. Estas placas desencadenan una cascada patológica que conduce a daño sináptico, inflamación, estrés oxidativo y pérdida neuronal (Francis et al., 2005; Hardy & Selkoe, 2002; Serrano-Pozo et al., 2011).

La enzima Beta-secretasa 1 (BACE-1) participa en la escisión inicial de la APP, lo que da lugar a la producción de A β (Jabir et al., 2021) . Su actividad excesiva favorece la acumulación del péptido, alterando la homeostasis celular y acelerando la disfunción neuronal, lo que la convierte en un blanco relevante para estrategias terapéuticas dirigidas al tratamiento del Alzheimer.

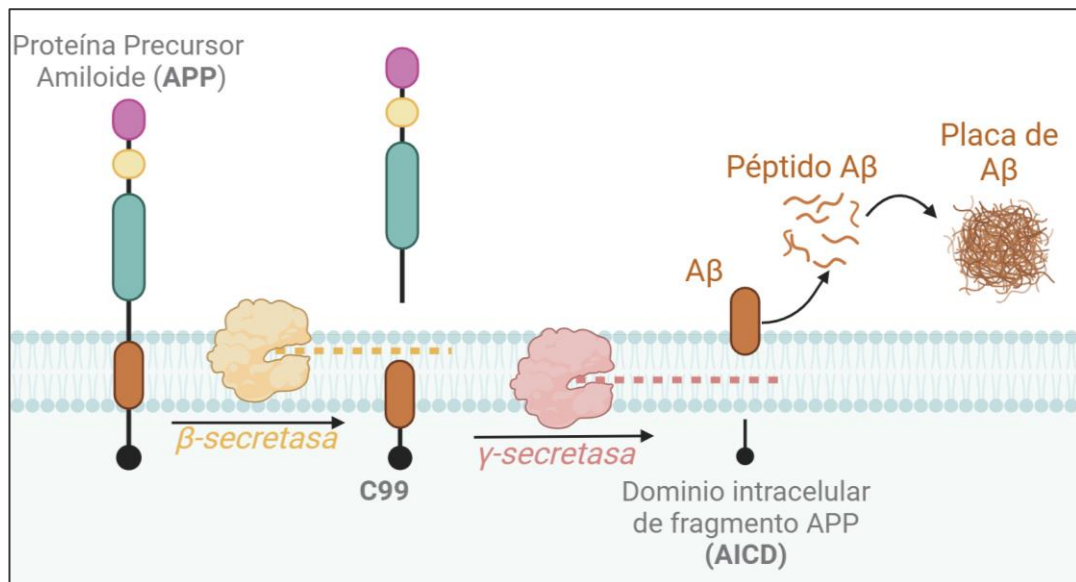


Figura 2: Esquema de la cascada amiloides. BACE-1 y γ -secretasa escinden APP, generando A β . Los péptidos A β se acumulan y forman placas amiloides, contribuyendo a la disfunción neuronal en el Alzheimer.

Hipótesis de la proteína Tau

La proteína Tau desempeña un papel fundamental en la estabilización de los microtúbulos en las neuronas (Briggs et al., 2016). No obstante, cuando

esta proteína experimenta hiperfosforilación, pierde su capacidad para estabilizar los microtúbulos y se forma una acumulación de NFT en el soma neuronal, interfiriendo con funciones celulares claves, como el transporte axonal y la señalización (Figura 3). Este proceso patológico se puede iniciar por la acumulación de A β , que se ha relacionado con la activación de vías moleculares que favorecen la hiperfosforilación en Tau (Bloom, 2014; Francis et al., 2005). Un actor clave en este proceso es la enzima Glicógeno Sintasa Quinasa 3 Beta (GSK-3 β) que participa en diversos procesos celulares, incluyendo la fosforilación de Tau (Hernandez et al., 2013).

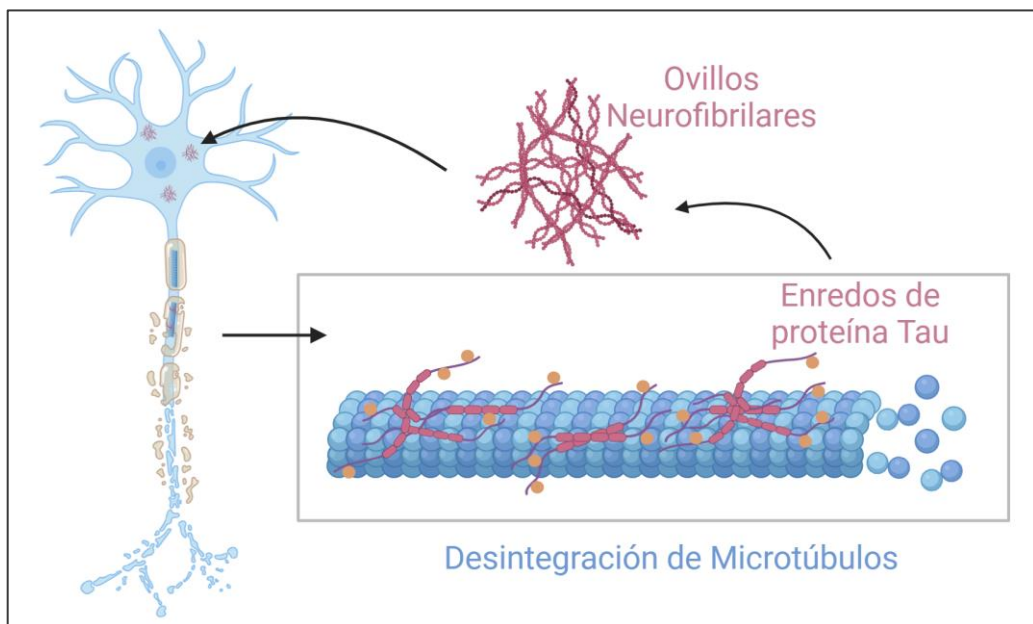


Figura 3: Esquema de la hiperfosforilación de Tau. Representación esquemática del papel de la proteína Tau en la desintegración de microtúbulos.

Por otro lado, aunque el Receptor Cannabinoide tipo 2 (CB2) y la Monoaminoxidasa A (MAO-A) no están directamente relacionados con las hipótesis centrales de la EA, MAO-A se ha implicado en la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que contribuye al estrés oxidativo y agrava el daño neuronal al afectar la función mitocondrial y promover la muerte celular (Behl et al., 2021; Seong et al., 2022), mientras que el CB2 modula procesos inflamatorios y neuroprotectores, jugando un papel en la modulación de la neuroinflamación, un proceso clave en la progresión de la enfermedad. La activación de CB2 puede reducir la inflamación en el cerebro, especialmente en células gliales como microglías y astrocitos, involucradas en la respuesta inmune y la eliminación de placas de A β (Li et al., 2023; Magham et al., 2021; Schmöle et al., 2018). Ambos representan blancos terapéuticos potenciales para mitigar la neurodegeneración asociada con la enfermedad.

4. Tratamientos actuales para EA

Se han desarrollado tratamientos sintomáticos como los inhibidores de la AChE (AChEI), que incluyen fármacos como tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina con el propósito de contrarrestar el déficit de ACh en la EA. Estos medicamentos tienen el potencial de mejorar la función cognitiva en pacientes con EA moderada. Sin embargo, es importante destacar que estos tratamientos actúan únicamente en inhibir acetilcolinesterasa y no afectan otros mecanismos claves en la

enfermedad, por lo que sus efectos son paliativos o temporales y tienden a disminuir con el tiempo (Folch et al., 2018). La búsqueda de terapias más efectivas en la EA sigue siendo uno de los principales enfoques de investigación en neurología y farmacología (J. S. Birks & Harvey, 2018; Kumar et al., 2018; Söderberg et al., 2023). La tacrina, el primer medicamento de este tipo fue retirado del mercado por la FDA (Food and Drug Administration) debido a sus efectos hepatotóxicos, lo que representaba un riesgo considerable para los pacientes (Park et al., 2015). Recientemente, en 2021, la FDA ha aprobado dos anticuerpos monoclonales, aducanumab y lecanemab, dirigidos a eliminar la acumulación de placas de A β en el cerebro (IA β) (Pravin & Jozwiak, 2022; Söderberg et al., 2023), lo que representa un avance importante en el tratamiento de la EA.

Los AChEI tienen la funcionalidad de unirse reversiblemente a la enzima que degrada la acetilcolina, un neurotransmisor clave para la memoria. El donepezilo es el único AChEI aprobado para todas las etapas de la enfermedad (J. Birks, 2006). Además, el antagonista del receptor N-metil-D-aspartato, memantina, está aprobado para el tratamiento de la EA moderada a grave y previene la neurotoxicidad de los aminoácidos excitatorios sin interferir con las funciones del glutamato, esencial para la memoria (McShane et al., 2006). Aunque estos tratamientos pueden mejorar la cognición, el comportamiento y las actividades diarias, su

impacto clínico real sigue siendo incierto. Los efectos secundarios comunes incluyen náuseas, diarrea, mareos y alteraciones cardíacas. Ningún medicamento actual puede revertir la progresión de la enfermedad, aunque algunos pueden retrasarla (Cummings et al., 2023; Winslow et al., 2011).

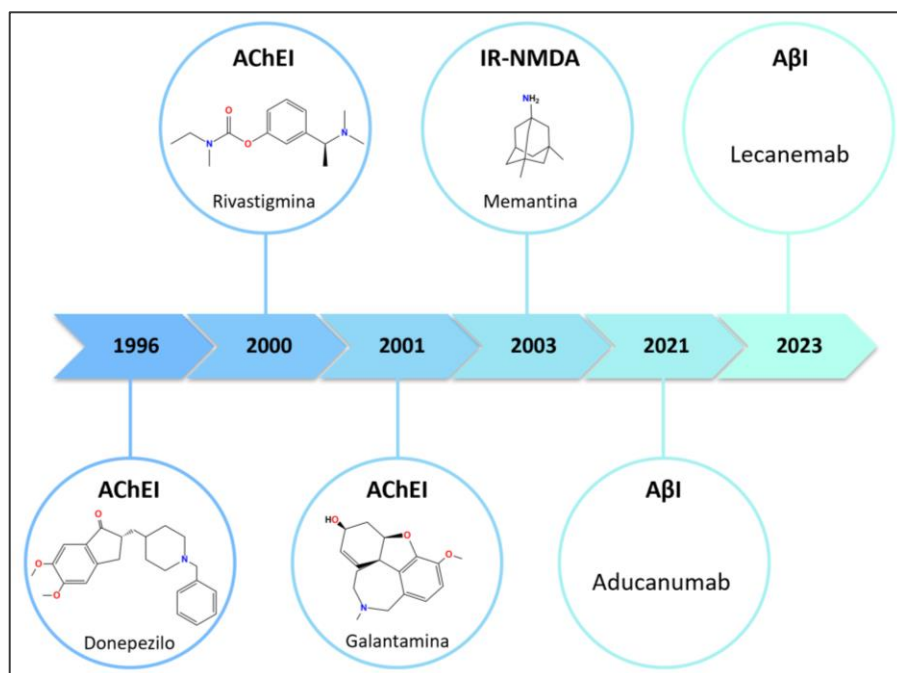


Figura 4: Línea de tiempo de Inhibidores actuales que están en uso clínico. Acompañado con los años en los que recibieron la aprobación de la FDA. Adaptada Pravin, N., & Jozwiak, K. (2022).

5. Evolución del Descubrimiento de Fármacos

El desarrollo inicial de fármacos se centró en el diseño de ligandos dirigidos, moléculas diseñadas para interactuar específicamente con un único blanco

molecular relevante en una enfermedad, siguiendo el principio de “llave-cerradura”, desde finales del siglo XIX (Doytchinova, 2022; Medina-Franco et al., 2013). Este enfoque fue dominante durante décadas, especialmente para patologías donde un solo blanco molecular desempeñaba un papel crucial en la progresión de la enfermedad (Nozal et al., 2021).

Sin embargo, con el tiempo, quedó claro que muchas enfermedades, especialmente las multifactoriales como los trastornos neurodegenerativos, el cáncer y las infecciones, no podían ser tratadas eficazmente con terapias dirigidas a un único blanco, ya que estas patologías implican procesos biológicos complejos, donde múltiples proteínas o rutas moleculares contribuyen simultáneamente a su desarrollo (Albertini et al., 2021; Bolognesi, 2013; Nozal et al., 2021). En las últimas décadas el descubrimiento de fármacos ha experimentado enormes avances, con un énfasis creciente en estrategias integrales que consideran vías múltiples en lugar de blancos individuales para desarrollar fármacos clínicamente eficaces (Stefan & Rafehi, 2024).

Para abordar esta complejidad, surgieron enfoques experimentales y computacionales centrados en la polifarmacología, que busca diseñar compuestos capaces de interactuar con varios *targets* terapéuticos clave de manera simultánea (Anighoro et al., 2014; Ibrahim & Gabr, 2019). En este contexto, los ligandos dirigidos *multitargets* (MTDLs, por sus siglas en

inglés) representan una estrategia prometedora. A diferencia de los ligandos tradicionales, que actúan selectivamente sobre una única proteína, los MTDLs tienen la capacidad de modular simultáneamente múltiples blancos moleculares, permitiendo intervenir en diversas vías biológicas relevantes para la enfermedad. Este enfoque es particularmente útil en patologías como la EA, donde se quiere inhibir procesos como la agregación de proteínas, la neuroinflamación y el estrés oxidativo para lograr un tratamiento eficaz (Ramsay et al., 2018).

No obstante, el diseño de MTDLs enfrenta desafíos importantes. Su capacidad para interactuar con múltiples *targets* puede aumentar el riesgo de modular proteínas no deseadas, conocidas como “*off targets*”, lo que incrementa la probabilidad de efectos adversos (Zhang et al., 2023). Por ello, uno de los principales retos es desarrollar moléculas capaces de actuar con precisión sobre varios blancos terapéuticos clave sin afectar significativamente a otros, optimizando así su efectividad y seguridad (Albertini et al., 2021; Nozal et al., 2021).

Mediante su combinación con la polifarmacología, ha demostrado ser particularmente prometedor en enfermedades como la EA, donde se requiere inhibir varios procesos, como la agregación de proteínas, la neuroinflamación y el estrés oxidativo, para lograr un tratamiento eficaz (Anighoro et al., 2014).

La polifarmacología amplía este concepto, ya que no solo promueve el diseño de MTDLs, sino que también reconoce la capacidad de un único fármaco para interactuar naturalmente con múltiples blancos moleculares en el organismo. Esta estrategia mejora la eficacia terapéutica al permitir una intervención más completa, adaptándose mejor a la diversidad biológica de las enfermedades y minimizando los efectos no deseados. En este sentido, la polifarmacología subraya la importancia de diseñar soluciones terapéuticas integrales que consideren la complejidad biológica de las enfermedades, tratando diferentes aspectos de una patología de manera simultánea y coordinada (Anighoro et al., 2014; Bolognesi, 2013; Hopkins, 2008).

6. Importancia de las herramientas computacionales

La búsqueda de tratamientos más efectivos para enfermedades complejas ha impulsado al campo del descubrimiento de fármacos hacia estrategias más específicas y multifactoriales. En este contexto, el cribado de alto rendimiento o *High Throughput Screening* (HTS) destaca como una estrategia clave en la identificación de compuestos activos contra blancos moleculares específicos. Sin embargo, incluso los proyectos de investigación más ambiciosos enfrentan el desafío de probar experimentalmente una gran cantidad de compuestos, lo cual es lento, costoso y limitado en términos de simular interacciones complejas entre los

compuestos y sus blancos terapéuticos (Guo et al., 2022; Macalino et al., 2015).

El proceso de desarrollo de un fármaco es largo y costoso, tomando entre 10 y 15 años y una inversión de 1,000 millones de dólares en promedio. Las pruebas clínicas en humanos son las que requieren más tiempo y recursos. Sin embargo, gran parte de las moléculas fallan en una o varias etapas, lo que eleva los costos y extiende el tiempo necesario para aprobar un fármaco. Este panorama resalta la necesidad de optimizar las primeras fases del descubrimiento y las pruebas, algo que se puede lograr mediante el uso de herramientas computacionales avanzadas. Estas herramientas permiten aproximaciones más eficientes y precisas en el desarrollo de terapias efectiva (Maniam & Maniam, 2024; Saldívar-González et al., 2017).

La Figura 5 muestra las etapas principales del modelo clásico para el desarrollo de un medicamento. El proceso comienza con la investigación sobre las causas de la enfermedad, lo que puede llevar a la identificación de una o varias dianas moleculares asociadas. Luego, se identifican compuestos activos que interactúan con estos blancos y se optimiza su actividad biológica, mediante ensayos *in vitro* con blancos moleculares aislados. Los compuestos activos pasan por varias evaluaciones experimentales, que incluyen ensayos en líneas celulares, pruebas en animales y, finalmente, pruebas clínicas en humanos. Aquellos que superan todas estas etapas son aprobados para su uso clínico por una

autoridad regulatoria, como la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos (Hughes et al., 2011; Saldívar-González et al., 2017; Southey & Brunavs, 2023) o, en el caso de Chile, la Agencia Nacional de Medicamentos (ANAMED).

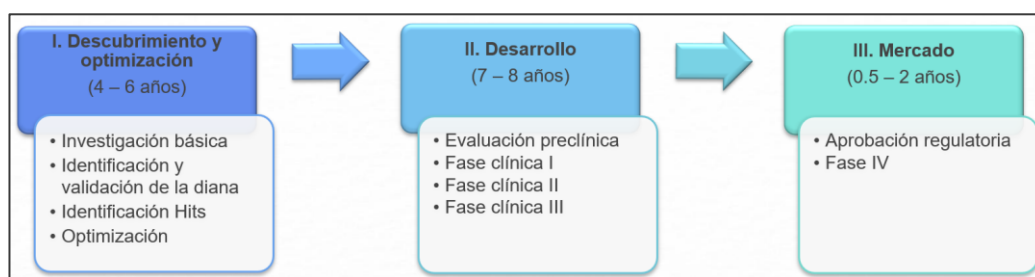


Figura 5: Etapas principales en el desarrollo clásico de un medicamento.

En los últimos 20 años, las herramientas computacionales se han vuelto esenciales para las primeras etapas del descubrimiento de fármacos, tanto en la industria como la academia, con la intención de acelerar el proceso de desarrollo de manera más rentable y, a su vez, minimizar los fallos en etapas finales (Macalino et al., 2015). En este contexto el Cribado Virtual o *Virtual Screening* (VS), un método computacional utilizado en el diseño de fármacos para identificar fármacos potenciales a partir de enormes bibliotecas de compuestos químicos (Panwar et al., 2024; Walters & Wang, 2020), ha emergido como una estrategia prometedora en este campo. Su crecimiento ha sido impulsado por avances computacionales que ahora permiten analizar enormes bibliotecas químicas y realizar cálculos complejos con una precisión y escala antes imposibles. Esto genera un

conjunto manejable de moléculas para ensayos biológicos, consolidándose como una fuerza impulsora en el descubrimiento de nuevos moduladores bioactivos y revolucionando el desarrollo de fármacos (Ciulli, 2013; Doytchinova, 2022; Shoichet, 2004; Stahura & Bajorath, 2004).

Además, el VS utiliza modelos computacionales para describir las complejas interacciones entre las macromoléculas y los ligandos, aprovechando una variedad de métodos que abarcan desde enfoques bidimensionales (2D) hasta tridimensionales (3D). Mientras que los métodos 2D, como QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) (Andrade et al., 2010), se centran en analizar propiedades moleculares escalares para identificar compuestos similares, los métodos 3D, como *docking* molecular, exploran la complementariedad estérica y fisicoquímica entre las conformaciones tridimensionales del blanco macromolecular y el ligando. Este enfoque integral no solo mejora la eficiencia del descubrimiento de fármacos, sino que también profundiza en la comprensión de las interacciones moleculares clave, permitiendo identificar compuestos con mayor especificidad y menor riesgo de efectos adversos al considerar tanto las propiedades estéricas como electrónicas de las moléculas (Murgueitio et al., 2012).

Existen dos categorías principales de métodos en el VS, basadas en el enfoque tridimensional: el Cribado Virtual Basado en el Ligando (LBVS) y

el Cribado Virtual Basado en la Estructura (SBVS) del blanco molecular (Carpenter & Huang, 2018; Lavecchia & Giovanni, 2013; Pont et al., 2021). El LBVS se centra en comparar similitudes moleculares entre compuestos activos e inactivos en bases de datos para identificar candidatos para experimentación. Una variante del LBVS es el Cribado Virtual Basado en Farmacóforo (PBVS), que se basa en la disposición tridimensional de características esenciales comunes, como estructuras, propiedades electrostáticas y químicas, obtenidas de moléculas biológicamente activas. Estas características, como átomos específicos, grupos funcionales o distribuciones de carga son fundamentales para la actividad biológica de los compuestos. El PBVS utiliza este farmacóforo como una plantilla tridimensional para buscar moléculas en una base de datos que presenten una disposición similar de características (Dror et al., 2004; Horvath, 2010; Lavecchia & Giovanni, 2013).

Por otro lado, el SBVS utiliza la estructura 3D del blanco biológico para acoplar las moléculas candidatas a la diana y clasificarlas según su afinidad de unión prevista o su compatibilidad con el sitio de unión. El método más utilizado en SBVS es el *docking* molecular, una técnica para predecir la conformación y la energía de interacción entre una molécula pequeña y una macromolécula biológica como una proteína (Jabir et al., 2021; Parvathy Dharshini et al., 2022; Singh et al., 2023). Este proceso proporciona información esencial para el diseño de fármacos y la optimización de

compuestos con potencial terapéutico. Tras el acoplamiento molecular, el enfoque SBVS a menudo utiliza técnicas adicionales para el análisis de los resultados, como MM-GBSA (Mecánica Molecular - Solvent Accessible Surface Area), para calcular las energías de unión relativas de los complejos proteína-ligando y mejorar la predicción de la afinidad de unión entre el ligando y la diana (Bathula et al., 2020). En este contexto, el uso de métodos *in silico*, especialmente el VS, han surgido como herramientas invaluable. Estos métodos permiten realizar un cribado eficiente y preciso del gran espacio químico actualmente disponible ($\sim 1.5 \times 10^{11}$ compuestos) (Reymond, 2015), lo que acelera significativamente el proceso de identificación y diseño de moduladores más efectivos para los blancos moleculares clave en patologías complejas como por ejemplo la EA, cáncer y trastornos virales.

Adicionalmente, el diseño de fármacos asistido por computadora basado en la estructura del receptor ha demostrado ser un enfoque eficaz para descubrir moléculas *multitarget* en diversas enfermedades. Por ejemplo, en el caso de la hipertensión, se utilizó la estructura de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para diseñar el fármaco captopril, un inhibidor que se une específicamente a esta enzima. Otro caso relevante es el de la dorzolamida, que fue diseñada para inhibir la anhidrasa carbónica II, una enzima implicada en el glaucoma, y se demostró efectiva cuando se administró como solución oftálmica. En la lucha contra la influenza, el

diseño basado en la estructura de la sialidasa permitió desarrollar zanamivir, un inhibidor eficaz del virus de la influenza. Asimismo, en el tratamiento del VIH, el diseño estructural de inhibidores de la proteasa del VIH condujo a la creación de fármacos como saquinavir y tipranavir, los cuales son utilizados para inhibir la replicación viral y mejorar la calidad de vida de los pacientes infectados (Luis & Franco, 2007.; Saldívar-González, Prieto-Martínez, Medina-Franco, et al., 2017; Talele et al., 2010).

Estos casos de éxito demuestran la viabilidad de los métodos computacionales para diseñar fármacos que actúan sobre múltiples blancos terapéuticos, mejorando la eficacia de los tratamientos y reduciendo efectos secundarios. Así, el enfoque de diseño estructural se presenta como una estrategia prometedora para el desarrollo de terapias *multitarget* más específicas y eficaces en el tratamiento de enfermedades complejas.

7. Casos de éxito en el descubrimiento de compuestos con actividad *multitarget*

En el artículo titulado "Structure-Based Discovery of Dual-Target Hits for Acetylcholinesterase and the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors: In Silico Studies and In Vitro Confirmation" (Oddsson et al., 2020), se llevó a cabo una investigación que combinó análisis *in silico* con validación *in vitro* para

descubrir compuestos con actividad dual contra la AChE y Rn- α 7 (Figura 6). Para ello, se utilizó un enfoque estructural que permitió la selección paralela e independiente de una biblioteca de compuestos virtuales disponibles comercialmente. Este proceso condujo a la identificación de un conjunto de 57 compuestos potencialmente activos en ambas proteínas dianas. De estos, se adquirieron 16 compuestos para su validación *in vitro* mediante el método de Ellman y la electrofisiología. Los resultados demostraron que uno de los compuestos, denominado N,N-dimetil-1-(4-(3-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirimidin-6-il)fenil)etan-1-amina (Ýmir-2), exhibió el perfil de actividad deseado, con una inhibición de la AChE ($IC_{50} = 2.58 \pm 0.96 \mu\text{M}$) y activación del Rn- α 7 ($7.0 \pm 0,9\%$ a $200 \mu\text{M}$).

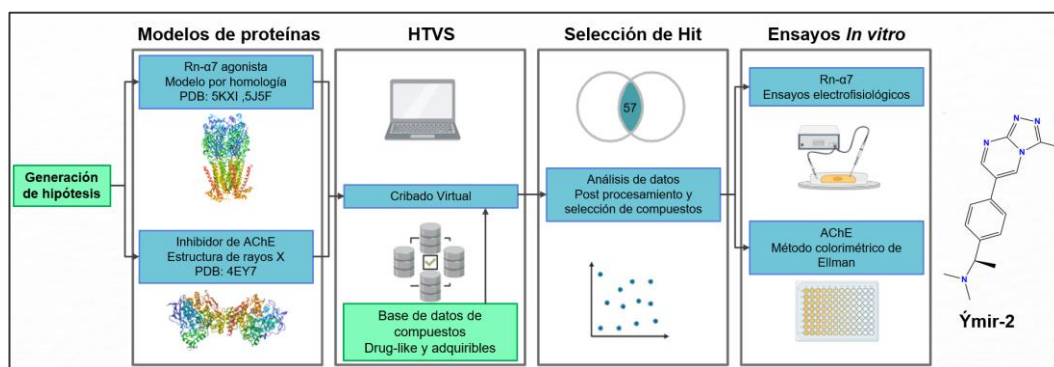


Figura 6: Flujo de trabajo de cribado virtual, selección de moléculas y validación *in vitro* (Adaptada de Oddsson et al., 2020).

En otro estudio relacionado con la enfermedad de Parkinson, el artículo "Docking Screens for Dual Inhibitors of Disparate Drug Targets for

Parkinson's Disease" (Jaiteh et al., 2018) empleó el cribado virtual basado en estructuras, en el cual se combinaron 5.4 millones de moléculas de la base de datos Zinc con estructuras cristalizadas de los receptores A2A adenosina y MAO-B, conocidos como *targets* clave en esta enfermedad (Figura 7). 24 compuestos resultaron seleccionados y fueron evaluados experimentalmente, lo que llevó al descubrimiento de cuatro ligandos *multitargets*. Entre ellos, uno mostró una fuerte afinidad nanomolar ($K_i = 19$ nM) por el receptor A2A AR, y una inhibición de la MAO-B con una IC_{50} de 100 nM. A partir de los resultados obtenidos con los dos mejores ligandos identificados mediante SBVS, se llevó a cabo una optimización dirigida que condujo a la identificación de otro compuesto *multitarget*. Estos compuestos demostraron ser efectivos para contrarrestar la neurotoxicidad inducida, lo que sugiere su potencial aplicación terapéutica en la enfermedad de Parkinson.

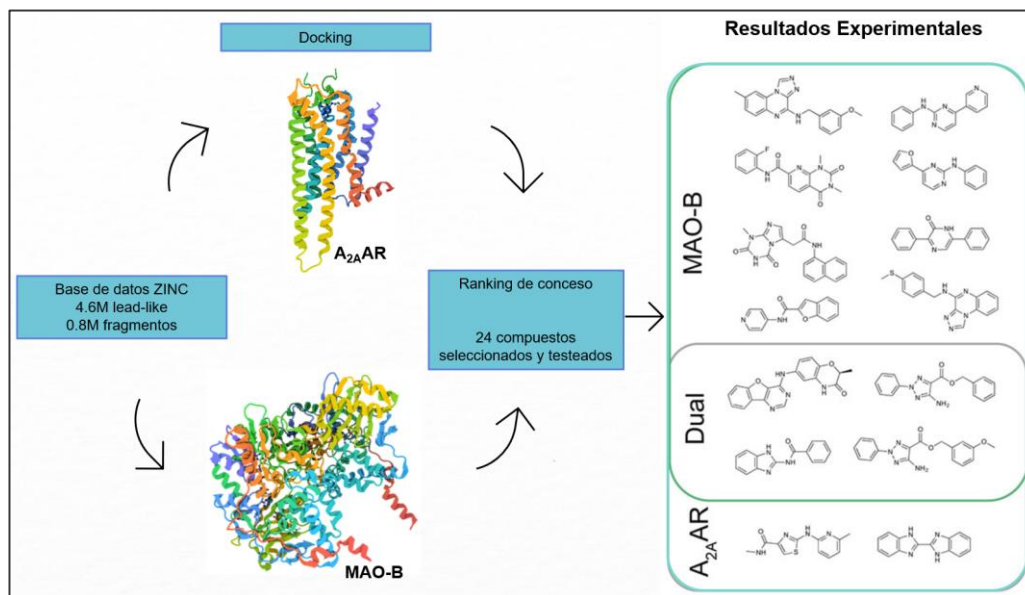


Figura 7: Descripción general del cribado virtual basado en estructuras para ligandos duales de $A_{2A}AR/MAO-B$ (Adaptada de (Jaiteh et al., 2018)).

A través de los estudios realizados en dos artículos publicados, como se describen anteriormente, se ha demostrado la viabilidad de los métodos computacionales para identificar moléculas con actividad *multitarget* en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Estos hallazgos respaldan el uso de técnicas de VS para descubrir compuestos que puedan actuar sobre múltiples blancos terapéuticos, lo que sugiere un enfoque prometedor para el desarrollo de terapias más efectivas y específicas para estas condiciones médicas.

8. Importancia de la validación experimental

Es importante señalar la necesidad de validar los resultados de los métodos computacionales mediante ensayos experimentales, en el contexto de EA, estos ensayos son esenciales para evaluar la eficacia potencial de los compuestos en el abordaje de aspectos críticos de la enfermedad, como el estrés oxidativo y la disfunción neuronal. Para ello, se emplean análisis específicos, como ensayos de capacidad antioxidante y pruebas de actividad biológica, para evaluar la interacción de los compuestos con los blancos terapéuticos. La validación experimental no solo garantiza la precisión y fiabilidad de las predicciones computacionales, sino que también permite ajustar y mejorar los modelos utilizados en las fases de VS, asegurando un proceso de desarrollo.

Los ensayos de capacidad antioxidante (Camargo-Ayala et al., 2022; Polo-Cuadrado et al., 2022) son esenciales para evaluar la capacidad de las moléculas identificadas en el VS para neutralizar los radicales libres y reducir el estrés oxidativo en las células cerebrales afectadas por la EA. Dado que el estrés oxidativo es un factor contribuyente importante en la progresión de la EA, representando una amenaza directa para la supervivencia neuronal (Munteanu & Apetrei, 2021; Rodríguez et al., 2016), comprender cómo los compuestos afectan este proceso es crucial para determinar su potencial terapéutico.

Por otro lado, los ensayos de actividad biológica (Polo-Cuadrado et al., 2022) son igualmente importantes para evaluar cómo las moléculas identificadas interactúan con sistemas biológicos específicos relevantes para la EA. Esto podría incluir la capacidad de los compuestos para modular la formación de placas amiloides, reducir la hiperfosforilación de la proteína tau u otros marcadores biológicos de la enfermedad. Estos ensayos proporcionarán información crucial sobre el posible mecanismo de acción de los compuestos y su idoneidad como candidatos terapéuticos para la EA. A través de estos ensayos, también se espera observar si los ligandos tienen la capacidad de modular sobre los blancos moleculares específicos asociados con la EA.

En este proyecto, se empleará una estrategia exhaustiva que utiliza técnicas avanzadas de VS, como el LBVS y el SBVS, respaldadas por cálculos de energía de MM-GBSA, para analizar una base de datos inicialmente de alrededor de 14 millones de moléculas. Se abordarán simultáneamente seis blancos terapéuticos cruciales en la EA: AChE, BACE-1, Rn- α 7, MAO-A, CB2 y GSK3 β , cada uno representando una pieza fundamental en la patogénesis de la enfermedad.

Esta estrategia implica un proceso de tamizado y selección riguroso utilizando herramientas computacionales avanzadas para reducir significativamente el número de compuestos sometidos a ensayos

biológicos experimentales. A través de filtros de selección exhaustivos, nos enfocaremos en identificar las 21 alternativas más prometedoras para las pruebas de laboratorio. Estas moléculas seleccionadas se someterán a ensayos específicos de capacidad antioxidante y actividad biológica, evaluando minuciosamente su interacción con la enzima acetilcolinesterasa, un blanco biológico fundamental en el contexto de la EA.

Este enfoque multidisciplinario y altamente selectivo nos permitirá identificar compuestos con acciones específicas sobre múltiples blancos terapéuticos, proporcionándonos una comprensión más profunda de su potencial efecto terapéutico.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Mediante la aplicación de una metodología computacional que comprende múltiples etapas de cribado virtual, es posible identificar potenciales compuestos activos frente a AChE, BACE-1, Rn- α 7, MAO-A, CB2 y GSK-3 β , con perfil *multitarget* como promisorio alternativa terapéutica en la enfermedad de Alzheimer.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar y seleccionar potenciales ligandos *multitarget* con aplicación terapéutica contra la Enfermedad de Alzheimer mediante métodos computacionales de Cribado virtual basados en ligando y estructura.

Objetivos específicos

1. Elaborar una librería de moléculas a partir de una combinación de bases de datos gratuitas y comerciales para buscar y clasificar compuestos con similitudes a los fármacos.
2. Desarrollar modelos de farmacóforos comunes entre *targets* claves en la EA.
3. Realizar campañas de cribados virtuales basados en farmacóforos comunes de la librería de moléculas generada.
4. Realizar *Docking* molecular y cálculos de energía libre de unión de los candidatos más prometedores en los *targets* clave.
5. Evaluar la actividad biológica de los mejores compuestos seleccionados frente a AChE, así como su capacidad antioxidante.

METODOLOGIA

Para lograr los objetivos, se creó una base de datos de aproximadamente 65 millones de compuestos recopilados de base de datos comerciales y gratuitas. Se implementó un flujo de trabajo detallado (Figura 8) basado en la metodología de VS, aprovechando herramientas computacionales como PBVS y SBVS para explorar compuestos con potencial terapéutico en la EA. Dando un enfoque en aquellos compuestos que interactúen con al menos dos blancos específicos relacionados con la patología, anticipando así una reducción significativa en el número de compuestos a considerar. Al finalizar el proceso, se seleccionaron los 21 mejores candidatos, los cuales se sometieron a ensayos biológicos y capacidad antioxidante para evaluar su efecto farmacológico en AChE.

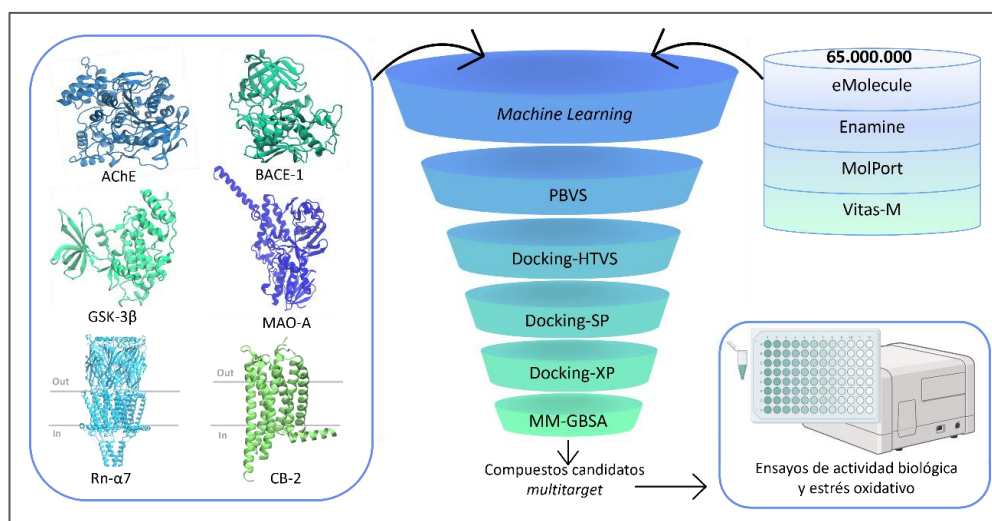


Figura 8: Flujo de trabajo para la búsqueda de moléculas prometedoras a *multitarget*.

OE1. Elaborar una librería de moléculas a partir de una combinación de bases de datos gratuitas y comerciales para buscar y clasificar compuestos con similitudes a los fármacos.

A1.1 Construcción de la librería de moléculas

Se descargaron aproximadamente 65 millones de moléculas en total de diversas bases de datos, incluyendo eMolecules (V 2023.05) (*Home - EMolecules*, n.d.), Enamine (SV) (*Home - Enamine*, n.d.), Molport (V 2023-04) (*Home - Molport*, n.d.) y Vitas-M (V 2023-06) (*Home - VITASMLAB*, n.d.). Cada base de datos ofrece diferentes opciones para descargar archivos, dentro de los que se encuentran formato SDF (de sus siglas en inglés: *Structure Data File*) y SMI (de sus siglas en inglés: *Simplified Molecular Input*). Una vez descargados, se desarrollaron scripts personalizados en el lenguaje de programación Python para facilitar la conversión al formato SMI, que se caracteriza por ser una notación lineal para describir estructuras moleculares usando caracteres ASCII. Permite representar átomos, enlaces y ramificaciones de manera compacta y legible.

Utilizando KNIME (V 4.7) (Roughley, 2018), una plataforma de software de código abierto diseñada para la integración, análisis y visualización de

datos mediante flujos de trabajo, y el nodo RDKit (Lovrić et al., 2019), se unificarán las notaciones en SMILES (de sus siglas en inglés: *Simplified Molecular Input Line Entry System*), asegurando así una representación estandarizada de las estructuras químicas. Posteriormente, los conjuntos de datos que fueron descargados y estandarizados mediante su SMILES se procesaron mediante un script creado con Python para eliminar entradas duplicadas, tanto dentro de la misma base de datos como entre ellas, para eliminar redundancia en la quimioteca.

A1.2 Filtrar librería de molecular a través del QED

Una vez depurada y unificada la quimioteca (A1.1), se calculó el QED (Bickerton et al., 2012a) (de sus siglas en inglés: *Quantitative Estimate of Druglikeness*) a cada una de las moléculas a través de una puntuación. Esta métrica fue utilizada para evaluar la idoneidad farmacológica de las estructuras químicas en una escala de 0 a 1, donde valores cercanos a 1 indican una alta probabilidad de ser candidatos a fármacos, mientras que valores cercanos a 0 sugirieron posibles limitaciones en su efectividad como fármaco.

Para llevar a cabo este proceso, se desarrolló un código en Python utilizando la biblioteca RDKit y el módulo QED. Posteriormente, se empleó el *software* R-Studio (V 4.1.2), una herramienta estadística (*R* y *RStudio*

(Código Abierto, Disponible Gratuitamente) | Biblioteca Del NIH, n.d.), para realizar un análisis exhaustivo y organizar los datos en cuartiles. Se dio un énfasis particularmente al cuarto cuartil (Q4), que agrupó las moléculas con las puntuaciones QED más altas, indicando propiedades con mayor similitud a los fármacos establecidos. Este enfoque permitió reducir significativamente el número de moléculas hasta aproximadamente 14 millones.

A1.3 Creación de la librería de moléculas

La creación de la base de datos o quimiotéca se llevó a cabo mediante el uso de la suite de Schrödinger (V 2021-2) para convertir el conjunto de datos de la A1.2 del formato SMILES al formato Maestro (mae) mediante estructuras 2D, lo que garantiza una mayor uniformidad y compatibilidad dentro de la quimiotéca. Además, se utilizó LigPrep (Goyal et al., 2014) para facilitar la generación de estructuras 3D, debido a que es una herramienta eficaz y rápida para preparar estructuras de alta calidad de ligandos de moléculas pequeñas. Se conservó la estereoquímica desde las entradas originales, evitando así la generación de tautómeros, mientras que los estados de protonación se calcularon a un pH de 7.4 ± 0.2 .

OE2. Desarrollar modelos de farmacóforos comunes entre *targets* claves en la EA.

A2.1. Búsqueda de compuestos activos de *targets* claves en la EA

Se extrajeron los compuestos activos para los blancos moleculares AChE, BACE-1, Rn- α 7, MAO-A, CB2 y GSK-3 β utilizando la herramienta KNIME y la base de datos ChEMBL (V32) (Zdrazil et al., 2023). Los criterios de selección de los compuestos activos incluyen *small-molecules*, que violen hasta 1 de las 4 reglas de Lipinski (Lipinski et al., 2001): peso molecular < 600 g/mol, coeficiente de partición < 5, grupos aceptores de enlaces de hidrógeno < 10, y grupos donadores de enlaces de hidrogeno < 5. Se utilizó el valor de pChEMBL (Nguyen et al., 2017), para expresar la potencia de las moléculas determinadas a partir de uno de varios valores semicomparables de la base de datos ChEMBL, y se define como el \log_{10} negativo (en concentración molar) de la IC₅₀, XC₅₀, EC₅₀, AC₅₀, Ki y Kd. Los compuestos se clasificaron como activos cuando el valor de pChEMBL sea: AChE ≥ 6 , BACE-1 ≥ 7 , Rn- α 7 ≥ 7 , MAO-A ≥ 6 , CB2 ≥ 5 y GSK3 β ≥ 7.52 .

A2.2. Generación de Hipótesis de Farmacóforos.

Para los compuestos activos de cada *target* clave, se modeló un farmacóforo (Horvath, 2010) común que se describe como una

representación abstracta de características moleculares estéricas y electrónicas del ligando en el espacio. Este modelo se llevó a cabo agrupando moléculas según su similitud estructural mediante Morgan *Fingerprint* y el Coeficiente de Tanimoto con una similitud estructural mínima del 60%. Se estableció un umbral significativo utilizando estadísticas para identificar los grupos con moléculas más relevantes mediante sus SMILES.

Además, se generó un farmacóforo común para cada grupo de moléculas por *target* utilizando el software Phase (Dixon et al., 2006) de la Suite de Schrödinger, esperando identificar de 3 a 7 características farmacofóricas. Los farmacóforos para cada grupo se calcularon definiendo las siguientes características: aceptor de enlaces de hidrógeno (A), donante de enlaces de hidrógeno (D), grupo hidrofóbico (H), grupo cargado negativamente (N), grupo cargado positivamente (P) y anillo aromático (R).

Los resultados se analizaron para identificar la mejor hipótesis de cada grupo, considerando su puntaje de PhaseHypoScore, y se seleccionará el farmacóforo con la puntuación más alta para cada grupo de diana clave a estudiar.

OE3. Realizar campañas de cribados virtuales basados en farmacóforos comunes de la librería de moléculas generada.

A3.1 Cribado Virtual con *Machine Learning*

Se utilizaron modelos de aprendizaje automatizado desarrollados por un integrante del equipo del Dr. Ramírez para realizar un primer VS de la quimiotéca diseñada (A1.3). El algoritmo empleó la base de datos de ChEMBL, seleccionando `chembl_id`, `smiles` y `activity_type` (activos e inactivos). Se generaron *fingerprints* de Morgan y se dividió el conjunto de datos en 80% para entrenamiento y 20% para validación.

Se utilizó XGBoost, un algoritmo versátil para clasificación y regresión, optimizando parámetros basados en métricas como F1, balance accuracy y precisión. Esta fase de optimización del modelo se realizó tres veces, una por cada métrica. Finalmente, se crearon tres modelos por proteína, cada uno optimizado según una métrica específica.

Estos modelos calcularon la probabilidad de bioactividad de los compuestos frente a blancos moleculares específicos asociados con la EA. El VS proporcionó una métrica de probabilidad para cada compuesto,

permitiendo una selección rigurosa de aquellos con alta probabilidad de actividad, clasificándolos como activos o inactivos frente a cada *target*. Se evaluó la quimiotéca del ítem A1.3, a través de un flujo de trabajo en KNIME para realizar la selección compuestos con una probabilidad estimada de actividad ≥ 0.8 o los mejores 5×10^5 (si el conjunto superaba los 8×10^5) para avanzar a la siguiente fase.

A3.2 Cribado virtual basado en farmacóforo.

Los farmacóforos que obtuvieron una mejor puntuación en cada diana (A2.2), fueron utilizados para cribar las librerías de compuestos desarrollada en la A3.1. Esta librería fue procesada y preparada usando el software LigPrep, generando una única pose por ligando a un pH de 7.4 ± 0.2 . El PBVS se realizó con el software Shape Screening (Michino et al., 2023). Se calculó la puntuación mediante Shape Screen Score que corresponde a es una métrica que evalúa la similitud estructural entre la forma de una molécula y los sitios de unión de los blancos terapéuticos. A partir de esto, se generó una tabla donde se obtuvo un ranking de la sumatoria para cada molécula y se seleccionó un número de moléculas representativas para cada uno de los *targets* claves mediante PBVS.

OE4. Realizar *Docking* molecular y cálculos de energía libre de unión de los candidatos más prometedores en los *targets* clave.

A4.1 *Docking* Molecular

Se realizó un estudio de *docking* molecular con el software Glide (Friesner et al., 2004) con los seis blancos terapéuticos de forma simultánea y los resultados del PBVS (A3.2). Se utilizaron estructuras cristalinas específicas para el *Docking* molecular: AChE: PDB ID: 4M0E, BACE-1: PDB ID: 7MYI, Rn- α 7: PDB ID: 7EKT, MAO-A: PDB ID: 2Z5Y, CB2: PDB ID: 8GUT y GSK3 β : PDB ID: 7SXJ. Mediante la herramienta *Protein Preparation Wizard* se prepararon las proteínas, agregando átomos de hidrógenos a cada residuo y se asignarán los estados de protonación con Propka (Lu et al., 2021) a un pH 7.4 ± 0.2 , una minimización energética fue realizada en las proteínas ya preparadas para relajar la estructura luego de las adiciones señaladas, usando como criterio de convergencia un valor RMSD de 0.3 Å entre los átomos pesados de la proteína.

Para realizar el *docking*, se establecieron grillas cúbicas centradas en los sitios de unión de los ligandos co-cristalizados en cada estructura cristalográfica, asegurando que estas grillas abarcaran completamente los sitios de unión y campo de fuerza OPLS4 (Lu et al., 2021) . Utilizando Glide

HTVS, SP y XP, se ejecutaron las corridas de *docking* para cada grupo de compuestos obtenidos en la actividad A3.2. HTVS (*High Throughput Virtual Screening*) es más rápido y menos exhaustivo que SP (Standard Precision), ya que reduce la cantidad de conformaciones intermedias y el refinamiento torsional final, mientras que SP proporciona un equilibrio entre precisión y tiempo de computación. Por su parte, XP (*Extra Precision*) realiza un muestreo más detallado que SP y emplea una función de puntuación más rigurosa, eliminando falsos positivos y exigiendo una mayor complementariedad entre el ligando y el receptor (*Docking and Scoring - Schrödinger, n.d.; What Are the Main Differences between HTVS, SP, and XP Docking?, n.d.*). De estas corridas, se generó una pose por ligando, obteniendo alrededor de 5,000 moléculas en SP y 500 moléculas en XP por cada uno de los *targets*.

A4.2 Cribado cruzado de moléculas mediante *docking* XP

Para las mejores 500 moléculas obtenidas del *docking* XP de cada una de las dianas, se realizaron estudios de *docking* adicionales utilizando el método XP. De esta manera, las 500 mejores moléculas obtenidas de cada *target* fueron acopladas mediante *docking* en los otros cinco *targets*, repitiendo este proceso sucesivamente en cada uno de los blancos moleculares. Este procedimiento permitió evaluar la interacción de todas las moléculas seleccionadas con cada uno de los *targets*, con la intención

de identificar compuestos con alta probabilidad de convertirse en *multitargets*.

A4.3. Cálculos de energía libre MM-GBSA y selección de Hits

Para los resultados obtenidos en el ítem 4.2, se aplicaron cálculos de energía libre MM-GBSA utilizando el software Prime (Bathula et al., 2020). En estos cálculos, todos los átomos de la proteína localizados en una esfera de 5 Å alrededor del ligando en todas las direcciones se refinaron como una región flexible, permitiendo adaptar el sitio de unión al ligando previamente posicionado en etapas anteriores. Este proceso se realizó en paralelo para los seis *targets*, y se utilizó para el post-procesamiento de los resultados de cada corrida de *docking* en la etapa A4.2.

Se eligieron los mejores compuestos por corrida basándose en su energía de unión calculada. Además, se calculó la energía libre MM-GBSA para los ligandos co-cristalizados, generando una matriz que permitió la creación de un ranking de los compuestos, donde se incluyeron las moléculas y los valores de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ para cada una, permitiendo una sumatoria de los datos. Con la sumatoria de los valores obtenidos, se identificaron los compuestos que presentaban energías más favorables que los ligandos co-cristalizados en cada *target*.

Posteriormente, se seleccionaron todas las moléculas donde la sumatoria de la energía de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ fuera negativa (más favorable) y se verificó que estas no fueran quirales y seguidamente su disponibilidad comercial en las bases de datos. Con las moléculas seleccionadas, se realizaron clústeres mediante el software KNIME utilizando Morgan *fingerprint* y coeficiente de Tanimoto, considerando una similitud estructural del 80%, seleccionando 21 compuestos prometedores.

OE5. Evaluar la capacidad antioxidante de los mejores 21 compuestos seleccionados, así como su actividad frente a AChE.

A5.1. Estudio cinético de Interacción de moléculas con AChE

Debido a limitaciones de tiempo y alcance, solo se evaluó la actividad biológica de los compuestos seleccionados en A4.3 frente a AChE. Los otros 5 *targets* serán estudiados por otros integrantes del grupo de investigación del Dr. Ramírez.

Se realizó un ensayo de AChE adaptado del protocolo de la Dra. Gutiérrez, utilizando el método espectrofotométrico de Ellman. La AChE fue el objetivo principal para la inhibición enzimática. Las soluciones de los compuestos

se prepararon en DMSO (dimetilsulfóxido) y buffer de fosfato (8mmol L⁻¹ NaH₂PO₄, 150mmol L⁻¹ NaCl y Tween 20 a 0.05% a pH 7.6), cada compuesto se diluyó en una placa de 96 pocillos con buffer de fosfato para obtener concentraciones variables; cada placa se utilizó para evaluar dos compuestos. La solución enzimática se añadirá a la placa, incubándose durante 30 minutos aproximadamente. Posteriormente, se incorporará la solución de sustrato (Na₂HPO₄, acetiltiocolina y DTNB) seguida de una incubación adicional de 15 minutos. La absorbancia a 405 nm se midió con un lector de placas. Cada compuesto se evaluó en triplicado y, mediante análisis de regresión, se calcula los porcentajes de inhibición y los valores de IC₅₀ para evaluar con precisión la capacidad inhibitoria sobre la actividad de la AChE.

A5.2. Evaluación del estrés oxidativo

Se evaluó la capacidad antioxidante de los 21 compuestos seleccionados mediante el método DPPH^{•+} (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), siguiendo el protocolo adaptado de la Dra. Gutiérrez (Polo-Cuadrado et al., 2022). Las soluciones de los compuestos se realizaron con 3 concentraciones distintas y se mezclarán con DPPH en metanol y se incubarán por 10 min, luego la decoloración resultante se midió a través de la lectura de absorbancia a 517 nm para determinar el porcentaje de eliminación de radicales libres a través de la decoloración. Asimismo, la actividad antioxidante de estos

mismos 21 compuestos se evaluó mediante el método ABTS^{•+} (radical catiónico del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), esta solución se preparó con 24 horas previas al ensayo, las soluciones de los compuestos en 3 concentraciones distintas al se mezclaron con ABTS y una mezcla 1:1 de etanol:agua destilada, seguido de una incubación por 30 min y posteriormente se evaluó la decoloración a través de la lectura de absorbancia a 732 nm. Se combinaron las soluciones de los compuestos con la solución de trabajo ABTS^{•+}, midiendo la disminución de la absorbancia para estimar el porcentaje de eliminación de radicales libres.

RESULTADOS

OE1. Elaborar una librería de moléculas a partir de una combinación de bases de datos gratuitas y comerciales para buscar y clasificar compuestos con similitudes a los fármacos.

A1.1 Construcción de la librería de moléculas

Se crearon cuentas de usuario en las bases de datos comerciales eMolecule, Enamine, Molport y Vitas-M. Desde estas plataformas, se descargó un total de 65,445,692 moléculas en formato SDF, como se detalla en la Tabla 1. Posteriormente, se implementó un código en Python (Anexo 1) para organizar los datos de cada molécula dentro de los documentos descargados de cada base de datos. Se realizó mediante open Babel (O'Boyle et al., 2011), transformando el formato SDF a SMI.

Tabla 1: Número de moléculas descargadas por cada Base de Datos comercial.

Base de datos	Cantidad de compuestos
eMolecule	16,994,730
Enamine	538,160
Molport	1,412,803
Vitas-M	46,499,999

Total	65,445,692
-------	------------

Después, se llevó a cabo la estandarización de los SMILES para cada archivo utilizando el nodo de RDKit implementado en KNIME, para asegurar que todas las moléculas fueran transformadas empleando la misma librería (RDKit).

A1.2 Filtrar librería de molecular a través del QED

Se utilizó un script en Python para calcular el QED de cada molécula de la base de datos y se eliminaron compuestos duplicados a nivel individual y entre bases de datos (Anexo 2), para garantizar la integridad de la información destinada a la creación de la librería y no generar redundancia en la información de la quimiotéca. Esta acción resultó en la eliminación de un total de 9,555,314 compuestos repetidos, dejando un conjunto final de 54,890,278 compuestos únicos. Utilizando este conjunto de moléculas, se calcularon los cuartiles con la herramienta R-Studio, los resultados se detallan en la Tabla 2. Se destaca el cuarto cuartil, el cual presenta los mejores valores de QED, siendo estos superiores a 0.824 y cercanos a 1. En la Figura 9, un recuadro celeste ilustra la distribución correspondiente a este cuartil. El conjunto de datos graficados abarca un total de 13,972,571 compuestos que se utilizarán para los cribados posteriores.

Tabla 2: Cuartiles de los valores QED para compuestos de la quimiotéca

[0.00225, 0.555]	(0.555, 0.722]	(0.722, 0.824]	(0.824, 0.948]
Q1: 13,972,570	Q2: 13,972,569	Q3: 12,972,568	Q4: 13,972,571

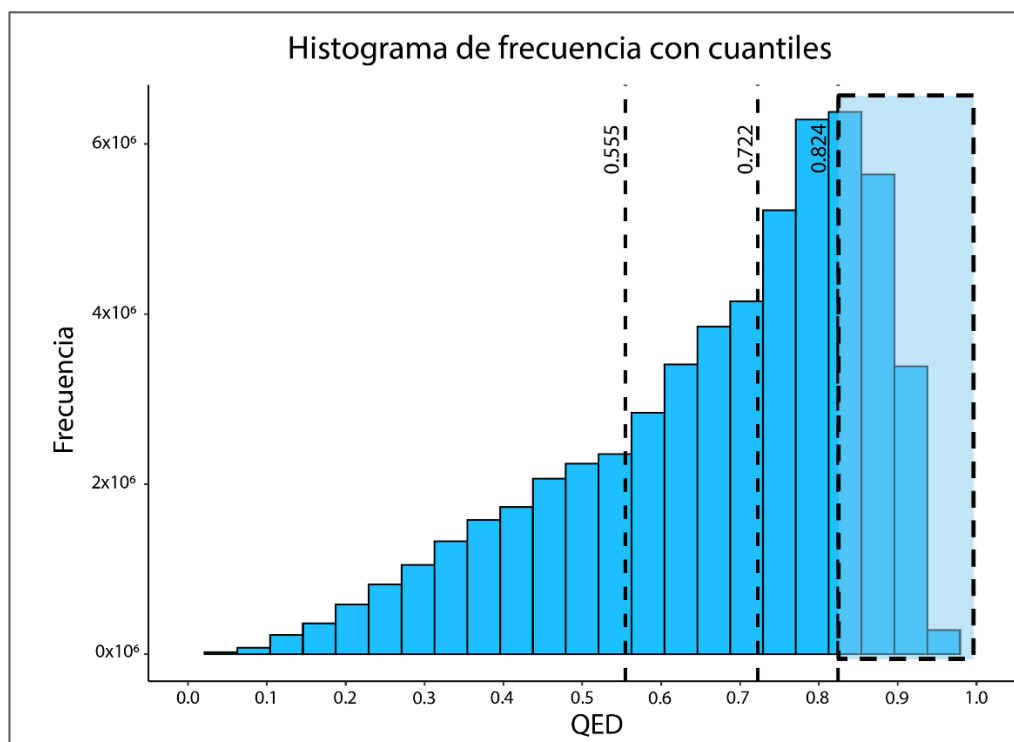


Figura 9: Histograma con cuantiles QED. En el rectángulo coloreado de celeste se marca la región de moléculas correspondiente al cuartil 4 (Q4).

A1.3 Creación de la librería de moléculas

Seguidamente, desde la base de datos obtenida en el ítem A1.2, la cual contiene 13,972,570 moléculas, se llevó a cabo la conversión de estructuras 2D a 3D utilizando la suite de Schrödinger y la herramienta de LigPrep. Esta transformación incluyó la conversión del formato SMILES al

formato mae mediante estructuras 2D, asegurando uniformidad y compatibilidad dentro de la quimiotéca. LigPrep fue fundamental para la generación eficaz y rápida de estructuras 3D de alta calidad, manteniendo la estereoquímica desde las entradas originales (SMI) y evitando la formación de tautómeros. Además, se calcularon los estados de protonación a un pH de 7.4 ± 0.2 .

OE2. Desarrollar modelos de farmacóforos comunes entre *targets* claves en la EA.

A2.1. Búsqueda de compuestos activos de *targets* claves en la EA

Se estableció un flujo de trabajo dedicado al procesamiento de datos, comenzando con el conjunto de proteínas clave asociadas a la EA mencionadas anteriormente, cada una de ellas identificada por un código UniProt y un grupo de compuestos correspondientes. Para cada archivo de compuestos relacionados con un *target* específico, se llevó a cabo una depuración inicial, seleccionando únicamente los compuestos con actividad biológica activa (descartando los intermedios e inactivos) en la base de datos ChEMBL, como se detalla en la Tabla 3 el número de compuestos activos asociado a cada blanco molecular.

Tabla 3: Compuestos Activos Asociados a *target* por Código UniProt.

Target	Código Uniprot	Total de moléculas activas
AChE	P22303	2,577
BACE-1	P56917	3,628
CB2	P34972	5,290
GSK-3β	P49841	761
MAO-A	P21397	617
Rn-α7	P36544	313

Siguiendo el protocolo para cada conjunto de compuestos, se identificaron y separaron los compuestos bioactivos con actividad reportada (EC_{50} , IC_{50} , K_i y pChEMBL) en la base de datos ChEMBL. Al final optamos por seleccionar el valor pChEMBL para nuestro análisis. En la Tabla 4, se observan los umbrales de actividad biológica para cada *target* de acuerdo con valores establecidos por IDG (de sus siglas en inglés: *Illuminating the druggable genome*) (K. R. Sharma et al., 2024), que ha identificado los rangos consensuados en que un compuesto es o no activo frente a un *target* de una familia de proteínas.

Tabla 4: Umbrales de actividad biológica de pChEMBL asignados para cada *target*

Target	Inactivos	Intermedios	Activos
AChE	≤ 4.99	5.00 – 5.99	≥ 6.00
BACE-1	≤ 5.99	6.00 – 6.99	≥ 7.00
CB2	≤ 3.99	4.00 – 4.99	≥ 5.00

GSK-3β	≤ 6.51	6.52 – 7.51	≥ 7.52
Mao-A	≤ 4.99	5.00 – 5.99	≥ 6.00
Rn-α7	≤ 5.99	6.00 – 6.99	≥ 7.00

Seguidamente, se consideraron las Reglas de Lipinski o también conocida como las Reglas de los 5, que son descriptores utilizados en el diseño de fármacos para evaluar la probabilidad de que un compuesto presente propiedades farmacocinéticas favorables, como una buena biodisponibilidad oral. Estas reglas se basan en 4 parámetros dentro de los que se encuentran: peso molecular ≤ 500 g/mol, un máximo de 5 donadores de enlaces de hidrógeno, hasta 10 aceptores de enlaces de hidrógeno y un $\log P \leq 5$, que mide la lipofilidad (Lipinski et al., 2001). Posteriormente, se aplicaron filtros basados en estas reglas, considerando un peso molecular ≤ 600 g/mol y seleccionando compuestos que cumplieran con 3 o 4 características moleculares de importancia farmacocinética.

Para garantizar que los compuestos activos frente a los blancos moleculares seleccionados reflejaran una adecuada diversidad estructural, se realizó un agrupamiento basado en la similitud molecular. Este paso fue de gran importancia para identificar patrones estructurales comunes y organizar las moléculas en grupos con respecto a las características en común. De este modo, se establecieron criterios claros para determinar la similitud entre compuestos usando el *fingerprint* de Morgan y una distancia de Tanimoto con un umbral de 0.6, lo que correspondía a un 60% de

similitud estructural. Posteriormente, los clústeres se generaron considerando estos parámetros y se seleccionaron aquellos que fueran estadísticamente significativos.

Para garantizar la relevancia de los resultados, se estableció un umbral estadístico calculado como el promedio más dos veces la desviación estándar. Este cálculo se realizó considerando la población completa de los clústeres generados, lo que permitió obtener un criterio objetivo para la selección. Adicionalmente, se exigió un mínimo de 10 compuestos por clúster; si este valor era menor, el clúster fue descartado. En la Tabla 5, se detalla el número de clústeres significativos formados para cada *target* clave. En el caso de CB2, que presentaron 14 clústeres significativos, se seleccionaron los 4 mejores con mayor puntaje de hypophascore, una métrica utilizada para evaluar la calidad de los farmacóforos generados. Este puntaje permite identificar los clústeres con los ligandos más prometedores, basándose en su capacidad de interacción con el blanco molecular. En el Anexo 3 se muestra el total de clústeres y los clústeres significativos generados para cada blanco molecular, junto a la tabla también se encuentra presenta el valor del umbral de significancia, determinado como el promedio más dos veces la desviación estándar (promedio + 2 SD), proporcionando una visión completa del proceso de selección. Seguidamente, se descargó cada clúster significativo de moléculas en formato SDF para su análisis posterior.

Tabla 5: Total de clústeres asociados a cada *target*

		AChE	BACE-1	CB2	GSK-3β	MAO-A	Rn-α7
Total moléculas activas		2,577	3,628	5,290	761	617	313
Total moléculas post filtro Reglas de Lipinski		2,264	3,097	4,756	751	570	288
Población clústeres significativos	1	70	354	97	26	30	40
	2	383	185	113	35	49	55
	3	82	173	101	77	20	-
	4	-	157	112	-	-	-
Total moléculas representativas		535	869	423	138	109	95
% representativo		23.6	28.1	8.9	18.4	19.1	33.0

A2.2. Generación de Hipótesis de Farmacóforos.

Los resultados involucran varios procesos automatizados. En el primero, se preparan los compuestos obtenidos del ítem A2.1 utilizando LigPrep de Schrödinger a un pH 7.4 +/- 0.2.

El siguiente proceso se centra en la generación de farmacóforos para cada uno de los clústeres, un paso clave para identificar características comunes dentro del grupo. Para poder crear los farmacóforos, se pueden modificar parámetros, entre ellos está el número de características que se espera que tenga el farmacóforo generado. Este número puede variar, en este caso se escogió que cada farmacóforo tenga entre 3 y 7 características

dependiendo de la complejidad y la diversidad estructural de los compuestos de cada clúster. Se consideran 6 tipos de características: aceptor y donador de enlaces de hidrógeno, carga positiva y negativa, propiedades hidrofóbicas y finalmente anillos aromáticos. Al generar los farmacóforos, estas características pueden repetirse según la naturaleza de los compuestos de cada clúster. Además, se puede asignar el número de farmacóforos que se desea generar para cada grupo de moléculas, con un rango que va de 1 a 10 farmacóforos por clúster. En el caso se consideraron como máximo 10, con el objetivo de obtener un muestreo más amplio y representativo.

Otro parámetro importante es el umbral de coincidencia, que se establece en relación con las propiedades fisicoquímicas de las moléculas dentro de cada clúster. Este umbral, que puede ajustarse entre el 10% y el 100%, determina el nivel mínimo de superposición de las características del farmacóforo con las propiedades de las moléculas para que estas sean consideradas en la creación del farmacóforo. En este caso, se utiliza un umbral de coincidencia del 85%, lo que significa que solo las moléculas que compartan al menos un 85% de sus características fisicoquímicas con el farmacóforo serán incluidas en la generación de este. Finalmente, se selecciona el farmacóforo con el puntaje más alto de phaseyposcore, que corresponde una métrica utilizada para evaluar la calidad de los

farmacóforos generados, considerado como el más representativo para las moléculas del clúster.

La Figura 10 muestra los resultados de los farmacóforos obtenidos en cada uno de los 6 *targets* claves. Estos farmacóforos contienen las características farmacofóricas definidas: aceptor de enlaces de hidrógeno (A), donador de enlaces de hidrógeno (D), grupo hidrofóbico (H), grupo cargado negativamente (N), grupo cargado positivamente (P) y anillo aromático (R), y también se especifica el número de compuestos asociados a cada clúster. Este flujo de trabajo (Valenzuela-Hormazabal Paulina, 2022), está disponible en el repositorio del grupo del Dr. Ramírez, puede ser empleado para la generación de farmacóforos en cualquier blanco molecular. El acceso a está disponible en el siguiente enlace: [crear farmacoforo](#)

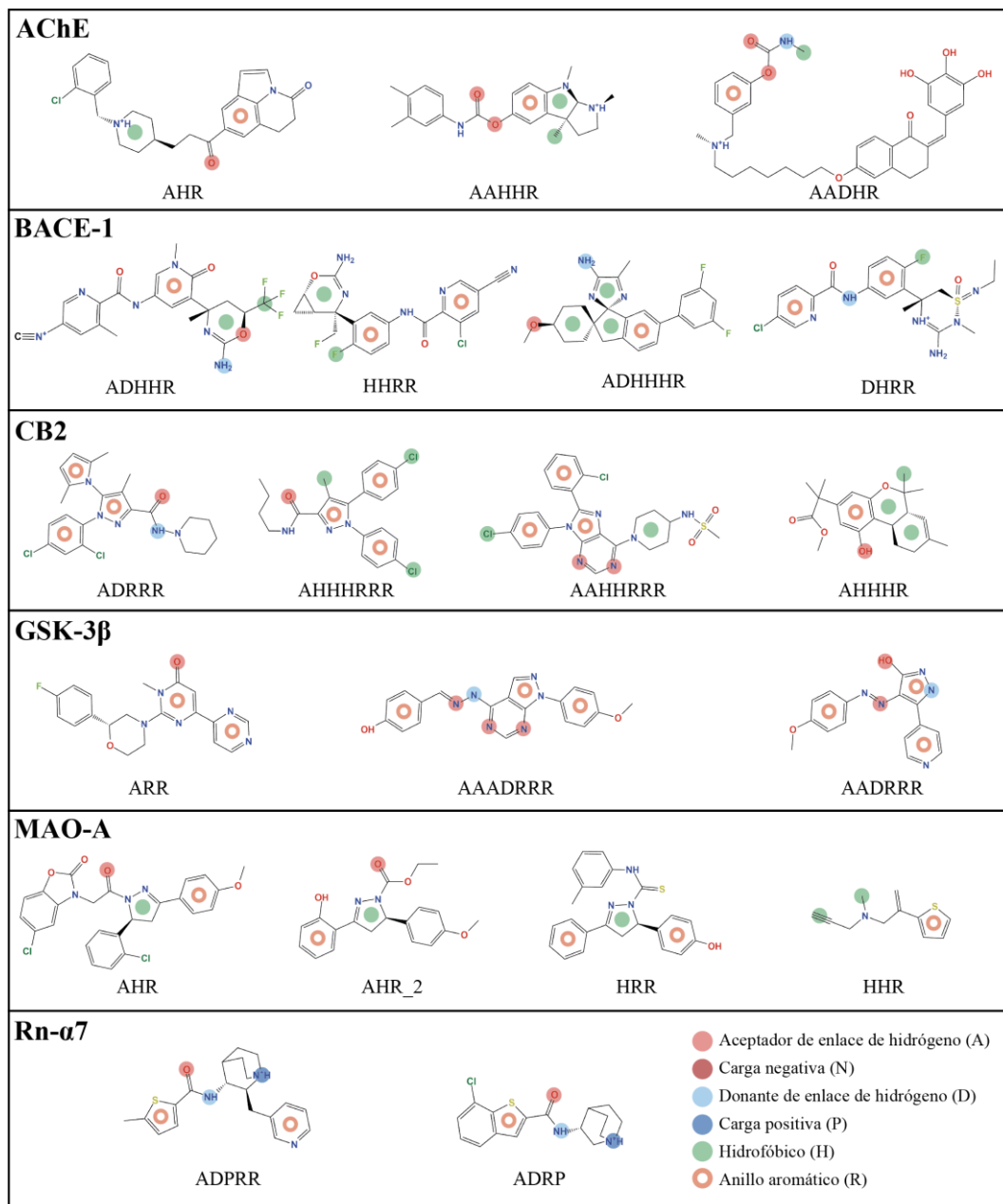


Figura 10: Farmacóforos generados para los blancos moleculares claves en EA.

OE3. Realizar campañas de cribados virtuales basados en farmacóforos comunes de la librería de moléculas generada.

A3.1 Cribado Virtual con *Machine Learning* (ML)

Utilizando el modelo de *Machine Learning* XGBoost, se clasificaron las moléculas obtenidas del ítem A1.3 para cada uno de los blancos moleculares clave en la EA. El modelo se ejecutó individualmente para cada *target* y, mediante el software KNIME, se seleccionaron las moléculas con al menos un 80% de probabilidad de ser activas. Este procedimiento, basado en el *virtual screening* con *Machine Learning*, se realizó utilizando los modelos previamente publicados en el artículo *AlzyFinder: A Machine-Learning-Driven Platform for Ligand-Based Virtual Screening and Network Pharmacology* (Valero-Rojas et al., 2024), creado en el grupo de trabajo del Dr. David Ramírez. Este procedimiento permitió identificar compuestos relevantes para su análisis posterior.

En la Figura 11, se presentan gráficos de torta que muestra la probabilidad de moléculas clasificadas como activas, cuando el clasificador ML estima una probabilidad ≥ 0.8 (Figura 11, azul) frente a las clasificadas como inactivas (cuando el clasificador ML estima una probabilidad < 0.8 , en verde). El número total de moléculas seleccionadas tras el VS con ML varía

según el blanco molecular y proviene de un total inicial de 13,972,571 de compuestos (ítem A1.3). Las moléculas con una probabilidad ≥ 0.8 son las siguientes: para AChE se obtuvieron 3,423,782 moléculas, para BACE-1, 28,309 moléculas, para CB2, 1,099,051 moléculas, para GSK-3 β , 12,057 moléculas, para MAO-A, 198,752 moléculas, y para Rn- α 7, 849,705 moléculas. Para el caso de AChE, se identificó la mayor cantidad de moléculas activas según nuestro criterio de ≥ 0.8 , con un total aproximado de 3.5 millones de compuestos.

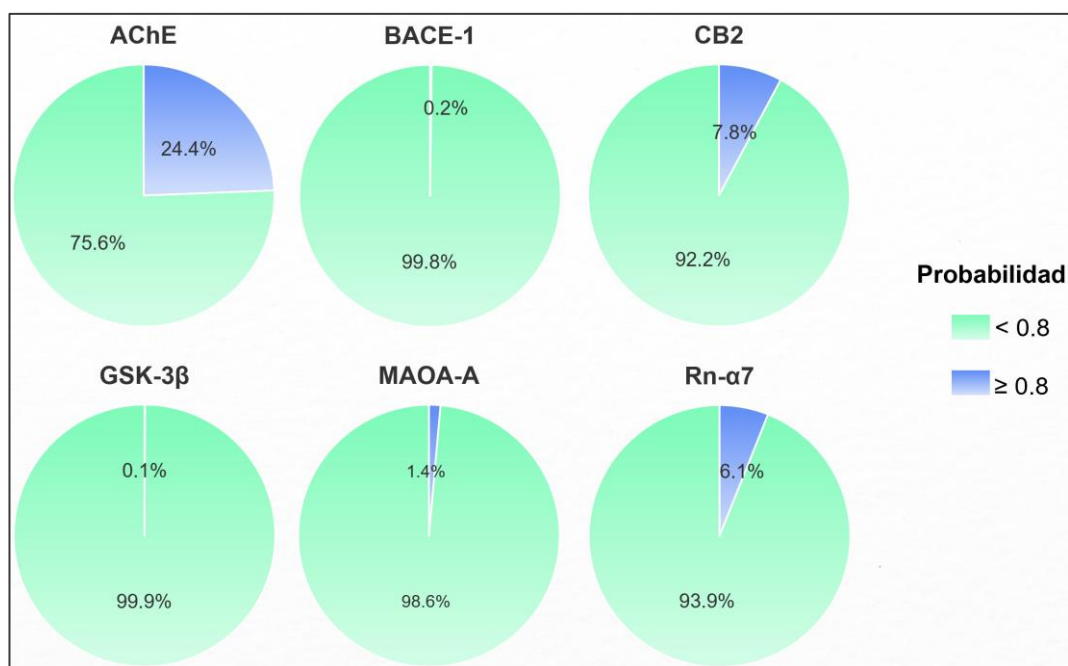


Figura 11: Gráfico de torta que muestra el porcentaje de la probabilidad que una molécula se clasifique como activa (probabilidad ≥ 0.8) en azul, o inactiva (probabilidad < 0.8) en verde. El total de molecular cribadas con este modelo de ML fue de 13,972,570 compuestos.

Dado el volumen de compuestos identificados en AChE, CB2 y Rn- α 7, se seleccionaron las mejores 500,000 moléculas (con mayor probabilidad de ser activas de acuerdo con el modelo ML), que son las más prometedoras de cada uno de estos blancos para reducir tiempos y costos computacionales. En la Figura 12, se muestra un embudo de selección que ilustra los filtros aplicados (en negro) y una tabla con el número de moléculas obtenidas tras el cribado virtual con ML en cada blanco molecular.

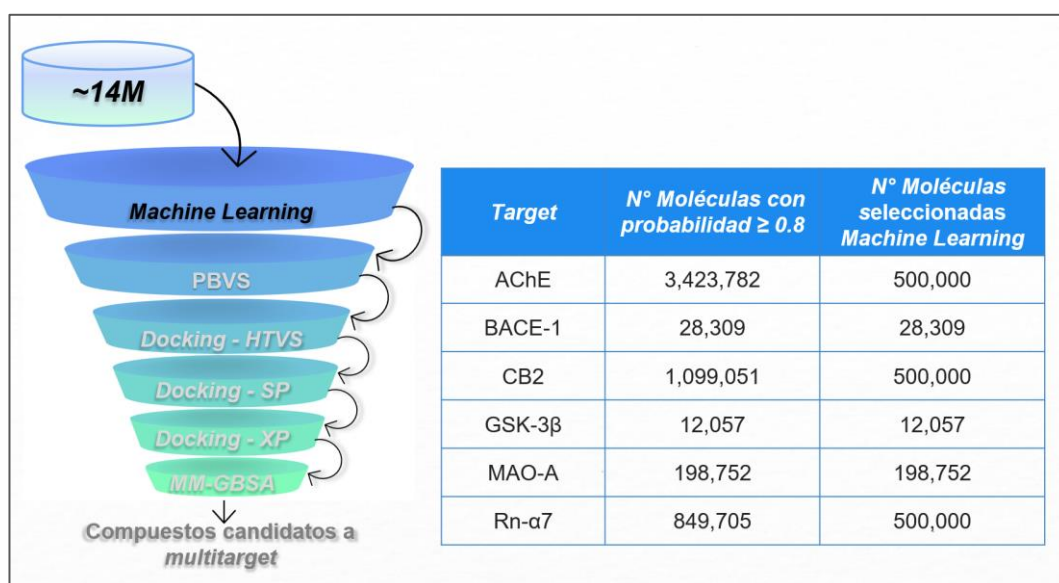


Figura 12: En el embudo se observa en negro los filtros que ya se han desarrollado, además en la tabla se observa el número de moléculas obtenido del filtrado de Cribado Virtual con ML en cada blanco molecular clave.

A3.2 Cribado virtual basado en farmacóforo (PBVS).

Se llevó a cabo un PBVS utilizando los 19 farmacóforos generados en el ítem A2.2, como se detalla en la Figura 10. Este proceso se aplicó a la base de datos preparada en el ítem A3.1 para cada uno de los blancos moleculares clave. Las moléculas de la base de datos se prepararon utilizando la suite Schrödinger y LigPrep, generando una única conformación por ligando a un pH de 7.4 ± 0.2 . Posteriormente, mediante el módulo *Shape Screening*, se evaluó la superposición tridimensional entre cada molécula del ítem A3.1 y los farmacóforos generados, permitiendo identificar aquellas moléculas que cumplen con la mayor similitud con los farmacóforos.

El cribado se desarrolló de manera paralela para las bases de datos asociadas a cada *target* molecular clave, optimizando el tiempo de procesamiento y maximizando la eficiencia del análisis.

Mediante *Shape Screening*, se calculó el *Shape Screen Score* para cada set de moléculas obtenidos en A3.1 (Figura 12), lo que permitió construir una matriz con el ranking de la sumatoria de las puntuaciones obtenidas. El *Shape Screen Score* mide el grado de superposición tridimensional entre

una molécula y el modelo farmacofórico, donde un mayor puntaje indica una mejor coincidencia (Michino et al., 2023). Las características farmacofóricas consideradas incluyeron aceptores de enlaces de hidrógeno (A), donadores de enlaces de hidrógeno (D), regiones hidrofóbicas (H) y anillos aromáticos (R), fundamentales para identificar la interacción con los blancos moleculares. Este análisis permitió identificar, en orden decreciente, las moléculas con mayor coincidencia con el farmacóforo.

En las Tablas 6 a 11, se presentan los resultados obtenidos para cada blanco, utilizando la matriz generada a partir del *Phase Screen Score* de cada compuesto. Cada tabla incluye los cinco mejores resultados y el compuesto con la puntuación más baja, proporcionando una visión clara de los compuestos más prometedores y del menos efectivo en cada caso.

Estos resultados facilitan la identificación de los compuestos con mayor potencial, guiados por sus puntuaciones *Phase Screen Score*, y constituyen una base sólida para la selección de candidatos en los siguientes pasos del proceso de cribado.

Tabla 6: Matriz del *Phase Screen Score* para los compuestos del target AChE tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.

AChE					
Nº	Molécula	AHR	AAHHR	AADHR	TSSs
1	MolPort-001-683-926	0.337	0.684	0.259	1.28
2	MolPort-003-849-930	0.337	0.684	0.259	1.28
3	MolPort-004-955-150	0.337	0.684	0.259	1.28
4	MolPort-006-117-491	0.337	0.684	0.259	1.28
5	MolPort-006-117-492	0.337	0.684	0.259	1.28
...
500,000	337264424	0	0	0	0

Tabla 7: Matriz del *Phase Screen Score* para los compuestos del target BACE1 tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.

BACE1						
Nº	Moléculas	ADHHR	HHRR	DHRR	ADHHHR	TSSs
1	317441343	0.578	0.65	0.625	0.48	2.333
2	MolPort-028-600-125	0.586	0.546	0.5	0.472	2.104
3	320370359	0.432	0.568	0.577	0.395	1.972
4	MolPort-044-193-349	0.467	0.565	0.458	0.448	1.938
5	MolPort-023-293-490	0.456	0.459	0.484	0.447	1.846
...
28,309	337561711	0	0	0	0	0

Tabla 8: Matriz del *Phase Screen Score* para los compuestos del target CB2 tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.

CB2						
Nº	Moléculas	ADHH RRR	AHHH RRR	AAHH RRR	AHHH R	TSSs
1	MolPort-002-861-763	0.595	0.63	0.453	0.357	2.035
2	MolPort-006-658-250	0.585	0.613	0.469	0.323	1.99
3	MolPort-040-493-822	0.308	0.624	0.392	0.661	1.985
4	MolPort-041-563-170	0.307	0.601	0.371	0.693	1.972
5	MolPort-039-902-587	0.326	0.579	0.393	0.668	1.966
...
500,000	337307211	0	0	0	0	0

Tabla 9: Matriz del *Phase Screen Score* para los compuestos del target GSK-3 β tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.

GSK-3β					
Nº	Moléculas	AADRRR	AAADRRR	ARR	TSSs
1	MolPort-020-973-759	0.498	0.477	0.479	1.454
2	MolPort-008-250-473	0.504	0.463	0.483	1.45
3	MolPort-008-467-735	0.504	0.463	0.483	1.45
4	MolPort-008-713-953	0.504	0.463	0.483	1.45
5	MolPort-003-060-819	0.504	0.462	0.483	1.449
...
12,057	337991712	0	0	0	0

Tabla 10: Matriz del *Phase Screen Score* para los compuestos del target MAO-A tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.

MAO-A					
Nº	Moléculas	AHR	HRR	HHR	TSSs
1	MolPort-034-244-321	0.368	0.496	0.393	1.257
2	MolPort-031-316-840	0.218	0.327	0.697	1.242
3	MolPort-033-412-458	0.333	0.453	0.454	1.24
4	MolPort-037-679-726	0.427	0.444	0.367	1.238
5	MolPort-029-297-318	0.379	0.449	0.409	1.237
...
198,752	338842192	0	0	0	0

Tabla 11: Matriz del *Phase Screen Score* para los compuestos del target Rn- α 7 tras el PBVS. Se muestran los cinco mejores resultados (según TSSs) y el último. TSSs: Total Shape Screen Score, entre mayor mejor.

Rn- α 7				
Nº	Moléculas	ADPR	ADPRR	TSSs
1	313132646	1	0.738	1.738
2	MolPort-039-139-650	1	0.738	1.738
3	MolPort-044-724-452	1	0.738	1.738
4	337830096	0.912	0.711	1.623
5	300753429	0.909	0.692	1.601
...
500,000	344770830	0	0	0

Los resultados presentados en la Figura 13 resume la información de las Tablas 6 a 11, mostrando los valores normalizados del total *shape screen score* para cada uno de los seis blancos evaluados (AChE, BACE-1, CB2, GSK-3 β , MAO-A y Rn- α 7). Estos valores reflejan el grado de similitud con los farmacóforos dados, siendo que un puntaje mayor indica una mayor correspondencia con las características estructurales definidas por los farmacóforos. En las gráficas se observa que la mayoría de los datos se concentran en los rangos superiores, específicamente de 0.5 a 0.75 y de 0.75 a 1, aplicados a la quimioteca del ítem A3.1. Esto indica que la mayoría de las moléculas en la quimioteca presentan una similitud elevada con los farmacóforos generados, reforzando la utilidad de estos modelos como

herramientas representativas para identificar moléculas con alta afinidad hacia los seis *targets* analizados.

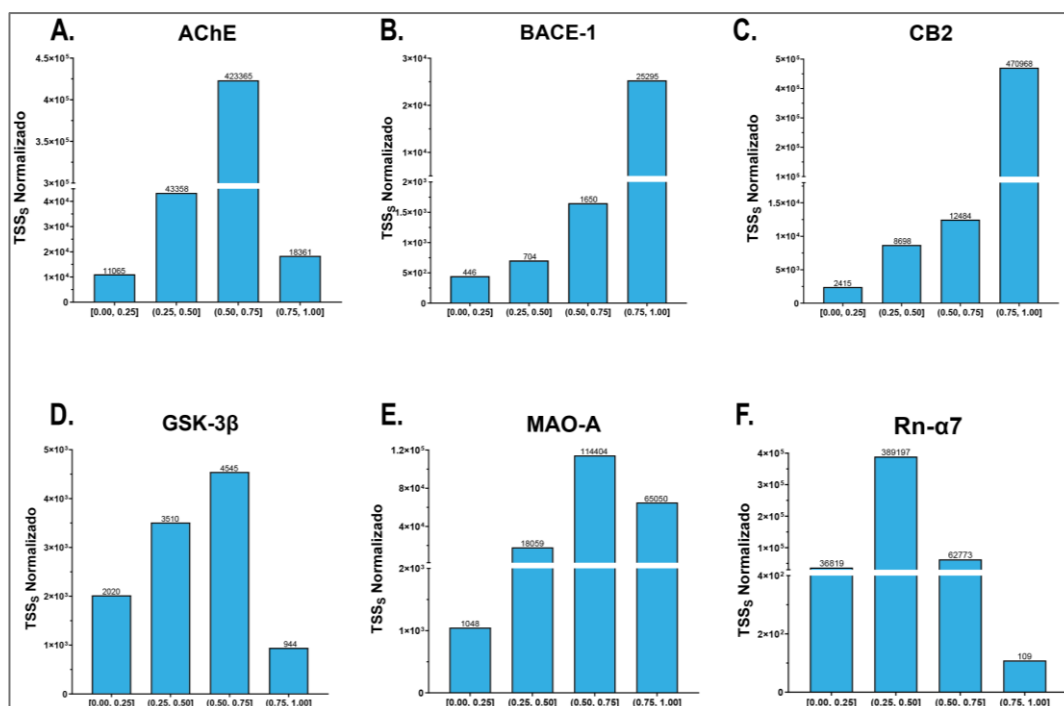


Figura 13: Distribución de los valores normalizados del *Total shape screening score* (TSS_s) para cada uno de los seis targets evaluados (AChE, BACE-1, CB2, GSK-3β, MAO-A y Rn-α7). Los histogramas muestran la concentración de datos en los diferentes rangos de similitud, donde los valores más altos (de 0.5 a 0.75 y de 0.75 a 1) indican una mayor correspondencia con los farmacóforos generados.

Además, en la Figura 14 se muestra el número de moléculas en función del número de farmacóforos coincidentes después del segundo paso de PBVS en Phase, para cada conjunto de moléculas correspondientes a los blancos

clave. Se puede observar que, en cada uno de los casos, el mayor número de moléculas coincidentes está asociado con el mayor número de farmacóforos. Por ejemplo, en el caso de AChE, se presentan tres farmacóforos, de los cuales aproximadamente 446,000 moléculas son prometedoras y coinciden con los tres farmacóforos, unas 38,000 con dos, alrededor de 12,000 con uno, y aproximadamente 4,000 no coinciden con ninguno de ellos. Esto refleja cómo la coincidencia con múltiples farmacóforos aumenta la cantidad de moléculas candidatas identificadas.

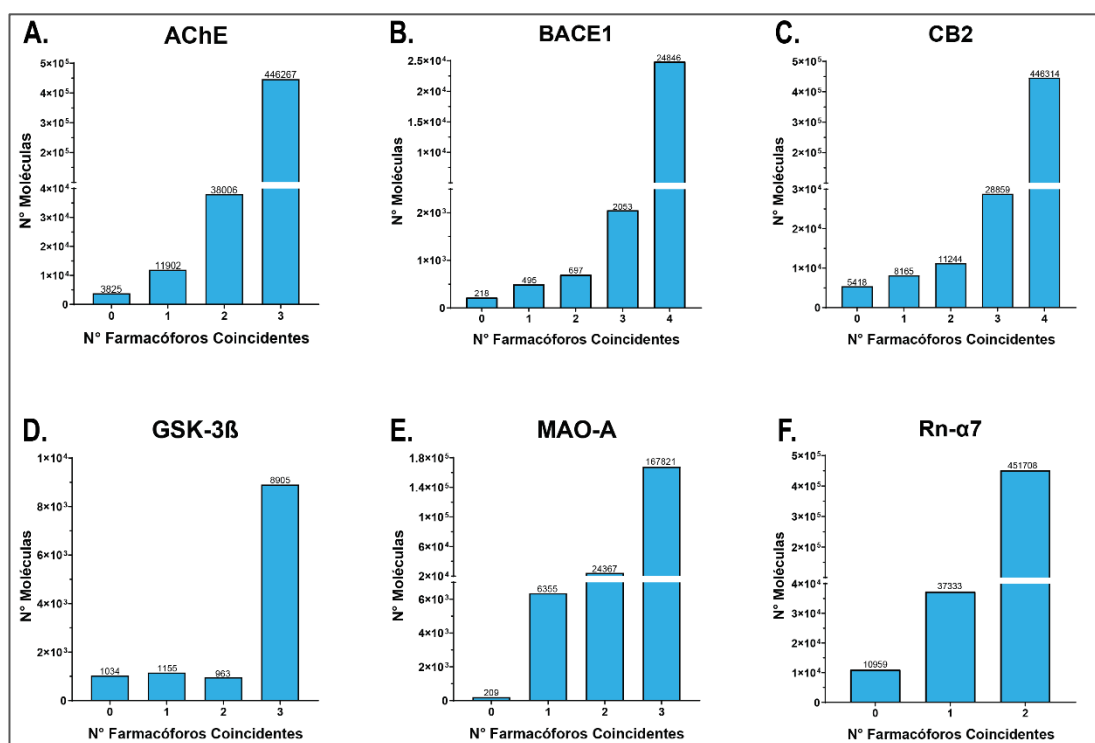


Figura 14: Resultados del análisis PBVS de segunda etapa para las moléculas correspondientes a cada uno de los blancos asociados. (A-F) Número de compuestos presentados como una función del número de

farmacóforos con los que coincidieron después del PBVS de segunda etapa en Phase.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó un conjunto representativo de moléculas para cada uno de los *targets* clave utilizando PBVS. En el caso de AChE, CB2, Rn- α 7 y MAO-A, se seleccionó aproximadamente el 25% mejor de los resultados, definidos por el total *Shape Screen Score*. En el caso de BACE-1 y GSK-3 β , se seleccionaron diferentes porcentajes: aproximadamente el 50% para BACE-1 y cerca del 80% para GSK-3 β . Esto se debió a que los sets de moléculas asociadas a estos dos *targets* presentaban un número considerablemente menor de moléculas en comparación con los otros cuatro blancos. En la Figura 15 se presenta un diagrama de embudo que ilustra los filtros aplicados en cada etapa del proceso, así como el número de moléculas seleccionadas para cada base de datos correspondiente a los *targets* clave.

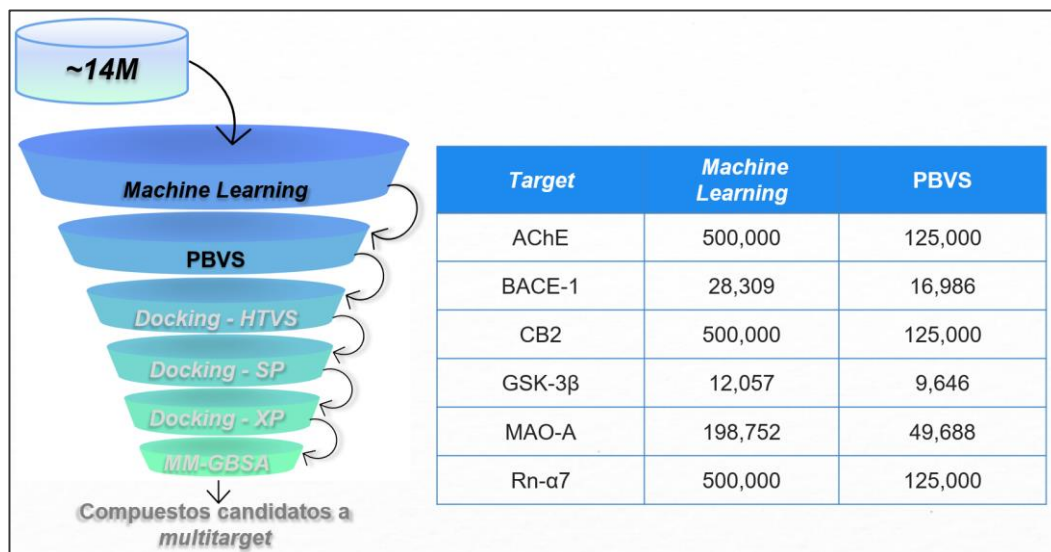


Figura 15: En el embudo se observa en negro los filtros que ya se han desarrollado, además en la tabla se observa el número de moléculas obtenidas hasta el filtrado mediante PBVS en cada *target* clave.

OE4. Realizar Docking molecular y cálculos de energía libre de unión de los candidatos más prometedores en los targets clave.

A4.1 Docking Molecular

Como se describió en la Sección Metodología A4.1, se utilizaron los 6 *targets* clave en la EA para los estudios de *docking* molecular, utilizando tres algoritmos diferentes en el software Glide: HTVS, SP y XP. Cada corrida de *docking* se ejecutó en paralelo para los 6 blancos, utilizando el set de moléculas obtenido en la A3.2.

Las grillas para el docking se crearon centradas en el ligando de referencia de cada proteína, lo que permitió optimizar la precisión de las predicciones al alinear las grillas con el sitio de unión. En la Figura 16 se muestran los 6 blancos moleculares, cada uno con su ligando de referencia: para AChE (PDB ID: 4M0E) el ligando de referencia es DHI (dihydrotanshinone I) (Cheung et al., 2013), para BACE-1 (PDB ID: 7MYI) el ligando es ZQS ((4aR,7aR)-6-(pyrimidin-2-yl)-7a-(thiophen-2-yl)-4,4a,5,6,7,7a-hexahydropyrrolo[3,4-d][1,3]thiazin-2-amine) (McKinzie et al., 2021), para CB2 (PDB ID: 8GUT) es KO8 (1-[[4-[5-fluoranyl-6-[(oxan-4-ylamino)methyl]pyridin-2-yl]phenyl]methyl]-3-(2-methylpropyl)imidazolidine-2,4-dione) (Li et al., 2023), para GSK-3 β (PDB ID: 7SXJ) es 6VL ((4~{S})-4-ethyl-7,7-dimethyl-4-phenyl-2,6,8,9-tetrahydropyrazolo[3,4-b]quinolin-5-one) (Amaral et al., 2023), para MAO-A (PDB ID: 2Z5Y) es HRM (Harmine) (Son et al., 2008), y para Rn- α 7 (PDB ID: 7EKT) es PNU (N-(5-Chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-N'-(5-methyl-3-isoxazolyl)-urea) (Zhao et al., 2021). Además, se destacan los residuos clave para cada uno de estos blancos, donde se centró la grilla.

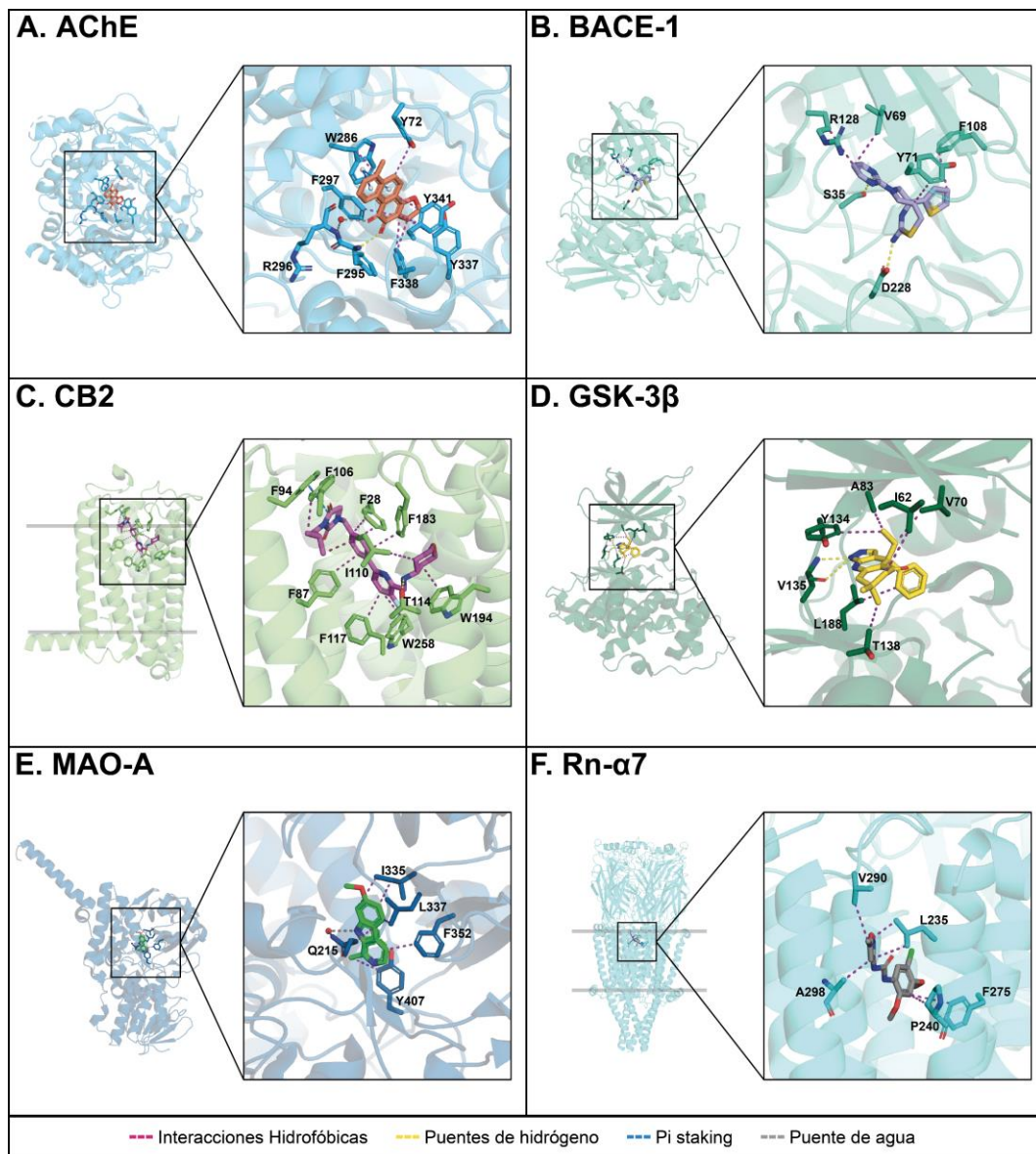


Figura 16: Representación de los seis blancos moleculares con sus respectivos ligandos de referencia y residuos clave. Los blancos moleculares y sus ligandos son: (A) AChE con DHI (PDB ID: 4M0E); (B) BACE-1 con ZQS (PDB ID: 7MYI); (C) CB2 con KO8 (PDB ID: 8GUT); (D) GSK-3 β con 6VL (PDB ID: 7SXJ); (E) MAO-A con HRM (PDB ID: 2Z5Y); y (F) Rn- α 7 con PNU (PDB ID: 7EKT). Los residuos clave del sitio de unión se muestran resaltados, ilustrando las interacciones moleculares

específicas. Las interacciones están representadas por colores: interacciones hidrofóbicas (magenta), enlaces de hidrógeno (amarillo), Pi stacking (celeste) y puentes de agua (gris).

El número de moléculas seleccionadas en HTVS varió para cada blanco debido a la variabilidad en el número de moléculas obtenidas. Para las etapas SP y XP, se estandarizó el número de moléculas a 5,000 y 500, respectivamente. En SP, se obtuvieron 5,000 poses de docking correspondientes a AChE, CB2 y Rn- α 7, 5,096 para BACE-1, 5,064 para GSK-3 β y 4,969 para MAO-A. En XP, se seleccionó el 10% de las poses obtenidas en SP, resultando en aproximadamente 500 poses de docking para cada *target*, lo que corresponde a 500 moléculas diferentes.

En la Figura 17 se presenta el embudo de filtrado, donde se indican los filtros aplicados en cada etapa. También se incluye una tabla con el número de moléculas seleccionadas en cada etapa de *docking*.

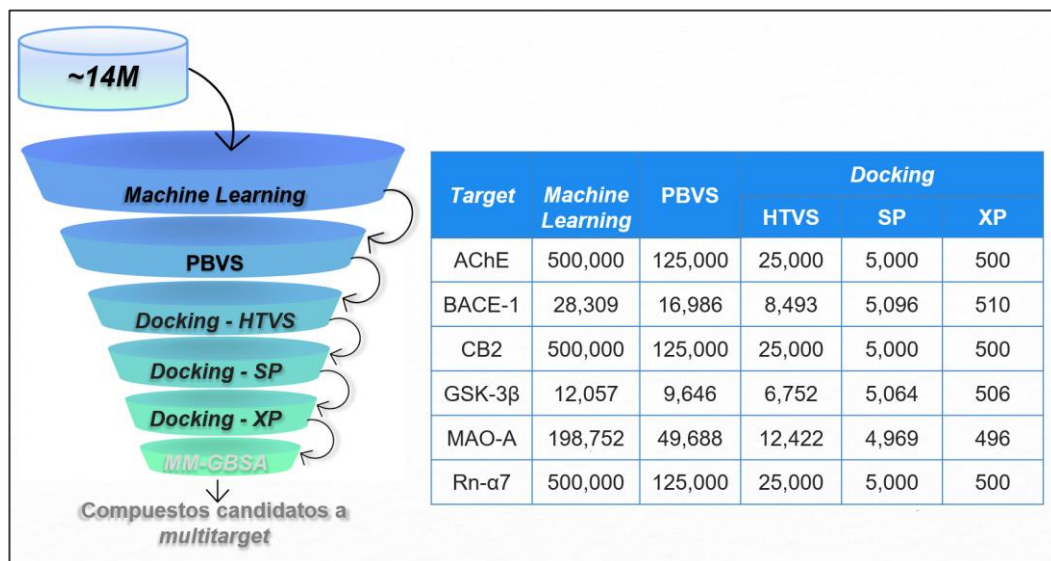


Figura 17: En el embudo se observa en negro los filtros que ya se han desarrollado, además en la tabla se observa el número de moléculas con obtenidas hasta el filtrado de *docking* molecular en cada *target* clave.

A4.2 Cribado cruzado de moléculas mediante *docking* XP

En la etapa A4.1, se obtuvieron las 500 mejores soluciones de docking para cada uno de los seis targets clave (Figura 17). Estas soluciones se sometieron a estudios adicionales de *docking* XP, evaluándolas en todos los demás blancos moleculares. Por ejemplo, los 500 mejores moléculas seleccionadas para AChE fueron acopladas en los otros cinco blancos, generando 3,000 resultados de *docking* únicamente para este *target*. Este procedimiento se repitió para cada uno de los seis blancos, resultando en un total de 3,012 moléculas evaluadas exhaustivamente en los seis blancos moleculares.

Para organizar y analizar estos datos, se construyó una matriz en la que cada fila representa una pose única y cada columna correspondía a uno de los 6 blancos moleculares. En esta matriz se registran los puntajes de *docking* generados en cada corrida, permitiendo evaluar y comparar la afinidad de cada pose por los distintos *targets* (La matriz se encuentra en el siguiente link: [Matriz DockingScore](#)). Este enfoque permitió identificar compuestos con alta probabilidad de convertirse en *multitargets* basándose en los puntajes de *docking*, destacando aquellos que mostraron valores favorables (más negativos) en varios blancos moleculares y posicionándolos como candidatos prometedores.

A4.3. Cálculos de energía libre de unión (MM-GBSA) y selección de Hits

Para los resultados obtenidos en el ítem 4.2, se aplicaron cálculos de energía libre MM-GBSA utilizando el software Prime (Bathula et al., 2020) como método de re-scoring. En estos cálculos, tanto al ligando como a los átomos de la proteína localizados en una esfera de 5Å alrededor del ligando se refinaron como una región flexible, permitiendo adaptar el sitio de unión al ligando previamente posicionado en etapas anteriores. Este proceso se realizó en paralelo para los seis *targets* y se utilizó para el post-procesamiento de los resultados de cada corrida de *docking* en la etapa A4.2.

Adicionalmente, se calculó la energía libre de unión con el método MM-GBSA para los ligandos co-cristalizados de manera rígida en cada uno de los blancos: AChE (-65.49 Kcal/mol), BACE-1 (-46.38 Kcal/mol), CB2 (-97.69 Kcal/mol), GSK-3 β (-49.83 Kcal/mol), MAO-A (-59.36 Kcal/mol) y Rn- α 7 (-44.23 Kcal/mol). Posteriormente, se generó un ranking de los compuestos, incluyendo las 3,012 moléculas (poses de docking del ítem A4.2) y los valores de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$, calculados restando la energía de la molécula o pose de docking menos la energía de unión del ligando co-cristalizado. Este proceso permitió identificar las moléculas con energías más favorables (valor negativo) en comparación con los ligandos de referencia. En la Tabla 12 se muestran las 10 mejores moléculas con la sumatoria total de energía más negativa y las 5 últimas con la sumatoria total de energía más positivas.

Tabla 12: Ranking de moléculas según la sumatoria de energías de unión

$\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$

N°	Molécula	AChE	BACE-1	CB2	GSK-3 β	MAO-A	Rn- α 7	Sumatoria Total $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ (Kcal/mol)
1	MolPort-005-133-817	-15.12	-29.05	-41.16	-13.13	-23.65	-33.16	-155.27
2	MolPort-039-658-513	-7.19	-22.58	-65.3	-13.5	-6.1	-36.05	-150.72
3	MolPort-039-614-273	-39.17	-20.79	-23.31	-2.77	-29.58	-31.46	-147.08

4	MolPort-039-381-153	-12.25	-23.57	-33.74	-2.18	-20.12	-34.44	-126.3
5	MolPort-045-494-966	-22.05	-16.88	-41.09	-8.53	-18.94	-17.97	-125.46
6	MolPort-009-874-997	-15.46	-9.51	-40.96	-10.7	-11.38	-32.88	-120.89
7	MolPort-040-178-690	-4.9	-27.53	-30.69	-8.64	-6.96	-40.49	-119.21
8	MolPort-010-949-578	-22.02	-28.6	-45.54	-12.42	21.85	-30.33	-117.06
9	MolPort-045-495-388	-6.98	-24.3	-22.7	-18.56	-16.71	-25.17	-114.42
10	MolPort-008-307-670	-13.41	-16.65	-20.91	-3.47	-24.9	-30.67	-110.01
...
969	MolPort-039-985-364	16.3	-6.48	-22.71	-1.83	23.52	-8.82	-0.02
...
	MolPort-022-605-343	45.44	21.6	6.01	14.42	99.94	11.27	198.68
3009	MolPort-046-647-657	43.3	34.81	8.96	13.09	83.4	16.02	199.58
3010	MolPort-022-548-066	48.73	24.83	2.77	17.31	86.33	22.11	202.08
3011	MolPort-037-902-746	54.19	26.45	15.75	20.1	85.91	18.57	220.97
3012	MolPort-013-696-598	34.72	37.12	11.03	10.79	125.71	21.01	240.38

A continuación, se seleccionaron las moléculas cuyo $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ tuviera valores negativos, obteniendo un total de 967 moléculas. Se puede

observar la gráfica de la sumatoria total de energías $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ en la Figura 18. Se realizó un script en Python (Anexo 4) para evaluar la quiralidad de estas moléculas, clasificándolas en 501 quirales y 468 no quirales. Si bien es posible que algunas moléculas quirales puedan arrojar resultados relevantes, se decidió enfocar el análisis en las no quirales, ya que, para el proceso de optimización química, planteado como un trabajo a futuro, las moléculas no quirales presentan menos complejidades tanto en su modificación como en su síntesis química. Para las moléculas no quirales, se verificó su disponibilidad comercial en las 4 bases de datos, encontrando

mayor disponibilidad en Molport y Emamine, con un total de 57 moléculas disponibles.

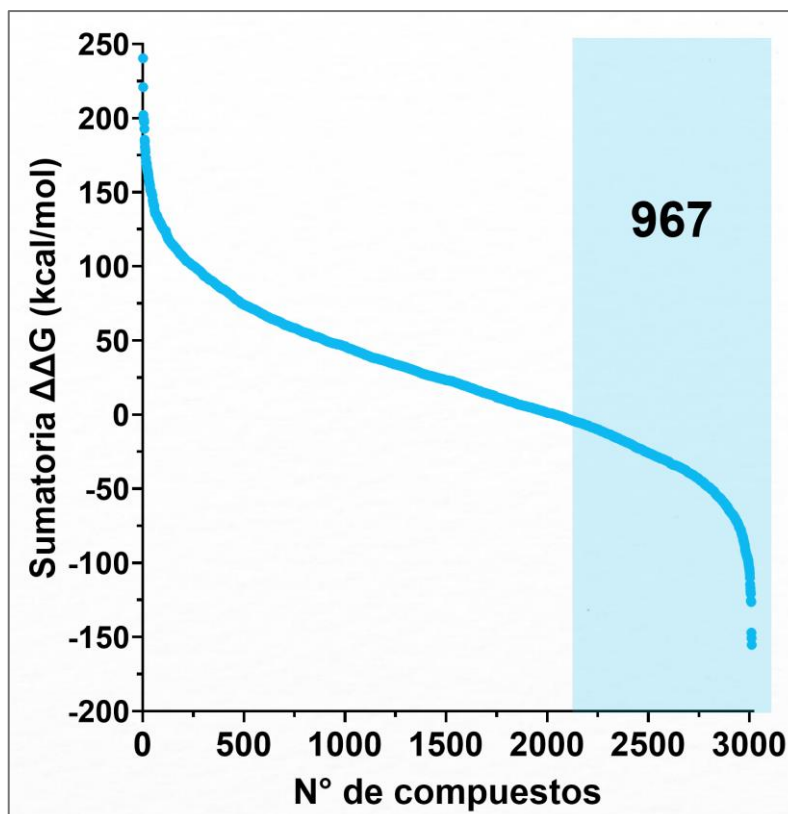


Figura 18: Distribución de Energías de Unión $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$: Selección de Moléculas con energías más favorables. En el rectángulo celeste se destacan las moléculas con valores negativos de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$, correspondientes a las energías de unión más favorables.

Posteriormente a la evaluación de quiralidad y la selección de moléculas no quirales y disponibles comercialmente, se llevó a cabo el agrupamiento de las 57 moléculas previamente identificadas. Utilizando el software

KNIME, se generaron 13 clústeres aplicando Morgan fingerprint y el coeficiente de Tanimoto con un umbral de similitud del 80%. Este enfoque permitió obtener una representación estructural diversa entre los clústeres, asegurando que cada grupo reflejara una composición sólida y consistente, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13: Total de 13 clústeres generados con las 57 moléculas analizadas.

N° Clúster	Población
1	25
2	11
3	4
4	1
5	2
6	2
7	1
8	1
9	3
10	4
11	1
12	1
13	1

Este método permitió identificar 13 clústeres seleccionando moléculas de cada uno para asegurar la diversidad estructural, priorizando aquellas con

mejores $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$. Estas moléculas fueron elegidas por su capacidad para interactuar con dos o más blancos, basándose en los valores de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$. En total, se seleccionaron 21 compuestos prometedores, que fueron comprados para su posterior evaluación experimental. La Figura 19 muestra las 21 moléculas seleccionadas, organizadas según los clústeres significativos a los que pertenecen. Cada clúster contiene moléculas representadas con su estructura, junto con su identificador. Además, se proporciona el valor de la sumatoria de energía de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ (en kcal/mol), que respalda la selección de estas moléculas como candidatas *multitarget*.

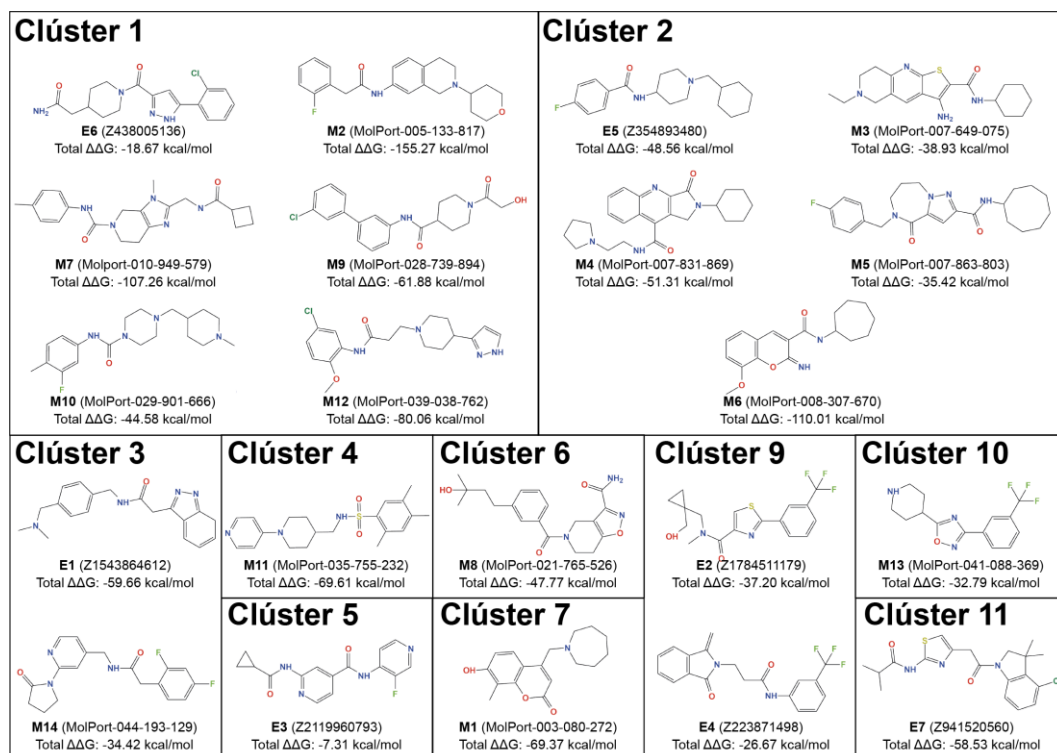


Figura 19: Moléculas seleccionadas organizadas por clústeres significativos. Cada molécula se presenta con su estructura, identificador y

nombre comercial entre paréntesis, además de la sumatoria de la energía de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ (kcal/mol).

En la Figura 20 se presenta el embudo de cribado virtual que describe el proceso completo, indicando los filtros aplicados en cada etapa del análisis, hasta la selección final de los 21 compuestos candidatos *multitarget*.

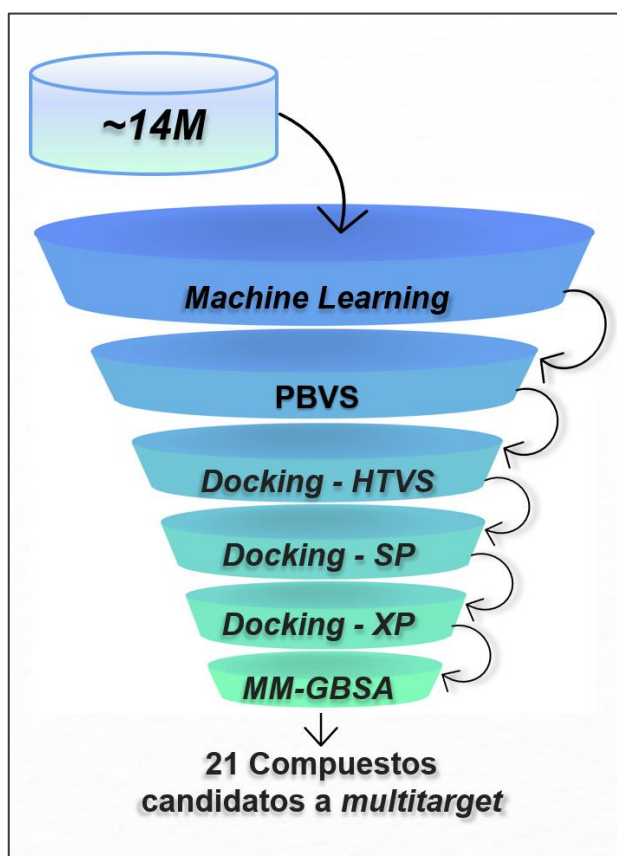


Figura 20: En el embudo se observa que ya se ha aplicado toda la metodología de virtual screening hasta encontrar los 21 compuestos candidatos.

OE5. Evaluar la capacidad antioxidante de los mejores 21 compuestos seleccionados, así como su actividad frente a AChE.

A5.1. Estudio cinético de Interacción de moléculas con AChE

Debido a limitaciones de tiempo y alcance, se evaluó únicamente la actividad biológica de los compuestos seleccionados en A4.3 frente a las enzimas AChE y BuChE (Butirilcolinesterasa). La inclusión de BuChE en el estudio se justificó por su relevancia en las etapas avanzadas de la enfermedad, donde esta enzima juega un papel importante en la degradación de ACh, volviéndose más activa y contribuyendo al deterioro cognitivo. Dado que la BuChE se asocia a la progresión de la enfermedad en fases más avanzadas (Nordberg et al., 2013), su evaluación resulta fundamental para comprender la posible eficacia de los compuestos. La actividad de los 21 compuestos frente a los otros cinco *target* será evaluada por otros miembros del grupo de investigación del Dr. David Ramírez.

Para la evaluación de la actividad de AChE y BuChE, se adaptó un ensayo basado en el protocolo de la Dra. Margarita Gutiérrez de la Universidad de Talca, el cual fue realizado en su laboratorio bajo su supervisión. Se utilizó el método espectrofotométrico de Ellman, que mide la liberación de iones tiol cuando la enzima actúa sobre el sustrato, el cual reacciona con el

reactivo DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)) para producir un producto amarillo. La absorbancia de este producto se midió a 405 nm. Las soluciones de los compuestos se prepararon en DMSO (dimetilsulfóxido) y buffer de fosfato (8 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, y Tween 20 al 0.05% a pH 7.6). Como compuesto control se utilizó galantamina, y la concentración fue proporcionada por la Dra. Margarita Gutiérrez, ya que el ensayo de control se realiza dos veces al año.

Dado que los compuestos adquiridos presentaban concentraciones variables, se prepararon diluciones específicas para cada uno de los 21 compuestos. En cada placa de 96 pocillos, se evaluaron dos compuestos por placa, con 10 diluciones por compuesto. Los pocillos A, B, C, D correspondieron a la primera molécula, y los pocillos E, F, G, H a la segunda. Las concentraciones de los compuestos en los pocillos se detallan en el Anexo 5. En la Figura 21 se muestra como referencia la placa con los resultados de colorimetría correspondientes a los compuestos M3 y M4 evaluados frente a AChE. En el caso de M3, se observa cómo los pocillos de las columnas A, B y C cambian gradualmente de un color translúcido a un amarillo claro conforme disminuyen las concentraciones de 1 a 10, indicando inhibición de AChE a través del cambio de color. Por otro lado, en M4, el color amarillo se mantiene relativamente uniforme en los pocillos, lo que sugiere poca o nula actividad inhibitoria. Las columnas 11 y 12 se emplean como controles de carga: la columna 11 contiene buffer

fosfato, enzima (según corresponda, AChE o BuChE) y sustrato, mientras que la columna 12 incluye únicamente buffer y sustrato. Adicionalmente, los pocillos D y H también actúan como controles, conteniendo enzima y buffer. Finalmente, estos resultados se procesan mediante espectrofotometría a 405 nm para obtener las lecturas cuantitativas de las placas.

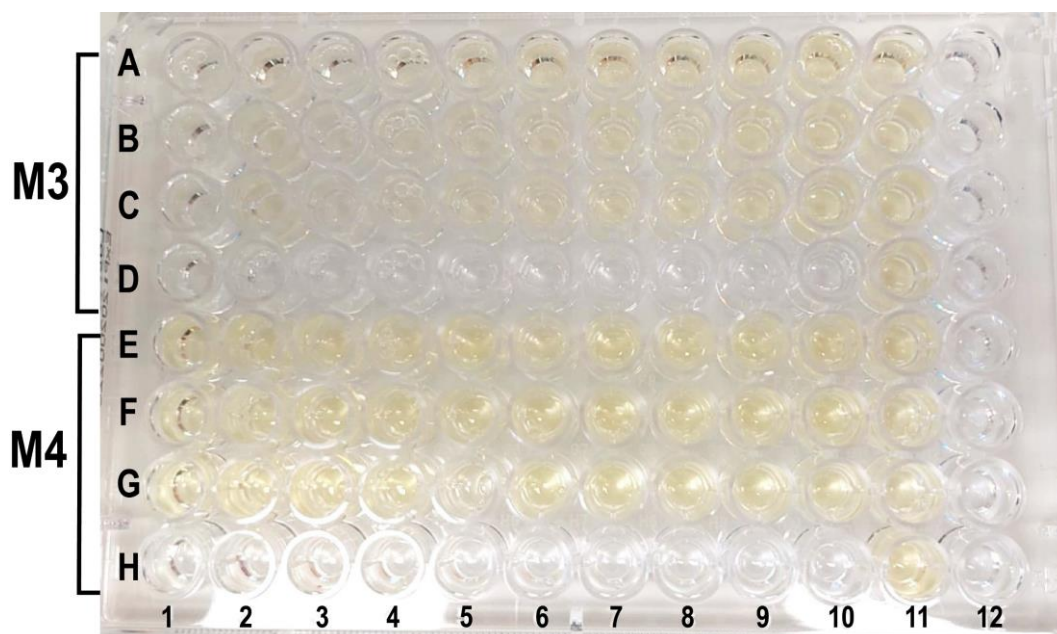


Figura 21: Resultados del ensayo de Ellman para los compuestos M3 y M4 frente a AChE. Se muestra una placa de 96 pocillos, donde las columnas A, B, C y D corresponden a las diluciones del compuesto M3, mientras que las columnas E, F, G y H corresponden a las diluciones del compuesto M4.

Los ensayos se realizaron por triplicado considerando las concentraciones específicas de los 21 compuestos seleccionados. Cada compuesto fue

evaluado en una placa de 96 pocillos con diluciones decrecientes, comenzando desde su concentración máxima inicial, la cual varió entre los compuestos. En el caso de las moléculas M9, M11, M12, M13 y E1 la concentración máxima en el pocillo 1 no supero los 30 μM , y todas mostraron menos del 50% de inhibición en su concentración más alta, por lo que fueron clasificadas como no activas (N.A). De manera similar M7 y M10, cuya concentración máxima en el pocillo 1 no superaba los 70 μM , también fueron excluidas al no superar el umbral de actividad. El resto de los compuestos, donde la concentración máxima en el pocillo 1 era superior a 100 μM , fueron evaluados con las concentraciones correspondientes. Los resultados detallados para cada compuesto y sus respectivas concentraciones se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14: Resultados de IC_{50} en el ensayo de inhibición de AChE y BuChE

Código interno	Código Molécula	AChE IC_{50} (μM)	BuChE IC_{50} (μM)
M1	MolPort-003-080-272	46.68 \pm 0.03	58.88 \pm 0.06
M2	MolPort-005-133-817	22.83 \pm 0.04	29.81 \pm 0.07
M3	MolPort-007-649-075	6.67 \pm 0.03	66.65 \pm 0.03
M4	MolPort-007-831-869	>100	16.88 \pm 0.08
M5	MolPort-007-863-803	>100	>100
M6	MolPort-008-307-670	78.94 \pm 0.02	>100
M7	MolPort-010-949-579	N.A	N.A
M8	MolPort-021-765-526	>100	>100
M9	MolPort-028-739-894	N.A	N.A
M10	MolPort-029-901-666	N.A	N.A
M11	MolPort-035-755-232	N.A	N.A
M12	MolPort-039-038-762	N.A	N.A
M13	MolPort-041-088-369	N.A	N.A
M14	MolPort-044-193-129	88.2 \pm 0.04	>100
E1	Z1543864612	N.A	N.A

E2	Z1784511179	>100	65.28±0.07
E3	Z2119960793	8.84±0.04	>100
E4	Z223871498	>100	>100
E5	Z354893480	>100	>100
E6	Z438005136	>100	>100
E7	Z941520560	>100	>100
Galantamina		0.48 ± 0.01	7.03 ± 0.02

Entre los compuestos evaluados, M3 y E3 (marcados en celeste en la Tabla 14) demostraron una excelente actividad biológica en AChE, con valores de IC₅₀ de 6.67 $\mu\text{M} \pm 0.03$ y 8.84 $\mu\text{M} \pm 0.04$, respectivamente, destacando su potencial como inhibidores enzimáticos (Figura 22A). En la Figura 22B se observa la curva de doble recíproco, que indica que estos compuestos se caracterizan por ser inhibidores no competitivos. En la Figura 23 se muestran las gráficas de concentración-respuesta en AChE para los compuestos M1, M2, M6 y M14, los cuales presentan un IC₅₀ menor a 100 μM . La galantamina se utilizó como control positivo, con un valor de 0.48 \pm 0.01 μM . Los valores de IC₅₀ se calcularon mediante análisis de regresión.

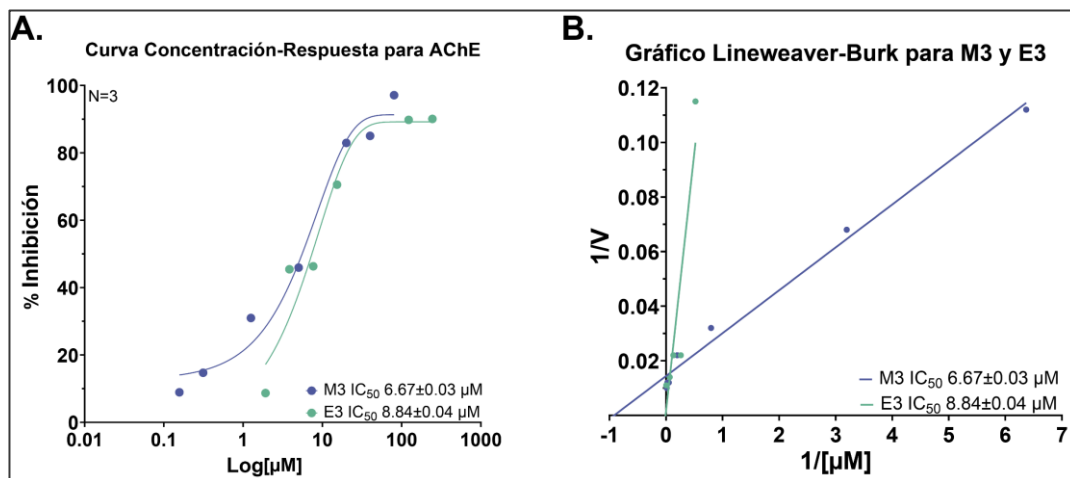


Figura 22: Curvas concentración-respuesta y de Lineweaver-Burk para AChE en presencia de los compuestos M3 ($\text{IC}_{50} = 6.67 \pm 0.03 \mu\text{M}$) y E3 ($\text{IC}_{50} = 8.84 \pm 0.04 \mu\text{M}$). (A) La curva concentración-respuesta muestra el perfil de inhibición de AChE con concentraciones crecientes de M3 y E3. (B) El gráfico de Lineweaver-Burk ilustra el recíproco de la velocidad ($1/V$) frente al recíproco de la concentración del sustrato ($1/[S]$), revelando un patrón de inhibición no competitiva para ambos compuestos. Las muestras fueron evaluadas por triplicado.

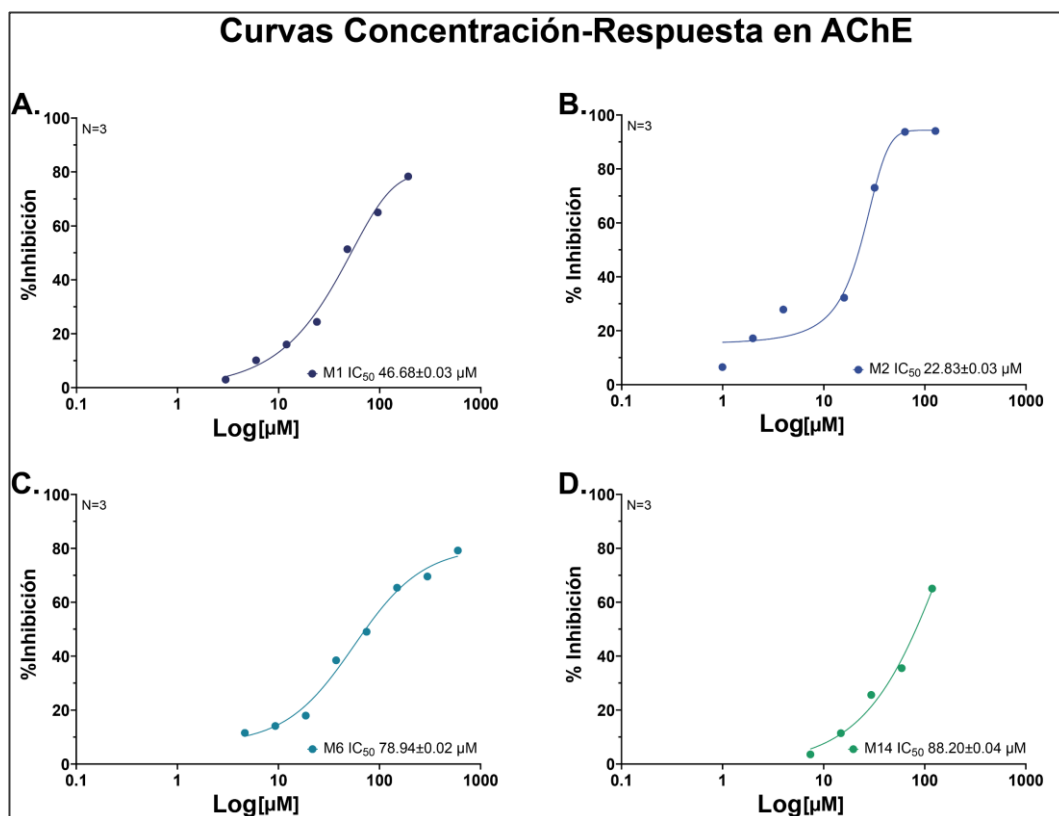


Figura 23: Gráficas de concentración-respuesta en AChE para los compuestos M1, M2, M6 y M14, con IC_{50} menor a $100 \mu M$, las muestras fueron evaluadas por triplicado.

A5.2. Evaluación del estrés oxidativo

La capacidad antioxidante de los 21 compuestos se evaluó mediante los métodos colorimétricos $DPPH^{+}$ y $ABTS^{+}$, siguiendo el protocolo establecido por la Dra. Margarita Gutiérrez. En ambos ensayos, se trabajó con tres niveles de concentraciones para cada compuesto. La concentración más alta se consideró al $100 \mu g/mL$ mientras la segunda correspondió a la mitad de esta concentración, y la tercera fue una dilución

al 20%, en relación con la concentración más alta, es decir, 20 µg/mL. Como control se utilizó ácido ascórbico, y los datos de concentración fueron proporcionados por la Dra. Margarita Gutiérrez.

Al trabajar con estas concentraciones, se buscó evaluar cómo las diferentes dosis de los compuestos influyen su capacidad antioxidante. Este enfoque permitió observar una relación entre la concentración y la actividad de captura de radicales libres, lo que proporciona una mejor comprensión del potencial de cada compuesto en la neutralización de especies reactivas de oxígeno.

El estrés oxidativo juega un papel central en el deterioro celular asociado con varias enfermedades neurodegenerativas. En estos trastornos, el desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes lleva a una acumulación de daño molecular, afectando estructuras celulares críticas como las membranas lipídicas, proteínas y el ADN. Este daño se manifiesta en una disfunción celular progresiva que contribuye a la pérdida de funciones cerebrales. Evaluar la capacidad antioxidante de compuestos a través de ensayos de captura de radicales libres, como los realizados con DPPH y ABTS, permite medir su potencial para mitigar este daño y restaurar el equilibrio redox (T. Liu et al., 2023; Sbodio et al., 2019).

En el ensayo DPPH^{•+}, las soluciones de los compuestos se mezclaron con DPPH en metanol y se incubaron durante 10 minutos en oscuridad, debido a que es fotosensible. La absorbancia de este producto se midió a 517 nm. El DPPH^{•+} presenta una coloración inicial morada, que cambia a amarillo pastel cuando un compuesto evaluado es capaz de capturar los radicales libres. Los porcentajes de atrapamiento no superaron el 14%, siendo M14 el compuesto con el mayor porcentaje. En el caso del control (ácido ascórbico), indican que tanto a 100 µg/mL como a 50 µg/mL se alcanzó un atrapamiento del 100%. Sin embargo, a concentraciones menores, como al 10 µg/mL y al 5 µg/mL, los atrapamientos disminuyeron a 87% y 68%, respectivamente. Esto evidencia la alta capacidad antioxidante del control incluso a concentraciones significativamente reducidas. Los resultados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15: Porcentajes de atrapamiento de radicales libres en el ensayo DPPH^{•+}.

		Concentraciones (µg/mL)		
% Atrapamiento	Molécula	20	50	100
	M1	2.041	4.396	2.826
	M2	1.503	0.876	10.931
	M3	0.976	1.813	1.534
	M4	5.808	4.082	4.553
	M5	2.512	5.024	4.553
	M6	-4.874	-5.170	-3.840
	M7	-5.761	-6.204	-6.056
	M8	-3.250	-3.988	2.216

M9	4.037	2.202	2.385
M10	3.853	3.119	2.752
M11	0.550	-1.468	2.018
M12	0.367	-1.284	-1.651
M13	2.371	2.092	1.674
M14	4.045	1.813	14.226
E1	1.468	-1.101	-4.037
E2	2.826	2.198	5.024
E3	3.768	2.983	2.983
E4	2.232	0.976	2.232
E5	0.785	1.884	3.140
E6	3.905	2.929	4.881
E7	3.905	2.092	4.324
Ácido ascórbico	-	100	100

En el ensayo ABTS^{•+}, las soluciones de los compuestos se mezclaron con ABTS y etanol:agua, incubándose durante 30 minutos bajo las mismas condiciones. La absorbancia de este producto se midió a 732 nm. La solución inicial de ABTS^{•+} es calipso y cambia a amarillo pastel cuando un compuesto evaluado es capaz de capturar los radicales libres. Los compuestos evaluados mostraron diferencias notables en su capacidad para atrapar radicales libres. En el ensayo ABTS^{•+}, M3 alcanzó un porcentaje de atrapamiento de hasta el 76% a 100 µg/mL, lo que indica una notable capacidad antioxidante. Este valor fue significativamente superior al de la mayoría de los otros compuestos evaluados, cuyos porcentajes de atrapamiento fueron generalmente inferiores al 30%. La Figura 24 ilustra el cambio de coloración de M3 en las tres concentraciones utilizadas,

destacando el cambio de calipso hacia el amarillo pastel, lo que confirma la capacidad de M3 para capturar radicales libres.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para el control (ácido ascórbico), se observa que, aunque el control mostró un buen desempeño, alcanzando un atrapamiento del 42% a 10 µg/mL, 65% a 50 µg/mL y 83% a 100 µg/mL, M3 a 100 µg/mL alcanzó un porcentaje de atrapamiento cercano al valor más alto del control (83%). Estos datos sugieren que M3 tiene un potencial antioxidante considerable y podría rivalizar con el ácido ascórbico en términos de capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno. Los porcentajes de atrapamiento para todos los compuestos evaluados se detallan en la Tabla 16, lo que permite observar de manera más precisa el rendimiento comparativo de M3 frente a los demás compuestos.

Tabla 16: Porcentajes de atrapamiento de radicales libres en el ensayo ABTS^{•+}.

	Concentraciones (µg/mL)			
	molécula	20	50	100
% Atrapamiento	M1	16.933	24.760	34.505
	M2	1.911	0.159	1.274
	M3	16.063	51.181	76.063
	M4	2.236	1.438	12.939
	M5	4.952	-2.236	-0.799

M6	8.280	16.401	26.274
M7	-2.866	0.637	0.000
M8	2.707	2.229	1.433
M9	2.866	0.955	6.369
M10	3.503	2.548	-1.752
M11	3.175	2.381	10.794
M12	2.063	18.095	9.365
M13	5.984	3.937	5.669
M14	2.677	-0.315	3.937
E1	-0.317	4.603	13.175
E2	0.958	6.869	-3.674
E3	0.639	0.799	-1.597
E4	1.417	4.409	5.197
E5	1.438	-0.799	0.000
E6	2.677	-0.315	1.890
E7	8.031	4.409	19.843
Ácido ascórbico	-	65	83

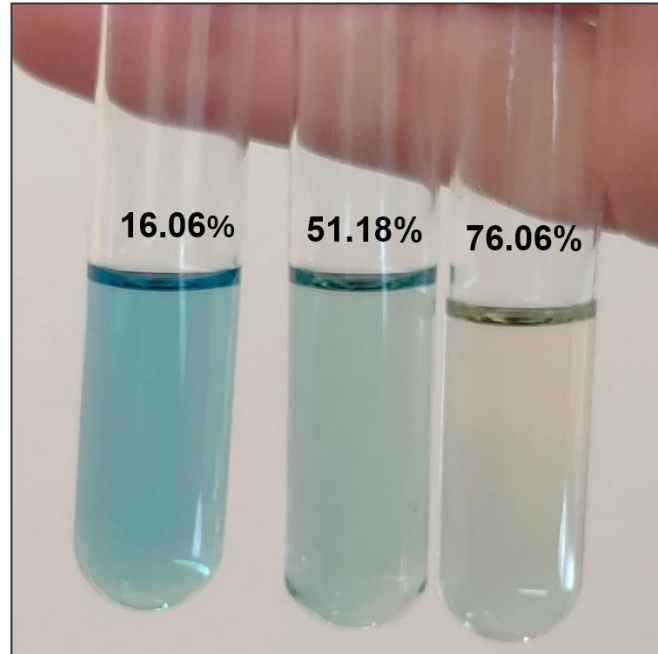


Figura 24: Cambio de coloración de M3 durante el ensayo ABTS^{•+} en tres concentraciones diferentes: 20 $\mu\text{g/mL}$ (16%), 50 $\mu\text{g/mL}$ (51.18%) y 100 $\mu\text{g/mL}$ (76.06%), mostrando un aumento en el atrapamiento de radicales libres.

DISCUSIÓN

La creación de nuestra base de datos y el uso del índice QED han demostrado ser estrategias efectivas para expandir el espacio químico disponible para el VS de compuestos potenciales para EA. A diferencia de la tradicional regla de Lipinski, que establece criterios generales para la viabilidad de los fármacos, el QED ha permitido una selección más precisa de compuestos con mejores propiedades farmacológicas (Bickerton et al., 2012b). Aunque Lipinski es útil como una guía inicial, el uso de QED ofrece una ventaja al priorizar compuestos con mayor potencial terapéutico, lo que es crucial en la identificación de moléculas que puedan abordar de manera más efectiva los mecanismos de la EA. El *pipeline* que empleamos para la creación de farmacóforos, que se basa en un flujo de trabajo estructurado con el uso de compuestos activos seleccionados de ChEMBL y la agrupación por similitud estructural, asegura que los modelos de farmacóforos sean representativos y de alta calidad (Chitre et al., 2024; Parvez et al., 2024). Este enfoque metodológico ha demostrado ser robusto en la generación de modelos precisos, que permiten una predicción más eficiente de interacciones moleculares clave, como se evidencia en el trabajo previo sobre *docking* molecular y cálculos de energía libre de unión (Bathula et al., 2020; Jaiteh et al., 2018). Además, esta *pipeline* está disponible en el repositorio público de GitHub del grupo del Dr. David Ramírez [Crear farmacoforo](#) (Valenzuela-Hormazabal, 2022), lo que

permite que cualquier persona pueda acceder a ella y adaptarla para su propio trabajo.

En la investigación, se implementó un protocolo de VS que integra cribado virtual usando modelos de Machine Learning (ML), seguido de cribado virtual basado en farmacóforos, *docking* molecular y cálculos de energía libre de unión, para así identificar compuestos *multitarget* con potencial terapéutico en la EA. Este enfoque permitió reducir significativamente el espacio químico y los costos computacionales, identificando 21 compuestos con potencial *multitarget* mediante la metodología de VS, que fueron validados experimentalmente en esta tesis únicamente contra 2 targets (AChE y BuChE). El uso del modelo ML-XGBoost permitió clasificar con alta precisión una amplia biblioteca de moléculas dirigidas a múltiples blancos moleculares clave en la EA. Este modelo, también utilizado en la plataforma AlzyFinder, facilitó la identificación eficiente de compuestos con alta probabilidad de actividad (Valero-Rojas et al., 2024). La plataforma está disponible en <http://www.alzyfinder-platform.udec.cl/> y fue desarrollada en el grupo de trabajo del Dr. David Ramírez como proyecto paralelo al presente trabajo de Magíster.

La combinación de *docking* molecular con cálculos de energía libre MM-GBSA permitió refinar los resultados y priorizar moléculas basadas en su afinidad por los blancos moleculares. El uso de tres algoritmos de *docking*

(HTVS, SP y XP) en secuencia permitió un tamizado efectivo, reduciendo el número de compuestos, enfocándose en los más prometedores y reduciendo costos computacionales en cada etapa. Este protocolo de cribado *in silico* ha sido validado por otros estudios. Por ejemplo, en el trabajo de (Mirza et al., 2022), se utilizó un enfoque similar para identificar compuestos *multitarget* para la EA, empleando *docking* molecular y simulaciones de dinámica molecular, obteniendo compuestos con alta afinidad por AChE y BACE-1, así como propiedades farmacocinéticas favorables. Otro estudio en cáncer también ha demostrado la efectividad de este tipo de metodologías. Así se observa en un trabajo publicado en 2024, que utilizó un enfoque similar para evaluar compuestos *multitarget* que inhiben AXL y HDAC2, empleando metodologías combinadas de VS, como farmacóforos y *docking* molecular para identificar los hits. Posteriormente, se realizaron ensayos de inhibición, obteniendo valores de 0.35 μM y 0.50 μM , respectivamente, complementados con simulaciones de dinámica molecular y, finalmente, ensayos *in vivo* (Qiao et al., 2024). Estos resultados refuerzan la eficacia de nuestra metodología y la relevancia de usar métodos computacionales en conjunto con validación experimental para la búsqueda de compuestos *multitarget* frente a enfermedades complejas como la EA.

La validación experimental de los 21 compuestos permitió identificar a M3 y E3, dos compuestos con actividad como inhibidores de la AChE, y con

capacidad antioxidante. M3, en particular, presentó un alto grado de atrapamiento de radicales libres, sugiriendo su potencial para proteger neuronas en la EA.

Como proyecciones futuras, el primer objetivo es completar los ensayos en todos los blancos moleculares de estudio, seguido de la evaluación de neurotoxicidad para garantizar la seguridad de los compuestos seleccionados. Posteriormente, se llevará a cabo la optimización química de las moléculas más prometedoras, como es hasta ahora M3 y E3, con el fin de mejorar sus propiedades farmacológicas y eficacia terapéutica. Finalmente, se repetirán los estudios de *docking* molecular, cálculos de energía libre de unión MM-GBSA y ensayos biológicos con los compuestos optimizados, lo que permitirá asegurar la robustez y viabilidad de los compuestos optimizados como candidatos para el tratamiento de la EA.

CONCLUSIONES

Este trabajo ha avanzado de manera significativa en la identificación de compuestos bioactivos potenciales para la EA, a través de un enfoque integrado que combina la exploración del espacio químico, herramientas computacionales avanzadas y la generación de modelos de farmacóforos.

A partir de una base de datos de 65 millones de compuestos, se aplicaron filtros sistemáticos, como el índice de calidad QED, para garantizar la selección de compuestos con alta probabilidad de éxito terapéutico, reduciendo considerablemente el espacio químico a considerar y enfocando los esfuerzos en compuestos con mayor potencial farmacológico.

La librería de moléculas se construyó integrando bases de datos comerciales y gratuitas, y los modelos de farmacóforos se desarrollaron para *targets* clave en la EA, utilizando datos de la base de datos ChEMBL y las directrices de la IDG. Estos modelos proporcionaron hipótesis clave sobre las características estructurales necesarias para interactuar con proteínas críticas, como las involucradas en la agregación de tau y β -amiloide. El uso de técnicas avanzadas de agrupamiento estructural mediante fingerprints de Morgan y la evaluación de la similitud estructural facilitó la identificación de compuestos con perfiles biológicos compartidos,

lo que reforzó la utilidad de los farmacóforos para diseñar nuevas moléculas con actividad terapéutica.

La utilización de herramientas como Knime y RDKit para la estandarización de datos, y LigPrep para la preparación tridimensional de estructuras, permitió una caracterización precisa de las moléculas, acelerando el proceso de selección y optimización. Además, la identificación de compuestos prometedores mediante la generación de farmacóforos ha sido crucial para el desarrollo de terapias más efectivas contra la EA.

La predicción de la actividad biológica de los compuestos a través de modelos de ML redujo aún más el espacio químico, priorizando las moléculas con mayor potencial terapéutico. Posteriormente, se aplicó un enfoque de LBVS dentro de una estrategia de *Pharmacophore-Based Virtual Screening*, lo que facilitó la identificación de moléculas con características estructurales similares a los ligandos de referencia. Esta integración de técnicas optimizó la selección de compuestos, reduciendo los falsos positivos y mejorando la precisión en la predicción de actividad biológica.

Las pruebas experimentales con 21 compuestos seleccionados revelaron que 6 mostraron actividad biológica, con una IC_{50} inferior a 100 μ M, y 2

compuestos M3 y E3, destacaron con una IC_{50} inferior a 10 μ M. M3, además de su prometedora actividad biológica, mostró un alto porcentaje de atrapamiento de radicales libres, lo que lo convierte en un candidato destacado para el tratamiento de la EA, debido a sus propiedades antioxidantes.

En resumen, este estudio demuestra la efectividad de un enfoque integrado, que combina filtrado sistemático, generación de farmacóforos, modelos predictivos basados en ML y *docking* molecular, para identificar compuestos bioactivos con alto potencial terapéutico para la EA. Los resultados experimentales validaron la efectividad de este enfoque, destacando a M3 como un compuesto clave con actividad biológica y propiedades antioxidantes, lo que abre nuevas oportunidades para el desarrollo de terapias más efectivas para la EA.

GLOSARIO

- **2D:** Bidimensionales
- **3D:** Tridimensionales
- **A β :** Beta amiloides
- **ACh:** Acetilcolina
- **AChE:** Acetilcolinesterasa
- **AChEI:** Inhibidores de acetilcolinesterasa
- **APP:** Proteína precursora amiloides
- **BACE-1:** Beta secretasa 1
- **BuChE:** Butirilcolinesterasa
- **CB2:** Receptor cannabinoides tipo 2
- **EA:** Enfermedad de Alzheimer
- **FDA:** Food and Drug Administration
- **GSK-3 β :** Glicógeno sintasa 3 beta
- **HTVS:** High Throughput Virtual Screening
- **IA β :** Inhibidores de beta amiloides
- **IDG:** Illuminating the druggable genome
- **LBVS:** Cribado virtual basado en ligando
- **MAO-A:** Monoaminooxidasa A

- **MTDLs:** Ligandos dirigidos *multitarget*
- **NTF:** Ovillos neurofibrilares
- **PBVS:** Cribado virtual basado en farmacóforo
- **QED:** Quantitative Estimate Druglikeness
- **Rn- α 7:** Receptor nicotínico alfa 7
- **SBVS:** Cribado virtual basado en estructura
- **SDF:** Structure data file
- **SMI:** Simplified molecular input
- **SMILES:** Simplified molecular input line entry system
- **SP:** Placas seniles
- **SP:** Precisión estándar
- **TSSs:** Total shape screen score
- **VS:** Virtual Screening o cribado virtual
- **XP:** Extra Precisión

REFERENCIAS

- Agnello, L., & Ciaccio, M. (2022). Neurodegenerative Diseases: From Molecular Basis to Therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232112854>
- Albertini, C., Salerno, A., de Sena Murteira Pinheiro, P., & Bolognesi, M. L. (2021). From combinations to multitarget-directed ligands: A continuum in Alzheimer's disease polypharmacology. *Medicinal Research Reviews*, 41(5), 2606–2633. <https://doi.org/10.1002/MED.21699>
- Amaral, B., Capacci, A., Anderson, T., Tezer, C., Bajrami, B., Lulla, M., Lucas, B., Chodaparambil, J. V., Marcotte, D., Kumar, P. R., Murugan, P., Spilker, K., Cullivan, M., Wang, T., Peterson, A. C., Enyedy, I., Ma, B., Chen, T. Y., Yousaf, Z., ... Koirala, S. (2023). Elucidation of the GSK3 α Structure Informs the Design of Novel, Paralog-Selective Inhibitors. *ACS Chemical Neuroscience*, 14(6), 1080–1094. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.2C00476/ASSET/IMAGES/LARGE/CN2C00476_0008.JPEG
- Andrade, C. H., Pasqualoto, K. F. M., Ferreira, E. I., & Hopfinger, A. J. (2010). 4D-QSAR: Perspectives in drug design. In *Molecules* (Vol. 15, Issue 5, pp. 3281–3294). <https://doi.org/10.3390/molecules15053281>
- Anighoro, A., Bajorath, J., & Rastelli, G. (2014). Polypharmacology: Challenges and opportunities in drug discovery. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 57, Issue 19, pp. 7874–7887). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jm5006463>
- Arrué, L., Cigna-Méndez, A., Barbosa, T., Borrego-Muñoz, P., Struve-Villalobos, S., Oviedo, V., Martínez-García, C., Sepúlveda-Lara, A., Millán, N., Márquez Montesinos, J. C. E., Muñoz, J., Santana, P. A., Peña-Varas, C., Barreto, G. E., González, J., & Ramírez, D. (2022). New Drug Design Avenues Targeting Alzheimer's Disease by Pharmacoinformatics-Aided Tools. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091914>
- Bathula, R., Lanka, G., Muddagoni, N., Dasari, M., Nakkala, S., Bhargavi, M., Somadi, G., Sivan, S. K., & Rajender Potlapally, S. (2020). Identification of potential Aurora kinase-C protein inhibitors: an amalgamation of energy minimization, virtual screening, prime MMGBSA and AutoDock. *Journal of Biomolecular Structure and*

- Batool, M., Ahmad, B., & Choi, S. (2019). A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2783. <https://doi.org/10.3390/IJMS20112783>
- Behl, T., Kaur, D., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Zengin, G., Andronie-Cioara, F. L., Toma, M. M., Bungau, S., & Bumbu, A. G. (2021). Role of monoamine oxidase activity in alzheimer's disease: An insight into the therapeutic potential of inhibitors. *Molecules*, 26(12). <https://doi.org/10.3390/molecules26123724>
- Bickerton, G. R., Paolini, G. V., Besnard, J., Muresan, S., & Hopkins, A. L. (2012a). Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nature Chemistry*, 4(2), 90–98. <https://doi.org/10.1038/nchem.1243>
- Bickerton, G. R., Paolini, G. V., Besnard, J., Muresan, S., & Hopkins, A. L. (2012b). Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nature Chemistry*, 4(2), 90–98. <https://doi.org/10.1038/nchem.1243>
- Birks, J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Issue 1). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005593>
- Birks, J. S., & Harvey, R. J. (2018). Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2018, Issue 6). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001190.pub3>
- Bloom, G. S. (2014). Amyloid- β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurology*, 71(4), 505–508. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5847>
- Bolognesi, M. L. (2013). *Polypharmacology in a single drug: multitarget drugs* (Vol. 20).
- Briggs, R., Kennelly, S. P., & O'Neill, D. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. In *Clinical Medicine* (Vol. 16).
- Camargo-Ayala, L., Polo-Cuadrado, E., Osorio, E., Soto-Delgado, J., Duarte, Y., Prent-Peñaloza, L., & Gutiérrez, M. (2022). Synthesis multicomponent based on o-tolyl-isocyanide; cholinesterase inhibitors and computational studies. *Journal of Molecular Structure*, 1264. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133307>

- Carpenter, K. A., & Huang, X. (2018). Machine Learning-based Virtual Screening and Its Applications to Alzheimer's Drug Discovery: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 24(28), 3347–3358. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180607124038>
- Chen, W. W., Zhang, X., & Huang, W. J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, 13(4), 3391–3396. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4948>
- Cheung, J., Gary, E. N., Shiomi, K., & Rosenberry, T. L. (2013). Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territremin B show peripheral site flexibility. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(11), 1091–1096. <https://doi.org/10.1021/ml400304w>
- Chitre, T., Bhatambrekar, A., Hirode, P., Thorat, S., Hajare, S. G., Garud, D., Jagdale, S., & Asgaonkar, K. (2024). A Combination of Pharmacophore Generation, Ligand-based Virtual Screening, Atom-based 3D-QSAR, and Molecular Docking Studies on Febuxostat-based Amides Analogues as Anti-inflammatory Agents. *Current Drug Discovery Technologies*, 21(1), e110324227883. <https://doi.org/10.2174/0115701638281229240226101906/CITE/REFWORKS>
- Ciulli, A. (2013). Biophysical screening for the discovery of small-molecule ligands. *Methods in Molecular Biology*, 1008, 357–388. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-398-5_13
- Cummings, J., Zhou, Y., Lee, G., Zhong, K., Fonseca, J., & Cheng, F. (2023). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2023. In *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* (Vol. 9, Issue 2). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/trc2.12385>
- Dixon, S. L., Smondyrev, A. M., Knoll, E. H., Rao, S. N., Shaw, D. E., & Friesner, R. A. (2006). PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 20(10–11), 647–671. <https://doi.org/10.1007/S10822-006-9087-6>
- Docking and scoring - Schrödinger*. (n.d.). Retrieved June 27, 2024, from <https://www.schrodinger.com/life-science/learn/white-papers/docking-and-scoring/>

- Doytchinova, I. (2022). Drug Design—Past, Present, Future. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 1496, 27(5), 1496. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27051496>
- Dror, O., Shulman-Peleg, A., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2004). Predicting Molecular Interactions in silico: I. A Guide to Pharmacophore Identification and its Applications to Drug Design. In *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 11).
- Folch, J., Ettcheto, M., Petrov, D., Abad, S., Pedrós, I., Marin, M., Olloquequi, J., & Camins, A. (2018). Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína β -amiloide. In *Neurología* (Vol. 33, Issue 1, pp. 35–46). Spanish Society of Neurology. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.03.012>
- Francis, P. T., Nordberg, A., & Arnold, S. E. (2005). A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: Do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease? In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 26, Issue 2, pp. 104–111). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.12.010>
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749. https://doi.org/10.1021/JM0306430/SUPPL_FILE/JM0306430_S.PDF
- Goyal, M., Dhanjal, J. K., Goyal, S., Tyagi, C., Hamid, R., & Grover, A. (2014). Development of Dual Inhibitors against Alzheimer's Disease Using Fragment-Based QSAR and Molecular Docking. *BioMed Research International*, 2014, 979606. <https://doi.org/10.1155/2014/979606>
- Guo, M., Zhu, F., Qiu, W., Qiao, G., Law, B. Y. K., Yu, L., Wu, J., Tang, Y., Yu, C., Qin, D., Zhou, X., & Wu, A. (2022). High-throughput screening for amyloid- β binding natural small-molecules based on the combinational use of biolayer interferometry and UHPLC–DAD-Q/TOF-MS/MS. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(4), 1723–1739. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.08.030>

- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). *The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics*. <https://www.science.org>
- Hernandez, F., Lucas, J. J., & Avila, J. (2013). GSK3 and tau: Two convergence points in Alzheimer's disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 33, Issue SUPPL. 1). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129025>
- Home - eMolecules. (n.d.). Retrieved April 23, 2024, from <https://www.emolecules.com/>
- Home - Enamine. (n.d.). Retrieved April 23, 2024, from <https://enamine.net/>
- Home - Molport. (n.d.). Retrieved April 23, 2024, from <https://www.molport.com/shop/index>
- Home - VITASMLAB. (n.d.). Retrieved April 23, 2024, from <https://vitasmlab.biz/>
- Hopkins, A. L. (2008). Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 4, Issue 11, pp. 682–690). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nchembio.118>
- Horvath, D. (2010). Pharmacophore-Based Virtual Screening. *Methods in Molecular Biology*, 672, 261–298. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-839-3_11
- Hughes, J. P., Rees, S. S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239–1249. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2010.01127.X>
- Ibrahim, M. M., & Gabr, M. T. (2019). Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer's disease. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 14, Issue 3, pp. 437–440). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.245463>
- Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S., & Coleman, R. G. (2012). ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(7), 1757–1768. https://doi.org/10.1021/CI3001277/SUPPL_FILE/CI3001277_SI_001.PDF
- Jabir, N. R., Rehman, M. T., Alsolami, K., Shakil, S., Zughaibi, T. A., Alserihi, R. F., Khan, M. S., AlAjmi, M. F., & Tabrez, S. (2021). Concatenation

of molecular docking and molecular simulation of BACE-1, γ -secretase targeted ligands: in pursuit of Alzheimer's treatment. *Annals of Medicine*, 53(1), 2332–2344. <https://doi.org/10.1080/07853890.2021.2009124>

Jaiteh, M., Zeifman, A., Saarinen, M., Svenningsson, P., Bréa, J., Loza, M. I., & Carlsson, J. (2018). Docking Screens for Dual Inhibitors of Disparate Drug Targets for Parkinson's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(12), 5269–5278. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00204>

Johnson, I. P. (2015). Age-related neurodegenerative disease research needs aging models. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 7, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00168>

Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., & Bryant, S. H. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202–D1213. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV951>

Kosik, K. S., Joachim, C. L., & Selkoe, D. J. (1986). Microtubule-associated protein tau (T) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease (cytoskeleton/neurofibrillary tangles/neuronal degeneration). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 83). <https://www.pnas.org>

Kovacs, G. G. (2019). Molecular pathology of neurodegenerative diseases: Principles and practice. In *Journal of Clinical Pathology* (Vol. 72, Issue 11, pp. 725–735). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205952>

Kritsilis, M., Rizou, S. V., Koutsoudaki, P. N., Evangelou, K., Gorgoulis, V. G., & Papadopoulos, D. (2018). Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19102937>

Kumar, A., Tiwari, A., & Sharma, A. (2018). Changing Paradigm from one Target one Ligand Towards Multi-target Directed Ligand Design for Key Drug Targets of Alzheimer Disease: An Important Role of In Silico Methods in Multi-target Directed Ligands Design. *Current Neuropharmacology*, 16(6), 726–739. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180315141643>

- Lavecchia, A., & Giovanni, C. Di. (2013). Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. *Current Medicinal Chemistry*, 20(23), 2839–2860. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990001>
- Li, X., Chang, H., Bouma, J., de Paus, L. V., Mukhopadhyay, P., Paloczi, J., Mustafa, M., van der Horst, C., Kumar, S. S., Wu, L., Yu, Y., van den Berg, R. J. B. H. N., Janssen, A. P. A., Lichtman, A., Liu, Z. J., Pacher, P., van der Stelt, M., Heitman, L. H., & Hua, T. (2023). Structural basis of selective cannabinoid CB2 receptor activation. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37112-9>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 46). www.elsevier.com/locate/drugdeliv
- Liu, H. R., Zhou, C., Fan, H. Q., Tang, J. J., Liu, L. B., Gao, X. H., Wang, Q. A., & Liu, W. K. (2015). Novel Potent and Selective Acetylcholinesterase Inhibitors as Potential Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease: Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Molecular Modeling of Amino-Alkyl-Substituted Fluoro-Chalcones Derivatives. *Chemical Biology and Drug Design*, 86(4), 517–522. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12514>
- Liu, T., Cao, L., Zhang, T., & Fu, H. (2023). Molecular docking studies, anti-Alzheimer's disease, antidiabetic, and anti-acute myeloid leukemia potentials of narcissoside. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 129(2), 405–415. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1828483>
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimäki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., ... Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet*, 396(10248), 413–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6)
- Llanos, E. J., Leal, W., Luu, D. H., Jost, J., Stadler, P. F., & Restrepo, G. (2019). Exploration of the chemical space and its three historical regimes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(26), 12660–12665.

https://doi.org/10.1073/PNAS.1816039116/SUPPL_FILE/PNAS.1816039116.SAPP.PDF

López-Pérez, K., Avellaneda-Tamayo, J. F., Chen, L., López-López, E., Juárez-Mercado, K. E., Medina-Franco, J. L., & Miranda-Quintana, R. A. (2024). Molecular similarity: Theory, applications, and perspectives. *Artificial Intelligence Chemistry*, 2(2), 100077. <https://doi.org/10.1016/J.AICHEM.2024.100077>

Lovrić, M., Molero, J. M., & Kern, R. (2019). PySpark and RDKit: Moving towards Big Data in Cheminformatics. *Molecular Informatics*, 38(6). <https://doi.org/10.1002/minf.201800082>

Lu, C., Wu, C., Ghoreishi, D., Chen, W., Wang, L., Damm, W., Ross, G. A., Dahlgren, M. K., Russell, E., Von Bargen, C. D., Abel, R., Friesner, R. A., & Harder, E. D. (2021). OPLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 17(7), 4291–4300. https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.1C00302/SUPPL_FILE/CT1C00302_SI_002.ZIP

Luis, J., & Franco, M. (n.d.). *métodos computacionales*.

Macalino, S. J. Y., Gosu, V., Hong, S., & Choi, S. (2015). Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research* 2015 38:9, 38(9), 1686–1701. <https://doi.org/10.1007/S12272-015-0640-5>

Magham, S. V., Thaggikuppe krishnamurthy, P., Shaji, N., Mani, L., & Balasubramanian, S. (2021). Cannabinoid receptor 2 selective agonists and Alzheimer's disease: An insight into the therapeutic potentials. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 99, Issue 11, pp. 2888–2905). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jnr.24933>

Maniam, S., & Maniam, S. (2024). Screening Techniques for Drug Discovery in Alzheimer's Disease. In *ACS Omega* (Vol. 9, Issue 6, pp. 6059–6073). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07046>

Marucci, G., Buccioni, M., Ben, D. D., Lambertucci, C., Volpini, R., & Amenta, F. (2021). Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. In *Neuropharmacology* (Vol. 190). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>

- McKinzie, D. L., Winneroski, L. L., Green, S. J., Hembre, E. J., Erickson, J. A., Willis, B. A., Monk, S. A., Aluise, C. D., Baker, T. K., Lopez, J. E., Hendle, J., Beck, J. P., Brier, R. A., Boggs, L. N., Borders, A. R., Cocke, P. J., Garcia-Losada, P., Lowe, S. L., Mathes, B. M., ... Mergott, D. J. (2021). Discovery and Early Clinical Development of LY3202626, a Low-Dose, CNS-Penetrant BACE Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(12), 8076–8100. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.1C00489/SUPPL_FILE/JM1C00489_SI_002.CSV
- McShane, R., Areosa Sastre, A., & Minakaran, N. (2006). Memantine for dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003154.pub5>
- Medina-Franco, J. L., Giulianotti, M. A., Welmaker, G. S., & Houghten, R. A. (2013). Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. In *Drug Discovery Today* (Vol. 18, Issues 9–10, pp. 495–501). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.01.008>
- Michino, M., Beautrait, A., Boyles, N. A., Nadupalli, A., Dementiev, A., Sun, S., Ginn, J., Baxt, L., Suto, R., Bryk, R., Jerome, S. V., Huggins, D. J., & Vendome, J. (2023). Shape-Based Virtual Screening of a Billion-Compound Library Identifies Mycobacterial Lipoamide Dehydrogenase Inhibitors. *ACS Bio and Med Chem Au*, 3(6), 507–515. https://doi.org/10.1021/ACSBIOEDCHEMAU.3C00046/ASSET/IMAGES/LARGE/BG3C00046_0007.JPEG
- Mirza, F. J., Zahid, S., Amber, S., Sumera, S., Jabeen, H., Asim, N., & Ali Shah, S. A. (2022). Multitargeted Molecular Docking and Dynamic Simulation Studies of Bioactive Compounds from *Rosmarinus officinalis* against Alzheimer's Disease. *Molecules*, 27(21), 7241. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27217241>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Murgueitio, M. S., Bermudez, M., Mortier, J., & Wolber, G. (2012). In silico virtual screening approaches for anti-viral drug discovery. In *Drug Discovery Today: Technologies* (Vol. 9, Issue 3). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.07.009>

- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., & M-Y Lee, V. (2006). *Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis*. www.sciencemag.org
- Nguyen, D. T., Mathias, S., Bologna, C., Brunak, S., Fernandez, N., Gaulton, A., Hersey, A., Holmes, J., Jensen, L. J., Karlsson, A., Liu, G., Ma'ayan, A., Mandava, G., Mani, S., Mehta, S., Overington, J., Patel, J., Rouillard, A. D., Schürer, S., ... Guha, R. (2017). Pharos: Collating protein information to shed light on the druggable genome. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D995–D1002. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1072>
- Nordberg, A., Ballard, C., Bullock, R., Darreh-Shori, T., & Somogyi, M. (2013). A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. *The Primary Care Companion for CNS Disorders*, *15*(2), PCC.12r01412. <https://doi.org/10.4088/PCC.12R01412>
- Nozal, V., García-Rubia, A., Cuevas, E. P., Pérez, C., Tosat-Bitrián, C., Bartolomé, F., Carro, E., Ramírez, D., Palomo, V., & Martínez, A. (2021). From Kinase Inhibitors to Multitarget Ligands as Powerful Drug Leads for Alzheimer's Disease using Protein-Templated Synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, *60*(35), 19344–19354. <https://doi.org/10.1002/anie.202106295>
- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, *3*(10). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Oddsson, S., Kowal, N. M., Ahring, P. K., Olafsdottir, E. S., & Balle, T. (2020). Structure-based discovery of dual-target hits for acetylcholinesterase and the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: In silico studies and in vitro confirmation. *Molecules*, *25*(12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122872>
- OMS-demencia*. (2023, March 15). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Panwar, U., Murali, A., Khan, M. A., Selvaraj, C., & Singh, S. K. (2024). Virtual Screening Process: A Guide in Modern Drug Designing.

Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2714, 21–31.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3441-7_2

- Park, S. M., Ki, S. H., Han, N. R., Cho, I. J., Ku, S. K., Kim, S. C., Zhao, R. J., & Kim, Y. W. (2015). Tacrine, an Oral Acetylcholinesterase Inhibitor, Induced Hepatic Oxidative Damage, Which Was Blocked by Liquiritigenin through GSK3-beta Inhibition. In *Biol. Pharm. Bull* (Vol. 38, Issue 2).
- Parvathy Dharshini, S. A., Sneha, N. P., Yesudhas, D., Kulandaisamy, A., Rangaswamy, U., Shanmugam, A., Taguchi, Y.-H., & Gromiha, M. M. (2022). Exploring Plausible Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease using Multi-omics Approach, Machine Learning and Docking. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 22(22), 1868–1879.
<https://doi.org/10.2174/1568026622666220902110115>
- Parvatikar, P. P., Patil, S., Khaparkhantikar, K., Patil, S., Singh, P. K., Sahana, R., Kulkarni, R. V., & Raghu, A. V. (2023). Artificial intelligence: Machine learning approach for screening large database and drug discovery. *Antiviral Research*, 220, 105740.
<https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2023.105740>
- Parvez, A., Lee, J. S., Alam, W., Tayara, H., & Chong, K. T. (2024). Integrated Computational Approaches for Drug Design Targeting Cruzipain. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3747.
<https://doi.org/10.3390/IJMS25073747/S1>
- Patel, L., Shukla, T., Huang, X., Ussery, D. W., & Wang, S. (2020). Machine Learning Methods in Drug Discovery. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25225277>
- Peřinová, R., Maafi, N., Korábečný, J., Kohelová, E., De Simone, A., Al Mamun, A., Hulcová, D., Marková, J., Kučera, T., Jun, D., Šafratová, M., Maříková, J., Andrisano, V., Jenčo, J., Kuneš, J., Martinez, A., Nováková, L., & Cahlíková, L. (2020). Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their in vitro and in silico biological activity connected to Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103928>
- Plan Nacional de Demencia*. (2017).
- Polo-Cuadrado, E., Rojas-Peña, C., Acosta-Quiroga, K., Camargo-Ayala, L., Brito, I., Cisterna, J., Moncada, F., Trilleras, J., Rodríguez-Núñez, Y. A., & Gutierrez, M. (2022). Design, synthesis, theoretical study, antioxidant, and anticholinesterase activities of new pyrazolo-fused

phenanthrolines. *RSC Advances*, 12(51), 33032–33048.
<https://doi.org/10.1039/d2ra05532e>

Pont, C., Ginex, T., Griñán-Ferré, C., Scheiner, M., Mattellone, A., Martínez, N., Arce, E. M., Soriano-Fernández, Y., Naldi, M., De Simone, A., Barenys, M., Gómez-Catalán, J., Pérez, B., Sabate, R., Andrisano, V., Loza, M. I., Brea, J., Bartolini, M., Bolognesi, M. L., ... Muñoz-Torrero, D. (2021). From virtual screening hits targeting a cryptic pocket in BACE-1 to a nontoxic brain permeable multitarget anti-Alzheimer lead with disease-modifying and cognition-enhancing effects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 225.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113779>

Pravin, N., & Jozwiak, K. (2022). Effects of Linkers and Substitutions on Multitarget Directed Ligands for Alzheimer's Diseases: Emerging Paradigms and Strategies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 11). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/ijms23116085>

Qiao, X., Wu, X., Chen, S., Niu, M. M., Hua, H., & Zhang, Y. (2024). Discovery of novel and potent dual-targeting AXL/HDAC2 inhibitors for colorectal cancer treatment via structure-based pharmacophore modelling, virtual screening, and molecular docking, molecular dynamics simulation studies, and biological evaluation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 39(1).
<https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2295241>

Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–344.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>

R y RStudio (código abierto, disponible gratuitamente) | Biblioteca del NIH. (n.d.). Retrieved December 25, 2024, from <https://www.nihlibrary.nih.gov/resources/tools/r-and-rstudio>

Ramsay, R. R., Popovic-Nikolic, M. R., Nikolic, K., Uliassi, E., & Bolognesi, M. L. (2018). A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clinical and Translational Medicine*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/s40169-017-0181-2>

Reymond, J. L. (2015). The Chemical Space Project. *Accounts of Chemical Research*, 48(3), 722–730. <https://doi.org/10.1021/ar500432k>

- Reymond, J. L., & Awale, M. (2012). Exploring Chemical Space for Drug Discovery Using the Chemical Universe Database. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(9), 649. <https://doi.org/10.1021/CN3000422>
- Rodríguez, Y. A., Gutiérrez, M., Ramírez, D., Alzate-Morales, J., Bernal, C. C., Güiza, F. M., & Romero Bohórquez, A. R. (2016). Novel N-allyl/propargyl tetrahydroquinolines: Synthesis via Three-component Cationic Imino Diels–Alder Reaction, Binding Prediction, and Evaluation as Cholinesterase Inhibitors. *Chemical Biology and Drug Design*, 498–510. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12773>
- Roughley, S. D. (2018). Five Years of the KNIME Vernalis Cheminformatics Community Contribution. *Current Medicinal Chemistry*, 27(38), 6495–6522. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180904113616>
- Ruiz de Martín Esteban, S., Benito-Cuesta, I., Terradillos, I., Martínez-Relimpio, A. M., Aranz, M. A., Ruiz-Pérez, G., Korn, C., Raposo, C., Sarott, R. C., Westphal, M. V., Elezgarai, I., Carreira, E. M., Hillard, C. J., Grether, U., Grandes, P., Grande, M. T., & Romero, J. (2022). Cannabinoid CB2 Receptors Modulate Microglia Function and Amyloid Dynamics in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.841766>
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., Medina-Franco, J. L., Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 28(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/J.EQ.2016.06.002>
- Sbodio, J. I., Snyder, S. H., & Paul, B. D. (2019). Redox Mechanisms in Neurodegeneration: From Disease Outcomes to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30(11), 1450. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7321>
- Schmöle, A. C., Lundt, R., Toporowski, G., Hansen, J. N., Beins, E., Halle, A., & Zimmer, A. (2018). Cannabinoid Receptor 2-Deficiency Ameliorates Disease Symptoms in a Mouse Model with Alzheimer's Disease-Like Pathology. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(2), 379–392. <https://doi.org/10.3233/JAD-180230>
- Schrodinger. (2015). *Schrödinger Press Glide User Manual Glide 6.7 User Manual Glide User Manual*.
- Seong, S. H., Kim, B. R., Cho, M. L., Kim, T. S., Im, S., Han, S., Jeong, J. W., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2022). Phytoestrogen Coumestrol

- Selectively Inhibits Monoamine Oxidase-A and Amyloid β Self-Aggregation. *Nutrients*, 14(18). <https://doi.org/10.3390/NU14183822>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Sharma, A., & Thelma, B. K. (2019). Pharmacophore modeling and virtual screening in search of novel Bruton's tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Molecular Modeling*, 25(7), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S00894-019-4047-Y/FIGURES/5>
- Sharma, K. R., Colvis, C. M., Rodgers, G. P., & Sheeley, D. M. (2024). Illuminating the druggable genome: Pathways to progress. *Drug Discovery Today*, 29(3), 103805. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2023.103805>
- Shoichet, B. K. (2004). Virtual screening of chemical libraries. In *Nature* (Vol. 432, Issue 7019, pp. 862–865). <https://doi.org/10.1038/nature03197>
- Singh, S., Goyal, A., & Agrawal, N. (2023). Molecular Docking and Dynamic Simulation to Identify $\alpha 7nAChR$ Binding Affinity of Flavonoids for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Chemistry & Biodiversity*, 20(7). <https://doi.org/10.1002/CBDV.202300306>
- Söderberg, L., Johannesson, M., Nygren, P., Laudon, H., Eriksson, F., Osswald, G., Möller, C., & Lannfelt, L. (2023). Lecanemab, Aducanumab, and Gantenerumab — Binding Profiles to Different Forms of Amyloid-Beta Might Explain Efficacy and Side Effects in Clinical Trials for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, 20(1), 195–206. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01308-6>
- Son, S. Y., Ma, J., Kondou, Y., Yoshimura, M., Yamashita, E., & Tsukihara, T. (2008). Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5739–5744. https://doi.org/10.1073/PNAS.0710626105/SUPPL_FILE/0710626105_SI.PDF
- Southey, M. W. Y., & Brunavs, M. (2023). Introduction to small molecule drug discovery and preclinical development. *Frontiers in Drug Discovery*, 3, 1314077. <https://doi.org/10.3389/FDDSV.2023.1314077>

- Stahura, F. L., & Bajorath, J. (2004). Virtual Screening Methods that Complement HTS. In *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* (Vol. 7).
- Stefan, S. M., & Rafehi, M. (2024). Medicinal polypharmacology: Exploration and exploitation of the polypharmacolome in modern drug development. *Drug Development Research*, 85(1), e22125. <https://doi.org/10.1002/DDR.22125>
- Talele, T. T., Khedkar, S. A., & Rigby, A. C. (2010). Successful Applications of Computer Aided Drug Discovery: Moving Drugs from Concept to the Clinic. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(1), 127–141. <https://doi.org/10.2174/156802610790232251>
- Valenzuela-Hormazabal Paulina. (2022). *Getting-Pharmacohpores-KNIME*. https://github.com/ramirezlab/WIKI/tree/master/Docking_and_Virtual_Screening/Getting-Pharmacohpores-KNIME
- Valero-Rojas, J., Ramírez-Sánchez, C., Pacheco-Paternina, L., Valenzuela-Hormazabal, P., Saldivar-González, F. I., Santana, P., González, J., Gutiérrez-Bunster, T., Valdés-Jiménez, A., & Ramírez, D. (2024). AlzyFinder: A Machine-Learning-Driven Platform for Ligand-Based Virtual Screening and Network Pharmacology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 64(24). <https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.4C01481>
- Vetrivel, A., Ramasamy, J., Natchimuthu, S., Senthil, K., Ramasamy, M., & Murugesan, R. (2023). Combined machine learning and pharmacophore based virtual screening approaches to screen for antibiofilm inhibitors targeting LasR of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(9), 4124–4142. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2064331>
- Von Bernhardi, R., & Eugenín, J. (2004). Microglial reactivity to β -amyloid is modulated by astrocytes and proinflammatory factors. *Brain Research*, 1025(1–2), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.07.084>
- Walters, W. P., & Wang, R. (2020). New Trends in Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(9), 4109–4111. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.0C01009>
- What are the main differences between HTVS, SP, and XP docking?* (n.d.). Retrieved June 27, 2024, from <https://support.schrodinger.com/s/article/1013>

- Wilson, D. M., Cookson, M. R., Van Den Bosch, L., Zetterberg, H., Holtzman, D. M., & Dewachter, I. (2023). Hallmarks of neurodegenerative diseases. In *Cell* (Vol. 186, Issue 4, pp. 693–714). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.032>
- Winslow, B. T., Onysko, M. K., & Hazlewood, K. A. (2011). *Treatment of Alzheimer Disease A* (Vol. 83). www.aafp.org/afpAmericanFamilyPhysician1403
- Zdrazil, B., Felix, E., Hunter, F., Manners, E. J., Blackshaw, J., Corbett, S., de Veij, M., Ioannidis, H., Lopez, D. M., Mosquera, J. F., Magarinos, M. P., Bosc, N., Arcila, R., Kizilören, T., Gaulton, A., Bento, A. P., Adasme, M. F., Monecke, P., Landrum, G. A., & Leach, A. R. (2023). The ChEMBL Database in 2023: a drug discovery platform spanning multiple bioactivity data types and time periods. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1004>
- Zhang, Y., Chen, H., Li, R., Sterling, K., & Song, W. (2023). Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01484-7>
- Zhao, Y., Liu, S., Zhou, Y., Zhang, M., Chen, H., Eric Xu, H., Sun, D., Liu, L., & Tian, C. (2021). Structural basis of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation. In *Cell Research* (Vol. 31, Issue 6, pp. 713–716). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00509-6>

ANEXOS

Anexo 1: Script en python para conversión de formato SDF a SMI

```
import openbabel # Importar el módulo Open Babel para la conversión

# Función para convertir un archivo SDF a SMI
def convert_sdf_to_smi(input_sdf, output_smi):
    ob_conversion = openbabel.OBConversion() # Crear un objeto de
    conversión de Open Babel

    ob_conversion.SetInAndOutFormats("sdf", "smi") # Establecer los
    formatos de entrada (SDF) y salida (SMI)

    mol = openbabel.OBMol() # Crear un objeto de molécula vacío

    with open(input_sdf, "r") as infile, open(output_smi, "w") as outfile: #
    Abrir los archivos de entrada y salida

        while ob_conversion.Read(mol, infile): # Leer cada molécula del
        archivo SDF

            outfile.write(ob_conversion.WriteString(mol)) # Escribir la
            molécula en formato SMILES en el archivo de salida

    print(f"Conversión completada: {output_smi}") # Imprimir un
    mensaje de confirmación

# Especificar los archivos de entrada (SDF) y salida (SMI)
convert_sdf_to_smi("input.sdf", "output.smi") # Llamar a la función con
los nombres de archivo
```

Anexo 2: Script en python para eliminar moléculas duplicadas por SMI y calcular QED

```
from rdkit import Chem
from rdkit.Chem import QED

# Función para calcular el QED y eliminar duplicados por SMILES
def calculate_qed(smiles_file):
    # Abrir el archivo SMILES en modo lectura
    with open(smiles_file, 'r') as file:
        smiles = file.read().splitlines() # Leer todas las líneas del archivo

    # Eliminar duplicados basados en los SMILES
    unique_smiles = list(set(smiles)) # Convertir a set para eliminar
    duplicados y luego a lista

    qed_scores = [] # Lista para almacenar los valores QED calculados
    canonical_smiles = [] # Lista para almacenar los SMILES canónicos

    # Iteración sobre cada SMILES único
    for sm in unique_smiles:
        try:
            mol = Chem.MolFromSmiles(sm) # Convertir SMILES a
            molécula de RDKit
            if mol is not None: # Si la conversión es exitosa
                qed_scores.append(QED.qed(mol)) # Calcular QED y
                agregarlo a la lista
                canonical_smiles.append(Chem.MolToSmiles(mol,
                isomericSmiles=True)) # Convertir a SMILES canónico y agregarlo
```

```
else: # Si la conversión falla
    qed_scores.append(None) # Agregar None para el QED
    canonical_smiles.append(None) # Agregar None para el
SMILES canónico

except Exception as e: # Manejo de excepciones si ocurre un
error durante la conversión
    qed_scores.append(None) # Agregar None para el QED
    canonical_smiles.append(None) # Agregar None para el
SMILES canónico

    print(f"Error processing SMILES: {sm}") # Imprimir error
    print(f"Error message: {str(e)}") # Mostrar el mensaje de error
    print("Skipping this SMILES.") # Notificar que se saltó este
SMILES

return canonical_smiles, qed_scores # Devolver las listas de
resultados

input_file = 'version.smi' # Archivo de entrada con los SMILES
output_file = 'output_qed.txt' # Archivo de salida con los resultados

# Calcular los valores QED para los SMILES del archivo de entrada y
eliminar duplicados
canonical_smiles, qed_scores = calculate_qed(input_file)

# Escribir los resultados en un nuevo archivo
with open(input_file, 'r') as file_in, open(output_file, 'w') as file_out:
    for line_in, canonical_smiles, qed in zip(file_in, canonical_smiles,
qed_scores):
```

```

line_out = line_in.strip() + '\t' + str(canonical_smiles) + '\t' +
str(qed) # Crear línea de salida

file_out.write(line_out + '\n') # Escribir línea en el archivo de
salida

print("QED calculations completed. Results written to:", output_file)

```

Anexo 3: Se generaron clústeres significativos para cada target en relación con los farmacóforos. El umbral de cada clúster se calculó utilizando el total de clústeres generados que va desde 1 molécula y se realizó mediante la métrica del promedio más dos veces la desviación estándar. De este modo, se seleccionaron los clústeres que contenían una cantidad de moléculas igual o superior al valor del umbral, identificando así los clústeres significativos

Target	Número total de clústeres	Clústeres Significativos	Umbral
AChE	183	3	51.73
BACE1	150	4	105.83
CB2	334	4	63.83
GSK-3β	122	3	25.31
MAO-A	130	3	16.24
Rn-α7	47	2	26.12

Anexo 4: Script en python para identificar compuestos con centros quirales y quirales

```
import pandas as pd
from rdkit import Chem

# Leer el archivo Excel, especificando que no tiene encabezados
(headers)
df = pd.read_excel('01_archivo.xlsx', header=None)

# Renombrar las columnas: la primera columna será SMILES y la
segunda el nombre de la molécula
df.columns = ['SMILES', 'Name'] + [f"Column{i}" for i in range(2,
len(df.columns))]

# Extraer la lista de nombres y SMILES
smiles_list = df['SMILES']
names_list = df['Name']

# Listas para almacenar moléculas quirales y no quirales
molecula_quiral = []
molecula_NOquiral = []
```

```
# Guardar las moléculas quirales en un archivo CSV
df_chiral = pd.DataFrame(molecula_quiral, columns=['Name',
'SMILES'])
df_chiral.to_csv('02_quiral.csv', index=False, sep='\t')

# Guardar las moléculas no quirales en otro archivo CSV
df_achiral = pd.DataFrame(molecula_NOquiral, columns=['Name',
'SMILES'])
df_achiral.to_csv('02_NOquiral.csv', index=False, sep='\t')

print("Se han guardado las moléculas quirales y no quirales en
archivos separados.")
```

```
# Procesar cada molécula
for name, smiles in zip(names_list, smiles_list):
    try:
        mol = Chem.MolFromSmiles(smiles)
        if mol:
            Chem.AssignAtomChiralTagsFromStructure(mol)
            chiral_centers = Chem.FindMolChiralCenters(mol,
includeUnassigned=True)

            if chiral_centers:
                molecula_quiral.append((name, smiles))
            else:
                molecula_NOquiral.append((name, smiles))
        else:
            print(f"SMILES inválido: {smiles} para la molécula {name}")
    except Exception as e:
        print(f"Error procesando {smiles} para {name}: {e}")

# Guardar las moléculas quirales en un archivo CSV
df_chiral = pd.DataFrame(molecula_quiral, columns=['Name',
'SMILES'])
df_chiral.to_csv('02_quiral.csv', index=False, sep='\t')
```

Anexo 5: Tabla con las concentraciones de los 21 compuesto evaluados frente a AChE y BuChE.

	Concentraciones en μM									
Molécula	Pocillo 1	Pocillo 2	Pocillo 3	Pocillo 4	Pocillo 5	Pocillo 6	Pocillo 7	Pocillo 8	Pocillo 9	Pocillo 10
M1	191.500	95.750	47.875	23.938	11.969	5.984	2.992	1.496	0.748	0.374
M2	254.438	127.219	63.609	31.805	15.902	7.951	3.976	1.988	0.994	0.497
M3	80.250	40.125	20.063	10.031	5.016	2.508	1.254	0.627	0.313	0.157
M4	137.000	68.500	34.250	17.125	8.563	4.281	2.141	1.070	0.535	0.268
M5	112.500	56.250	28.125	14.063	7.031	3.516	1.758	0.879	0.439	0.220
M6	596.438	298.219	149.109	74.555	37.277	18.639	9.319	4.660	2.330	1.165
M7	72.450	36.225	18.113	9.056	4.528	2.264	1.132	0.566	0.283	0.142
M8	262.313	131.156	65.578	32.789	16.395	8.197	4.099	2.049	1.025	0.512
M9	33.525	16.763	8.381	4.191	2.095	1.048	0.524	0.262	0.131	0.065
M10	35.875	17.938	8.969	4.484	2.242	1.121	0.561	0.280	0.140	0.070
M11	33.463	16.731	8.366	4.183	2.091	1.046	0.523	0.261	0.131	0.065
M12	17.225	8.613	4.306	2.153	1.077	0.538	0.269	0.135	0.067	0.034
M13	28.475	14.238	7.119	3.559	1.780	0.890	0.445	0.222	0.111	0.056
M14	236.750	118.375	59.188	29.594	14.797	7.398	3.699	1.850	0.925	0.462

E1	20.200	10.100	5.050	2.525	1.263	0.631	0.316	0.158	0.079	0.039
E2	173.500	86.750	43.375	21.688	10.844	5.422	2.711	1.355	0.678	0.339
E3	245.500	122.750	61.375	30.688	15.344	7.672	3.836	1.918	0.959	0.479
E4	214.500	107.250	53.625	26.813	13.406	6.703	3.352	1.676	0.838	0.419
E5	177.500	88.750	44.375	22.188	11.094	5.547	2.773	1.387	0.693	0.347
E6	194.750	97.375	48.688	24.344	12.172	6.086	3.043	1.521	0.761	0.380
E7	185.000	92.500	46.250	23.125	11.563	5.781	2.891	1.445	0.723	0.361