



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: METODOLOGÍAS DE MODELADO  
MOLECULAR EN EL DISEÑO Y SÍNTESIS DE  
FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

Autor: Belén Ortega Garrido.

Fecha: Junio 2020.

Tutor: José María Sánchez Montero.

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
3. METODOLOGÍA.....	2
4. INTRODUCCIÓN – BÚSQUEDA EN BASE DE DATOS .....	3
4.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....	3
4.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO .....	5
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
5.1. TÉCNICAS DE MODELADO MOLECULAR.....	8
5.2. FÁRMACOS DE LOS QUE SE HA ESTUDIADO SU VIABILIDAD POR DOCKING MOLECULAR.....	11
6. CONCLUSIONES .....	18
7. BIBLIOGRAFÍA.....	19

## 1. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es el tipo de desorden neurodegenerativo más común. Se asocia a alteraciones cognitivas, funcionales y comportamentales y afecta, principalmente, a mayores de 65 años.

Esta enfermedad es un tipo de demencia que se caracteriza morfológicamente por presentar una atrofia cerebral, disminución de conexiones sinápticas, descenso de la densidad neuronal y presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares.

La quimioinformática, disciplina en la que se emplean técnicas *"in silico"* para el descubrimiento de fármacos, ha supuesto un desafío al paradigma del descubrimiento de fármacos al azar, como, por ejemplo, la observación fortuita de posible respuesta del organismo ante un nuevo compuesto.

Este trabajo se centra en la aplicación de técnicas computacionales ya sean docking, cribado virtual, modelado farmacóforo o mecánica cuántica en la síntesis de fármacos para tratar la enfermedad de Alzheimer. Se presta especial interés en esta patología por su etiología múltiple e ineficacia demostrada del tratamiento de la misma con fármacos monodiana.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most common type of dementia and it's been associated with cognitive, functional and behavioral alterations. This type of dementia mainly affects people at advanced ages.

This type of dementia is morphological characterized by cerebral atrophy, decreased synaptic connections, low neuronal density and the presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles.

Chemoinformatics is a discipline in which *"in silico"* techniques are used for drug discovery. It has challenged the paradigm of random drug discovery, for example, the observation of the possible response of the organism to a new compound.

This work focuses on the application of computational techniques, whether they can be docking, virtual screening, pharmacophore modeling or quantum mechanics, in the synthesis of drugs to treat Alzheimer's disease. Special interest is given to this pathology because of its multiple aetiology and the proven ineffectiveness of treating it with monodial drugs.

## 2. OBJETIVOS

- ⇒ Profundizar en el conocimiento del modelado molecular, haciendo hincapié en la técnica del docking molecular, aplicado al descubrimiento de fármacos para tratar la enfermedad de Alzheimer.
- ⇒ Conocer la situación actual (tratamiento e investigación de nuevos fármacos) en la que se encuentra la enfermedad de Alzheimer, así como conocer las bases moleculares de la misma.
- ⇒ Estudiar las distintas dianas en las que los investigadores se centran para aplicar las técnicas computacionales en el descubrimiento de fármacos.
- ⇒ Conocer cómo se aplica la quimioinformática en el descubrimiento de fármacos, comprendiendo la investigación realizada en algunos compuestos como la curcumina o el donepezilo.

## 3. METODOLOGÍA

En este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica en bases de datos conocidas como *PubMed*, *Isis web of knowledge*, *Scirus* o *Google scholar* empleando distinciones para realizar una búsqueda adecuada en relación al tema concreto al que nos referimos. Algunos criterios empleados han sido:

- ✓ El empleo de palabras clave entre las que destacan: *molecular modeling*, *Alzheimer disease*, *docking*, *acetyl cholinesterase*.
- ✓ Tipo de documento: *review*. Nos hemos centrado en revisiones bibliográficas.
- ✓ Documentos de acceso abierto.
- ✓ Nos centraremos en las revisiones publicadas en los últimos cinco años, tratando temas de actualidad que puedan haber sido un gran avance en la investigación de la enfermedad de Alzheimer.

Para conocer la estructura cristalográfica de la acetilcolinesterasa se ha accedido a la base de datos conocida como *Protein Data Bank*, donde se ha empleado la palabra clave de *acetyl cholinesterase* y nos hemos centrado en la estructura de la acetilcolinesterasa humana (*homo sapiens*) ya que otras colinesterasas pueden presentar algunas diferencias respecto a la enzima humana.

## 4. INTRODUCCIÓN – BÚSQUEDA EN BASE DE DATOS

### 4.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer es el tipo de demencia más común que afecta, en su gran mayoría, a mayores de 65 años generando alteraciones cognitivas, funcionales y comportamentales y siendo responsable del 60-70% de los casos de demencia a nivel mundial. Aunque no se conocen las causas por las que se genera la enfermedad, existen una serie de factores ambientales, así como predisposición genética que favorecen el desarrollo de la enfermedad (1).

Esta patología destaca por tener un lento desarrollo y se caracteriza por generar una atrofia cerebral, disminuir las conexiones sinápticas y densidad neuronal, además, tiene dos rasgos microscópicos característicos que son la presencia de placas  $\beta$ -amiloides extracelulares y ovillos neurofibrilares intraneuronales (1).

La primera parte del cerebro que se ve dañada es la corteza entorrinal (siendo ésta importante en funciones como la memoria, asociación de la información visual y auditiva, navegación espacial, codificación de olores...) esta alteración se corresponde con el estadio temprano o entorrinal. A medida que aumenta el deterioro de esta parte, se comienza a afectar el hipocampo y las zonas límbicas, correspondiendo al estadio límbico. Y, por último, en el estadio neocortical, se afecta la neocorteza. Esta clasificación es útil porque establece la evolución de la enfermedad estando íntimamente ligada con la clínica, siendo el primer estadio asintomático, pudiendo observar alteraciones cognitivas en el estadio límbico y, finalmente, observando un gran deterioro cognitivo y demencia en el estadio neocortical.

En función de la localización de las lesiones, podemos distinguir varias formas clínicas que, dependiendo de la zona afectada, se manifiestan con distintas alteraciones y pérdida de algunas capacidades (2).

Formas clínicas	Localización de la lesión	Alteración predominante
Afásico	Fronto-temporal-lateral	Lenguaje
Amnésico	Temporal mesial Parieto-temporal lateral	Memoria. Esta alteración ocurre en la mayoría de los casos de EA
Conductual	Prefrontal	Conducta
Subcortical	Subcortical	Funciones ejecutivas
Apráxico-motor	Cuerpos de Lewy	Fluctuaciones y alucinaciones visuales

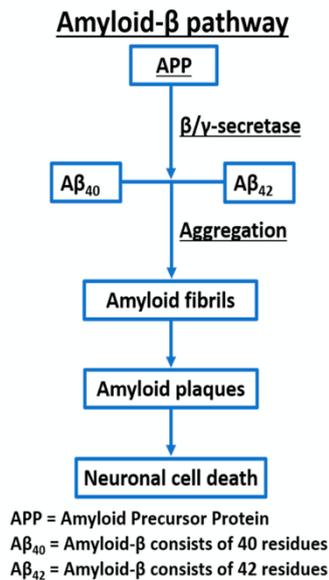


Ilustración 1. Ruta amiloide (3).

Este proceso molecular ha sido, durante muchos años, el predominante en la investigación de fármacos para tratar la enfermedad de Alzheimer, siendo las  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas moléculas muy estudiadas como diana de múltiples fármacos.

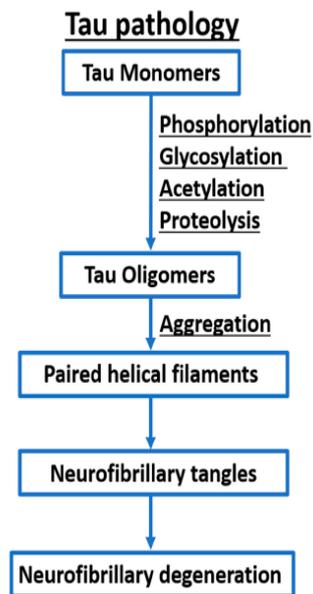


Ilustración 2. Taupatías (3).

La **hipótesis de la cascada amiloide**, que explica la agregación de las placas  $\beta$ -amiloides, ha sido motivo de estudio durante muchos años.

1. La proteína precursora amiloide (APP) es hidrolizada por la  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa generándose péptidos  $\beta$ -amiloides.
2. A continuación, se produce la agregación de estos péptidos, formándose aglomerados de 38-43 aminoácidos.
3. Por último, se generan largos oligómeros (fibras amiloides) que son insolubles y se acumulan en el interior del cerebro  $\rightarrow$  formándose placas seniles que son neurotóxicas e inducen la cascada de la proteína Tau produciéndose la muerte progresiva de células y neurodegeneración, manifestándose en la clínica como pérdida de memoria y facultades que conducen a la incapacidad del individuo y, finalmente, la muerte (3).

La **proteína microtubular Tau** es muy frecuente en el sistema nervioso central, especialmente en los axones neuronales. En la EA se han visto lesiones asociadas a la proteína Tau hiperfosforilada.

Juega un papel muy importante en la estabilización de los microtúbulos, asociándose también con neurotransmisores, regulación del equilibrio del tráfico de células nerviosas y factores neurotróficos.

La proteína Tau es muy flexible, sin estructura totalmente definida (secundaria y terciaria) que es capaz de enrollarse alrededor de una diana o receptor. Las taupatías son un tipo de desorden neurodegenerativo generado por la agregación de proteínas Tau formando oligómeros, pares de filamentos helicoidales y lisos y ovillos neurofibrilares. Este proceso genera depósitos fibrilares intraneuronales y degeneración neurofibrilar (3).

La **teoría de la desconexión cortical** explica que las lesiones neuronales generan que el hipocampo quede desconectado de la neocorteza. A esto se le une el déficit en glutamato y otros neuropéptidos en las cortezas de asociación. La apraxia, agnosia, trastornos visuales, espaciales y ejecutivos se relacionan con este hecho (2).

Desde el punto de vista neurofisiológico, la enfermedad de Alzheimer también se caracteriza por una **deficiente transmisión colinérgica** (relacionado con el déficit de acetilcolina). Esto se debe a que, debido a los depósitos proteicos comentados anteriormente, se da una afectación específica de las neuronas del sistema colinérgico.

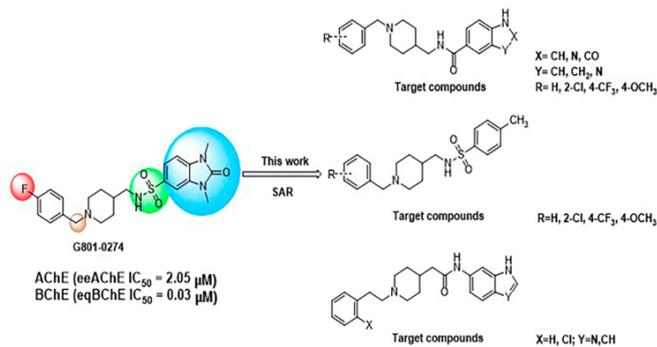


Ilustración 3. Diseño de fármacos inhibidores duales de la AChE y BCHE (4).

donde se produce un ataque nucleófilo al grupo carbonilo de la acetilcolina, seguido por la acilación de la acetilcolinesterasa y la liberación del grupo colina, por último, la enzima se hidrolizará y se liberará ácido acético regenerándose la acetilcolinesterasa de nuevo (4).

Para el conocimiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer en su diagnóstico precoz se han estudiado algunos biomarcadores que indicarían la existencia de lesiones neuronales propias de la enfermedad. Entre los marcadores que podemos encontrar en líquido cefalorraquídeo (LCR) destacan: la proteína β-amiloide, la proteína tau total y su forma fosforilada en su posición 181 (2).

En los últimos años, se ha estado utilizando como marcador el índice AD-CSF que representa una aproximación novedosa y permite establecer el diagnóstico de la EA con elevada sensibilidad y especificidad. El AD-CSF combina las alteraciones de biomarcadores observadas en el LCR y se calcula a partir de los valores de β-amiloide-42 y tau encontrados en LCR.

Por otro lado, ante sospecha de EA, el neurólogo realizara un diagnóstico clínico del paciente y pruebas de diagnóstico por imagen que permitirán establecer un diagnóstico diferencial e instaurar el tratamiento más adecuado (2).

#### 4.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

El interés por encontrar un tratamiento eficaz para curar la enfermedad de Alzheimer ha ido incrementándose en los últimos años, sin embargo, y, desafortunadamente, no existe tratamiento eficaz para curar la enfermedad y los tratamientos actuales están enfocados a reducir los síntomas, retrasar o estabilizar el deterioro de las funciones cognitivas afectadas y mantener las funciones cognitivas preservadas, mejorar y mantener la calidad de vida de todos los pacientes afectados por EA, detectar y tratar precozmente los trastornos emocionales y de conducta, prevenir problemas asociados a la progresión de la enfermedad, etc., además, el tratamiento cuenta con muchos efectos secundarios (5).

El tratamiento farmacológico asociado a la enfermedad de Alzheimer ha resultado ser paliativo, ya que aún no se conoce la cura para esta patología, siendo los cuatro fármacos más reconocidos, tres inhibidores de la acetilcolinesterasa cuyos nombres son rivastigmina, donepezilo y galantamina y el antagonista no competitivo del receptor NMDA, memantina.

- ◇ **Galantamina:** se ha visto que no sólo es un inhibidor competitivo y reversible de la acetilcolinesterasa, sino que también es un modulador alostérico del receptor nicotínico (esto significa que, al estimular estos receptores a nivel cerebral, tiene la capacidad de incrementar la liberación del neurotransmisor, acetilcolina, y por tanto disminuir la toxicidad generada por la agregación  $\beta$ -amiloide). También estimula la liberación de otros neurotransmisores implicados en la formación de la memoria, tales como el glutamato, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y ciertas monoaminas, esto podría favorecer su acción. Es una amina terciaria y estaría indicado en el tratamiento de la enfermedad leve o moderada (6-2).
- ◇ **Rivastigmina:** es un inhibidor de la acetil- y butirilcolinesterasa de tipo carbamato, teniendo un efecto beneficioso sobre el déficit cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer en su estadio leve o moderado. También se utiliza en el tratamiento sintomático de la demencia con parkinsonismo idiopático de leve a moderada. Tiene afinidad por el hipocampo y la corteza cerebral (6).
- ◇ **Donepezilo:** es un derivado de la piperidina, especialmente efectivo en las primeras fases de la enfermedad. Además de ser un inhibidor reversible de la acetilcolinesterasa, también inhibe la agregación  $\beta$ -amiloide y BACE1; además de poder interactuar con los receptores  $\sigma$ -1 (6).
- ◇ **Memantina:** es un antagonista no competitivo, dependiente del voltaje y de moderada afinidad de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del ácido glutámico, reduciendo la excesiva entrada de calcio en el interior neuronal. Se emplea en las fases avanzadas de la enfermedad, estando estrechamente ligado con la capacidad de memoria y neuroplasticidad (6-2).

Es importante tener en cuenta que, además de otras reacciones adversas, los fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa aumentan la acción miorelajante de la succinilcolina o suxametonio durante la anestesia, por lo que se debería suspender el tratamiento antes de la cirugía (2).

Además de las manifestaciones cognitivas, en la enfermedad de Alzheimer también se dan alteraciones conductuales que precisan ser tratadas. Para ello, se emplean neurolépticos, antidepresivos y ansiolíticos.

Por otra parte, existe tratamiento no farmacológico en el que se potencia, mantiene y recupera la capacidad cognitiva. Estos programas, junto con el tratamiento farmacológico, constituyen las denominadas terapias combinadas o integrales y entre sus objetivos destacan: mejorar el déficit cognitivo y de conducta (terapias de orientación de la realidad), mejorar la memoria, favorecer la creatividad, aumentar la autoestima y satisfacción personal (terapias de reminiscencia), aceptación de la realidad (terapia de validación), mantener la capacidad funcional, entrenando el área en cuestión (entrenamiento cognitivo) y favorecer la actividad cognitiva (estimulación sensorial) (2).

Durante muchos años, los fármacos empleados en el tratamiento de la enfermedad han sido conocidos como “una enfermedad-una diana” porque actúan específicamente sobre la diana.

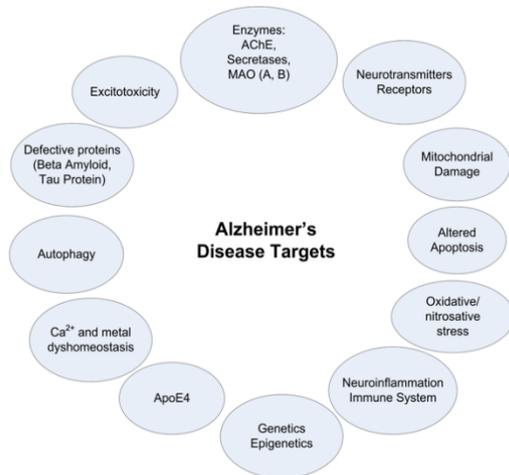


Ilustración 4. Algunas de las principales dianas en la investigación de la EA (5).

La investigación más prometedora es la consistente en buscar fármacos multidiana (MTDL) que son aquellos cuyo mecanismo de acción no sólo estaría enfocado a los dos rasgos microscópicos más característicos de la enfermedad (placas  $\beta$ -amiloides o taupatías) y deficiencia en el sistema colinérgico, sino también dirigirlos a tratar de frenar el estrés oxidativo, la excitotoxicidad y neuroinflamación tan característicos en la enfermedad. Es también conveniente tener en cuenta que pacientes que cursan con la enfermedad de Alzheimer poseen un nivel de apoptosis incrementado, alteraciones en los niveles del calcio y otros metales, y daño mitocondrial (5).

Hasta el momento, tratando de actuar sobre diferentes dianas, existen algunas combinaciones de fármacos que se emplean en el tratamiento de la EA como son: donepezilo + un antagonista del receptor CB1, memantina + vitamina D, y rivastigmina + memantina (5).

El sistema cannabinoide ha sido estudiado, con buenos resultados, aunque con infinidad de limitaciones, para proteger las células neuronales en algunas enfermedades que cursan con daño crónico. Los cannabinoides disminuyen la reactividad al dolor, el más estudiado ha sido el 9- $\Delta$ -tetrahidrocannabinol (THC) (que puede ser administrado por vía oral, intravenosa, o directamente en el cerebro o en la médula) y en la analgesia experimental inducida por este compuesto se ha visto que hay un componente supraespinal no relacionado con los péptidos opioides y un componente espinal donde estarían implicados tanto el receptor CB1 como el receptor opioide  $\kappa$  y su ligando endógeno (la dimorfina). En la enfermedad de Alzheimer, íntimamente relacionada con la neurodegeneración, los efectos tóxicos producidos por la sobreactivación de los receptores de glutamato influyen en los mecanismos de muerte celular, por ello están siendo estudiados este tipo de compuestos, para poder evaluar la actividad neuroprotectora. Algunos ejemplos que destacar son:

- El cannabinoide HU-211: en las neuronas expuestas al efecto del glutamato, ejerce un efecto neuroprotector.
- Endocannabinoide palmitoiletanolamida: aumenta la supervivencia para células granulares del cerebelo en modelos de muerte celular inducida por glutamato.
- Existen algunos casos de uso anecdótico del dronabinol para tratar algunos síntomas referidos a la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, su uso queda casi restringido a pacientes oncológicos (para tratar las náuseas producidas por el tratamiento quimioterápico) y el síndrome de anorexia-caquexia en la enfermedad de SIDA.

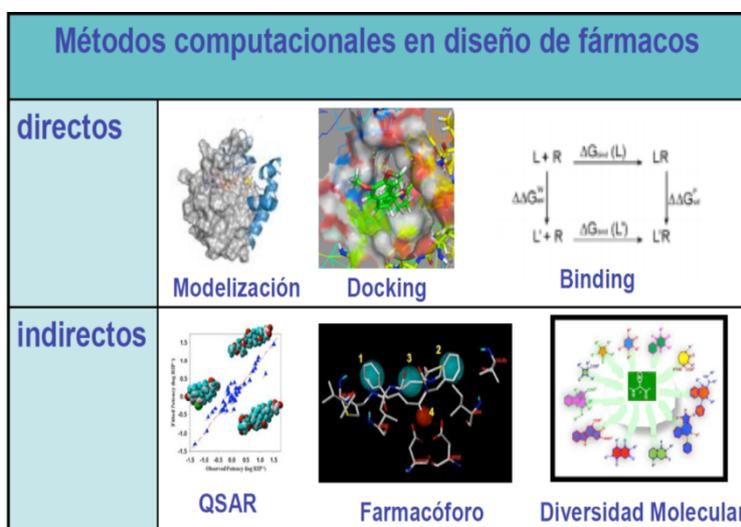
- El THC y el cannabinoles muestran cierta similitud estructural con el donepezilo, fármaco mundialmente utilizado para tratar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer en sus primeras fases (7-8).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. TÉCNICAS DE MODELADO MOLECULAR

La quimioinformática, disciplina en la que se emplean técnicas *“in silico”* para el descubrimiento de fármacos, ha supuesto un desafío al paradigma del descubrimiento de fármacos al azar, como, por ejemplo, la observación fortuita de posible respuesta del organismo ante un nuevo compuesto.

Actualmente, debido a la implementación de ensayos biológicos de alto rendimiento y de la química combinatoria en la industria farmacéutica, las técnicas *“in silico”* están siendo utilizadas para entender y racionalizar el comportamiento de un principio activo con su receptor biológico.



Mediante el diseño de fármacos asistidos por ordenador podemos llegar a predecir las propiedades físicas de los ligandos y las moléculas y simular su interacción con los receptores biológicos, en nuestro caso sería simular la interacción de un ligando con la acetilcolinesterasa y otras moléculas propuestas como posibles dianas para tratar la EA (9).

Ilustración 5. Métodos computacionales en el diseño de fármacos (9).

Como observamos en la imagen superior, existen métodos computacionales en el diseño de fármacos directos e indirectos. En los primeros se tienen que conocer las características tridimensionales de un receptor y se estudiará la actividad o inactividad de las moléculas en términos de complementariedad con el receptor (por ejemplo, docking o estudios de interacción entre fármaco y receptor). En los métodos indirectos la estructura tridimensional del receptor no será conocida y entonces se basarán en el análisis comparativo de las características estructurales de compuestos conocidos activos o inactivos, con el objetivo de definir un farmacóforo apropiado para la actividad biológica estudiada siendo QSAR 3D una técnica muy utilizada en este método (9-10).

Dentro de la quimiinformática, algunas estrategias que se están llevando a cabo para el diseño de fármacos asistidos por ordenador son:

- ◇ Cribado sistemático de compuestos: a partir de una diana conocida, haremos una batería de ensayos de cribado hasta que encontremos una molécula que encaje perfectamente con la diana en cuestión.

Esta técnica es utilizada en el descubrimiento de fármacos para buscar bibliotecas de pequeñas moléculas con el objetivo de identificar aquellas estructuras con más probabilidades de unirse a un objetivo farmacológico, generalmente un receptor de proteínas o enzima.

- ◇ Mejora de fármacos conocidos y diseño racional de fármacos mediante:
  - \* Aproximación bioquímica: se basa, principalmente, en la inhibición enzimática.
  - \* Modelado molecular: es el diseño de fármacos basados en la estructura del receptor.

Dependiendo de si conocemos o no la estructura del ligando o del receptor existen distintas técnicas computacionales:

- Si conocemos la estructura del ligando y del receptor llevaremos a cabo distintas técnicas de docking y modelado molecular.
- Si tenemos una molécula activa sin saber su receptor, nos decantaremos por el modelado de farmacóforos. De esta manera, podremos proporcionar la descripción de las características moleculares de un ligando de una macromolécula biológica necesarias para su reconocimiento molecular.
- Si la estructura del ligando es desconocida, pero conocemos la del receptor, emplearemos el diseño de Novo.
- Si tanto la estructura del ligando como la del receptor son desconocidas, utilizaremos la química combinatoria o QSAR 3D.
- En ocasiones, cuando no se conoce la diana, pero sí una proteína muy parecida, se puede hacer un modelado por homología que consiste en trabajar con un modelo muy aproximado a lo real.

Cómo construir la molécula en mecánica molecular:

- ∴ Se emplean librerías de fragmentos basadas en distancias reales que se han obtenido a partir de métodos cristalográficos. Teniendo en cuenta que las moléculas pueden adoptar distintas conformaciones, buscaré la más idónea que será la de mínima energía y esto lo conseguiré utilizando métodos de minimización de energía, donde destacan:
  - √ Primera derivada: se comienza por una orientación determinada donde tenemos una conformación específica al azar, a partir de ésta seguimos produciendo movimiento en una serie de direcciones parando cuando llega a un mínimo local.

- √ Segunda derivada: tiene la ventaja de que no se buscan conformaciones al azar. Se aplica generalmente cuando la geometría se encuentra preoptimizada por otro procedimiento de primera derivada, como por ejemplo steepest-descent.

## DOCKING

Una de las técnicas más empleadas en el descubrimiento y diseño de fármacos asistidos por ordenador es la técnica de docking o acoplamiento, que cuenta con más de cien mil estructuras estudiadas de proteínas en conformación 3D en *Protein Data Bank* (11).

La técnica de docking molecular permite al investigador tener una comprensión atómica detallada del receptor que se esté estudiando y su interacción con el ligando. La identificación de regiones críticas que determinan las propiedades físicas y sus interacciones con el medio podrán ser utilizadas para el diseño de proteínas u otros compuestos con características similares. A partir de este conocimiento se podrá diferenciar entre qué compuestos son capaces de unirse al receptor en cuestión y cuáles no (12). Es importante conocer:

- √ El fundamento: se basa en predecir el modo de unión y en aproximar la energía de enlace de un compuesto a una diana (9).
- √ El objetivo: es la obtención del complejo receptor-ligando de energía más baja y poder analizar las principales interacciones implicadas en la unión fármaco-receptor (9).
- √ El procedimiento:
  1. Seleccionaremos una diana: proteínas (entre las que destacan especialmente enzimas), canales iónicos o receptores acoplados a la proteína G, serán las más utilizadas por ser muy específicas y poco tóxicas.
  2. Preparemos una base de datos con compuestos o fragmentos de compuestos específicos para la diana, los cuales estarán basados en distancias reales obtenidas a partir de métodos cristalográficos:
    - \* Para encontrar la estructura de la diana acudiremos a la base de datos llamada *Protein Data Bank* donde encontraremos acceso a la estructura atómica en 3D obtenida a través de métodos experimentales. Si no encontramos la diana en esta base de datos, podremos recurrir a métodos de predicción computacional.
    - \* La estructura del ligando la podremos encontrar en bases de datos de pequeñas moléculas como ZINC o PubChem (13).
  3. Necesitaremos un software para realizar la técnica de docking. Destacan Dock, AutoDock, MolDock, GOLD, FlexX y Molegro Virtual Docker (13).
  4. Procederemos a realizar el estudio. Como hemos comentado anteriormente, el docking predice el modo de unión y la correcta conformación que deben adoptar el ligando y el receptor para que, al unirse, formen el complejo más estable. Existe el docking rígido donde el ángulo de enlace, tensión simétrica

o asimétrica y plegamiento permanecen constantes (se aleja de la aplicación práctica) y el docking flexible donde la conformación del ligando y receptor irán cambiando a lo largo del tiempo, en función de la posición y energía de enlace, acercándose al modelo real (es más exacto y aproximado a la realidad, aunque requiere un gran conocimiento informático).

5. Una vez obtenida la molécula que estábamos buscando, pasaremos a realizar estudios biológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*.
6. Por último, y habiendo pasado con éxito las fases anteriores, se realizarán estudios clínicos con pacientes para comprobar su seguridad y eficacia (11).

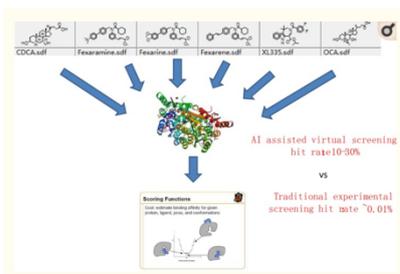


Ilustración 6. Procedimiento sistemático de cribado virtual asistido por inteligencia artificial (11).

Para el descubrimiento de fármacos (agonistas o antagonistas) basados en una diana utilizaremos algoritmos genéticos y estudiaremos el modo de unión de compuestos con nuestra diana. Esta nueva técnica ha sido muy estudiada para investigar nuevas terapias en el tratamiento del cáncer y algunas ventajas que presenta son que reduce significativamente el tiempo y coste respecto a las técnicas utilizadas tradicionalmente (11).

La técnica de docking es también utilizada para el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas por modificación de los fármacos ya existentes. Por ejemplo, se ha visto que la amiodarona (antiarrítmico de clase III) es un fármaco activo en la neurodegeneración (11).

## 5.2. FÁRMACOS DE LOS QUE SE HA ESTUDIADO SU VIABILIDAD POR DOCKING MOLECULAR

La investigación de fármacos para tratar la enfermedad de Alzheimer es una tarea muy difícil debido a la complejidad de los procesos moleculares que se dan durante el progreso de la enfermedad. Por esto, hoy en día los investigadores se están centrando en técnicas computacionales entre las que destacan: docking molecular, dinámica molecular y QSAR.

### 5.2.1. DIANAS

Las principales dianas estudiadas para tratar la enfermedad de Alzheimer por métodos computacionales han sido (3):

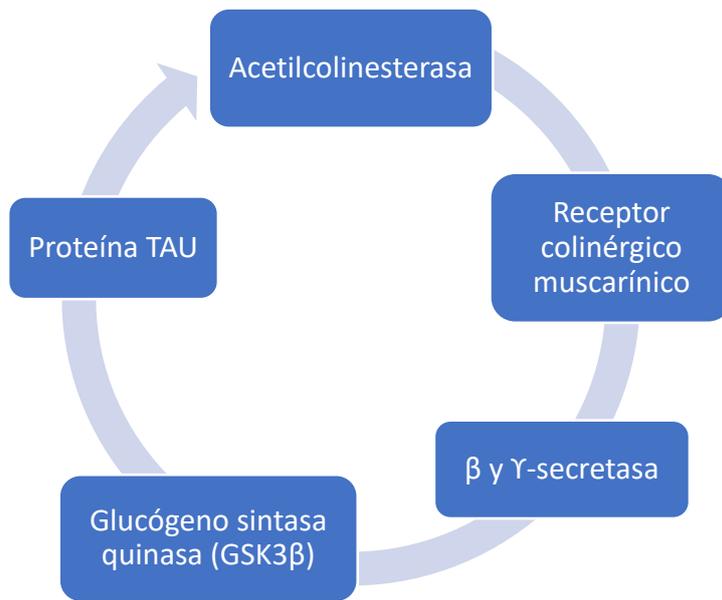


Tabla 1. Dianas empleadas en la investigación de fármacos, para tratar la EA, por métodos computacionales.

#### β- SECRETASA

Esta enzima transmembrana, también conocida como BACE1, presenta su máxima actividad a pH ácido y se expresa mayoritariamente en las neuronas, en concreto, en el aparato de Golgi, endosomas, vesículas secretoras.

- ◇ Gracias a la microscopía electrónica, se ha visto que BACE1 es una enzima localizada predominantemente en terminales sinápticas normales y dañadas.
- ◇ Mediante estudios cromosómicos se ha identificado una enzima homóloga a BACE1, llamada BACE2. Múltiples estudios computacionales se han enfocado en entender la selectividad de inhibidores de BACE1 frente a los de BACE2.

Sus inhibidores han sido estudiados por docking, métodos cristalográficos por rayos X y estudios experimentales in vitro (3).

#### γ-SECRETASA

Esta enzima está formada por varias proteínas entre las que destacan: nicastrina, PEN-2, presenilinas 1 y 2 (forman el sitio catalítico), y proteínas implicadas en la estabilización y maduración del complejo. Esta enzima lleva a cabo una proteólisis intramembrana, entre los dominios transmembrana, mediante el reconocimiento de elementos estructurales que le sirven como sitio de reconocimiento y sitio catalítico (14-15).

En este caso, los estudios empleados han sido *docking* molecular, QSAR y modelo de farmacóforos que han identificado algunos "hot spot" para inhibidores alostéricos del sitio catalítico de la enzima (3).

## PROTEÍNA TAU

Modificaciones post-traduccionales de la proteína TAU, entre las que se incluyen reacciones de fosforilación, glicosilación, acetilación o truncamiento, son las que diferencian la proteína de un cerebro sano frente a las de un cerebro que presente taupatías.

Algunas quinasas que facilitan su fosforilación son:

- ◇ GSK-3 $\beta$ .                      ◇ CDK5.                      ◇ CK1.                      ◇ PKA.

Además, la acción de la proteína fosfatasa 2 (PP2A) se ve disminuida significativamente en pacientes con la enfermedad. Los estudios de investigación en este caso estarían enfocados a inhibir la fosforilación, agregación, proteólisis y estabilización de microtúbulos empleando diversas técnicas:

- ∴ Docking molecular y cinética enzimática → han demostrado que las C-glicosil flavonas son capaces de inhibir la hiperfosforilación de la proteína TAU mediada por la GSK-3 $\beta$ , actuando como sustratos competitivos de la enzima (3).
- ∴ Docking molecular seguido de dinámica molecular → estas técnicas se han empleado para la obtención de diversas estructuras químicas con una actividad biológica muy prometedora, teniendo como fuente el ecosistema marino. Destacan los alcaloides derivados del indol (por ejemplo, análogos de indirubina actúan como inhibidores de la GSK-3 $\beta$  y CDK5) (16).
- ∴ Docking molecular y QSAR 3D → estudios realizados utilizando estas técnicas han demostrado que los derivados pirazolopirimidínicos mejoran la actividad celular en la neurodegeneración inhibiendo la GSK-3 $\beta$ . En estos estudios se ha prestado especial interés a la selectividad de estos compuestos para inhibir la GSK-3 $\beta$  y no la CDK-2 (que presenta una estructura similar) (17).

### GSK-3 $\beta$

Es una enzima que facilita la fosforilación de la proteína TAU y cuyos inhibidores están siendo motivo de estudio en la actualidad al haber demostrado una gran selectividad y efectividad como posible terapia para tratar la EA (18-19). Algunos inhibidores de la GSK-3 $\beta$  estudiados por técnicas computacionales han sido expuestos en el apartado anterior.

Inhibidores de la enzima GSK-3 $\beta$  han sido estudiados utilizando las técnicas de docking molecular, ADME/Tox y predicciones computacionales de viabilidad sintética de compuestos obtenidos *in silico*.

Los inhibidores de esta enzima han demostrado tener actividad mutagénica, por esto, se han empleado métodos computacionales a través de los que se han obtenido seis análogos de un inhibidor de la GSK-3 $\beta$  y de los que ensayos en ratas han demostrado que estos análogos no tienen la actividad mutagénica ni carcinogénica característica del inhibidor inicial y, además, la serie ADME está mejorada (5).

Además, en la EA subyacen mutaciones de los genes de las presenilinas 1 y 2. La PS1 es sustrato de la GSK3 $\beta$  y se considera un factor etiológico en el desarrollo de la EA (20).

## RECEPTOR COLINÉRGICO MUSCARÍNICO

Los receptores colinérgicos muscarínicos están dentro de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

La mayoría de los agonistas estudiados han resultado ser poco selectivos, compuestos catiónicos y pertenecientes a un grupo de fármacos altamente vigilados por todas las reacciones adversas que pueden presentar (21).

Se ha empleado la técnica del docking molecular para encontrar agonistas de los receptores muscarínicos M2 y M3, a través de la que se han obtenido 3.1 millones de moléculas con:

- √ Distintas propiedades fisicoquímicas.
- √ Diferente selectividad para los subtipos del receptor muscarínico: prestando especial atención a los aminoácidos que forman el sitio de unión del receptor con la acetilcolina.

El tratamiento más prometedor, dentro de los receptores muscarínicos, para tratar la enfermedad de Alzheimer sería encontrar agonistas del subtipo M1. Sin embargo, este tipo de fármacos tienen un estrecho margen terapéutico y su uso se reduce a casos muy concretos (21).

## ACETILCOLINESTERASA

Para tratar la enfermedad de Alzheimer sólo han sido aprobados cinco fármacos por la FDA, siendo cuatro de ellos inhibidores de la acetilcolinesterasa:

- ◇ Tacrina
- ◇ Galantamina
- ◇ Rivastigmina
- ◇ Donepezilo

La tacrina está dentro de la primera generación de fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa, sin embargo, ha sido retirado de mercado por generar hepatotoxicidad (3).

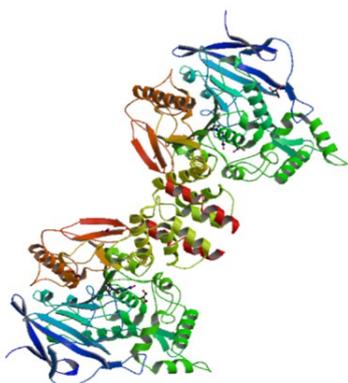


Ilustración 7. Estructura en 3D de la acetilcolinesterasa humana (23).

La acetilcolinesterasa participa tanto en la hidrólisis de la acetilcolina en su sitio catalítico como en la formación de las placas seniles en su sitio aniónico periférico o PAS. Los primeros péptidos inhibidores de la ACHE fueron encontrados en pieles de anfibios (22).

La imagen a la izquierda muestra la estructura en 3D de la acetilcolinesterasa humana, imagen extraída de la base de datos *Protein Data Bank* (23).

En el sistema nervioso central coexisten la butirilcolinesterasa y la acetilcolinesterasa, habiendo sido estudiadas como posibles dianas para tratar la EA. Estudios han demostrado que durante el progreso de la enfermedad la actividad de la acetilcolina se ve reducida en un 10-15% respecto a su estado inicial, por ello, se ha prestado especial interés a los inhibidores de la acetilcolinesterasa. Sin embargo, en los estadios moderados y avanzados de la enfermedad la acción de la acetilcolinesterasa se ve menguada mientras que la de la butirilcolinesterasa incrementa, compensando metabólicamente la acción de la acetilcolinesterasa e hidrolizando la acetilcolina (3).

El donepezilo y la galantamina han demostrado selectividad relativamente elevada hacia la acetilcolinesterasa, con muy poca actividad a nivel periférico. Por el contrario, la rivastigmina inhibe la enzima presente en el sistema nervioso central (acetilcolinesterasa) y también la presente en el periférico (butirilcolinesterasa) (2).

Inhibidores cuyas dianas fueran acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa tendrían una mayor efectividad en pacientes que se encuentren en el estadio avanzado de la enfermedad.

Se han estudiado los derivados del compuesto 4-ariltiazol-2-amino como posibles inhibidores de la acetilcolinesterasa donde se obtuvo:

- ∴ La concentración inhibitoria 50 (CI50) resultó ser superior que la de rivastigmina (compuesto de referencia).
- ∴ Estudios in vitro demostraron su actividad como inhibidores de la ACHE.
- ∴ Tienen un ligero efecto inhibitorio sobre la butirilcolinesterasa.

Mediante la técnica de *docking molecular* se vio que estos compuestos se unen fuertemente a la ACHE con una energía de unión de  $-11.27 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , presentando características óptimas como posible terapia para tratar la EA (24).

### 5.2.2. FÁRMACOS

#### DONEPEZILO

Múltiples estudios computacionales (CADD) se han centrado en el donepezilo por tener una eficacia probada con menos efectos adversos que otros inhibidores de la acetilcolinesterasa, también inhibe la agregación  $\beta$ -amiloide. Tras la administración de dosis de 5 y 10 mg de donepezilo se inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa en un 63,6% y 77,3%, respectivamente.

El objetivo de los estudios CADD reside en mejorar la eficacia de éste y estudiar nuevos candidatos.

En estos estudios la estructura en 3D de la acetilcolinesterasa, utilizada como diana, se ha obtenido de distintas bases de datos como *Protein Data Bank* (PDB ID -4EY7) y la del donepezilo ha sido seleccionada de RCSB-PDB (*Protein Data Bank*). La energía de la ACHE en su estado de mínima energía es de  $-1.337 \cdot 10^{-4} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

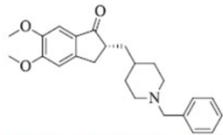
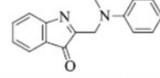
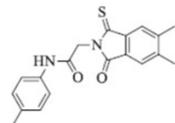
Una vez obtenidos una serie de compuestos, se emplean algunas reglas, que tienen que cumplir, para reducir el número de estos:

A) Regla de cinco de Lipinski: nos indica cómo de adecuado puede ser un compuesto químico para que, ingerido por vía oral, cumpla una determinada función farmacológica, sea permeable a las membranas y fácilmente absorbible por el organismo, siguiendo la serie ADME.

1. Su peso molecular debe ser inferior a 500 Daltons.
2. Su coeficiente de reparto octanol-agua (logP) ha de ser inferior a 5.
3. La suma de los átomos de nitrógeno y oxígeno tiene que ser inferior a 10.
4. No debe tener más de 5 grupos dadores de enlaces de hidrógeno (H.B.D.).
5. No debe tener más de 5 grupos aceptores de enlaces de hidrógeno (H.B.A.).
6. Número de enlaces rotatorios inferior a 10.

B) Regla de Lipinski para fármacos cuya diana esté en el sistema nervioso central:

1. Su peso molecular ha de ser inferior a 400 Daltons.
2. LogP tiene que ser inferior a 5.
3. No debe tener más de 3 grupos dadores de enlaces de hidrógeno (H.B.D.).
4. No debe tener más de 7 grupos aceptores de enlaces de hidrógeno (H.B.A.).
5. Número de enlaces rotatorios inferior a 8.

Compuestos	Propiedades
<p>Donepezilo</p>  <p>(R)-2-((1-benzylpiperidin-4-yl)methyl)-5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-one Chemical Formula: C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>2</sub></p>	<p>Bioaff.: - 6.32 M. wt.: 379.49 LogP: 4.93 H. B. D.: 0 H. B. A.: 4</p>
<p>Análogo Donepezilo_1</p>  <p>2-((methyl(phenyl)amino)methyl)-3H-indol-3-one Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O</p>	<p>Bioaff.: - 6.53 M. wt.: 250.30 LogP: 3.38 H. B. D.: 0 H. B. A.: 3</p>
<p>Análogo Donepezilo_2</p>  <p>2-(5,6-dimethyl-1-oxo-3-thioxoisindolin-2-yl)-N-(p-tolyl)acetamide Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S</p>	<p>Bioaff.: - 6.51 M. wt.: 338.42 LogP: 3.67 H. B. D.: 1 H. B. A.: 4</p>

Los análogos de donepezilo que cumplieran la regla de los cinco de Lipinski y la regla de Lipinski para drogas cuya diana estuviera en el SNC (CNS) pasaron a las siguientes fases donde se estudió su afinidad biológica y la forma que tenían estos análogos de unirse a la acetilcolinesterasa, prediciendo y analizando los aminoácidos y grupos funcionales implicados en la interacción y comparándolos con el compuesto de referencia o donepezilo.

Ilustración 8. Propiedades farmacológicas del donepezilo y análogos (25).

A continuación, se pasó a estudiar la serie ADME- basada en la estructura. La absorción se clasificó en:

- Baja: 0-33% de fármaco absorbido.
- Media: 33-64% de fármaco absorbido.
- Alta: 67-100% de fármaco absorbido.

El donepezilo tiene una energía de interacción con el receptor de  $-6.32\text{kcal/mol}$  mientras que los análogos, cuyas fórmulas moleculares eran  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ , demostraron tener energías de interacción mejores como  $-8.51$ ;  $-7.67\text{ kcal/mol}$ ..., demostrando que mediante técnicas computacionales podemos llegar a un mayor número de compuestos en menos tiempo, con un coste menor y muchas menos posibilidades de fallar (25).

### CURCUMINAS

Las curcuminas, procedentes de *Cúrcuma Longa*, han demostrado tener un efecto beneficioso tanto en la prevención como en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Mediante estudios computacionales, entre los que destaca el docking molecular, se ha visto que la curcumina actúa a distintos niveles (20):

- ◇ El grupo hidroxifenólico contribuye a disminuir la actividad amiloilogénica.
- ◇ ADAM 10 y ADAM 17 (familia de transmembrana de un solo paso y metaloendopeptidasas secretadas), reguladas por la PKC, inducen la escisión en el medio de la secuencia A $\beta$  generándose la formación de un fragmento soluble amiloide, sAPP $\alpha$ , con propiedades neurotróficas y neuroprotectoras. En el proceso de escisión también intervienen algunas proteínas como PS1 y PS2.

La isoforma A $\beta_{42}$  es la que se agrega de forma más rápida y es la isoforma más tóxica para las neuronas, cobrando especial relevancia en la enfermedad de Alzheimer. Como lo comentado anteriormente, la inhibición de la agregación A $\beta$  es una diana crucial en el desarrollo de alternativas terapéuticas y ha sido utilizada en el desarrollo de dos análogos de curcumina con capacidad de inhibir la formación de las fibras amiloides.

El grupo metoxi-fenólico participa en la supresión de la formación de péptidos  $\beta$ -amiloides y de su precursor (APP). Su mecanismo de acción consiste en establecer interacciones hidrofóbicas.

- ◇ En el sistema nervioso central, las microglías constituyen el componente principal de las células inmunes que se activan en respuesta a lesiones cerebrales, daños o enfermedades. Como consecuencia, liberan factores neurotóxicos, es decir, citocinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF- $\alpha$ , IL6, así como, NO). La actividad anti-neuroinflamatoria se basa en la inhibición de la producción de NO, mediante la inhibición de las vías NF- $\kappa$ B y p38 MAPK en la microglía. Inhibición que proporciona neuroprotección.

Un análogo que ha demostrado tener una eficacia muy buena frenando la neuroinflamación actúa disminuyendo los niveles de NF- $\kappa$ B y BACE1 y la cascada inflamatoria en las células de pacientes con Alzheimer.

- ◇ Actividad antioxidante. El glutatión o GSH está implicado en el control de la expresión de genes, apoptosis, detoxificación de metales y grupos electrófilos...además, en la enfermedad de Alzheimer la presencia de la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) está incrementada (tiene un rol antioxidante). La expresión de HO-1 es inducida por la dopamina, el estrés oxidativo y los iones metálicos. Su continua síntesis y necesidad hace que se degenera induciendo la acumulación

de hierro y daño mitocondrial, es decir, en pacientes enfermos la cantidad tan alta de HO-1 hace que ésta actúe como un factor prooxidante.

Esto se ha empleado como diana para el diseño de análogos de curcuminas, obteniéndose un análogo cuyo mecanismo de acción reside en disminuir los niveles de HO-1.

- ◊ Inhibidores de la acetilcolinesterasa. Se están haciendo estudios in vitro donde la curcumina dio un valor de 67.69  $\mu\text{M}$  en la CI50, mientras que sus análogos dieron valores de 19.67  $\mu\text{M}$ , 16.84  $\mu\text{M}$  (6).

La actividad inhibitoria se ve incrementada en los análogos de la curcumina que cuentan con más anillos aromáticos (20).

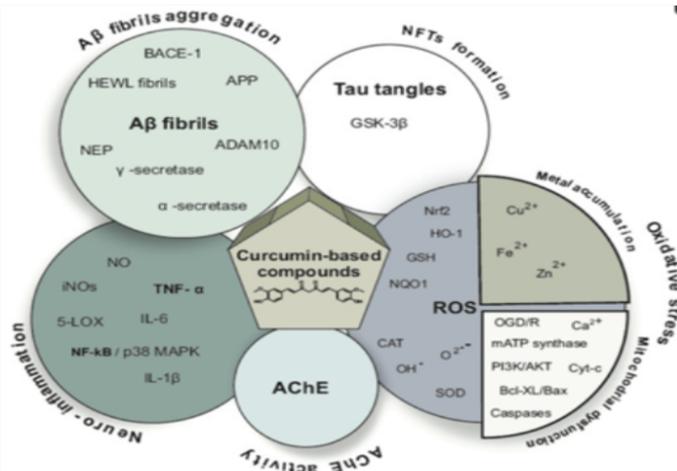


Ilustración 9. Dianas terapéuticas de análogos, derivados e híbridos de la curcumina en la EA (20).

En conclusión, la curcumina y análogos son un grupo de compuestos con actividades muy prometedoras que están siendo estudiados por estudios computacionales para aumentar su selectividad y mejorar las propiedades farmacocinéticas de los mismos. Como vemos en el gráfico, los estudios se están centrando, principalmente, en la capacidad de la curcumina y análogos de disminuir la agregación  $\beta$ -amiloide y en su actividad antioxidante.

## 6. CONCLUSIONES

En los últimos años, la hipótesis colinérgica o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con los fármacos conocidos como “un fármaco-una diana” han sido desplazados por el interés de investigar fármacos que puedan actuar en distintas dianas con elevada selectividad, es decir, fármacos multidiana.

La investigación se ha centrado en algunas dianas como acetilcolinesterasa,  $\beta$ -secretasa,  $\gamma$ -secretasa, GSK3 $\beta$ , proteína TAU y receptor colinérgico muscarínico aplicando técnicas computacionales que han permitido llegar a más posibles compuestos en menos tiempo, ahorrando coste y proporcionando una menor posibilidad de error.

Aunque el tratamiento farmacológico asociado a la enfermedad de Alzheimer ha resultado ser más paliativo que curativo, se están llevando a cabo múltiples estudios computacionales donde se están valorando moléculas que presentan un mecanismo de acción muy prometedor como posibles moléculas utilizadas, en un futuro, para curar la enfermedad de Alzheimer. Entre las moléculas que están siendo estudiadas por métodos computacionales, donde cobra especial importancia la técnica de docking molecular, destacan las curcuminas y diferentes análogos del donepezilo.

## 7.BIBLIOGRAFÍA

1. Developments with multi-target drugs for Alzheimer's disease: an overview of the current discovery approaches. Juan F. González, Andrés R. Alcántara, Antonio L. Doadrio y José María Sánchez-Montero (2019). Expert Opinion on Drug Discovery, 14:9, 879-891, DOI: 10.1080/17460441.2019.1623201.
2. Patología de la enfermedad de Alzheimer. Cinfa, HazFarma y Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Curso enMente. 2020.
3. Computer-Aided Drug Design of  $\beta$ -Secretase,  $\gamma$ -Secretase and Anti-Tau Inhibitors for the Discovery of Novel Alzheimer's Therapeutics. Varnavas D. Mouchlis, Georgia Melagraki, Lefteris C. Zacharia and Antreas Afantitis. Published: 21 January 2020. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/703>
4. Design, Synthesis, and Evaluation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Dual-Target Inhibitors against Alzheimer's Diseases. Yan Guo, Hongyu Yang, Zhongwei Huang, Sen Tian, Qihang Li, Chenxi Du, Tingkai Chen, Yang Liu, Haopeng Sun and Zongliang Liu. Publicado el 23 de enero de 2020. Disponible en: [https://apps.webofknowledge.com/full\\_record.do?product=UA&search\\_mode=GeneralSearch&qid=4&SID=D1Zdo1Ogh8Vc3mreMe1&page=1&doc=4](https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=4&SID=D1Zdo1Ogh8Vc3mreMe1&page=1&doc=4)
5. Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. Angel Agis- Torres, Monica Sölhuber, Maria Fernandez and J.M Sanchez.Montero (2014). Current Neuropharmacology, 2014, 12, 2-36.
6. Beyond the Cholinergic Hypothesis: Do Current Drugs Work in Alzheimer's Disease? Alessandro Martorana, Zaira Esposito, and Giacomo Koch. Published online 2010 Jun 18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6493875/>
7. Cannabinoid analogs in the treatment of pain. José María Sánchez-Montero (2016). ISSN (online) 1697-4298. An Real Acad Farm Vol. 82, Nº2 (2016), pp. 210-230.
8. GPR6 Structural Insights: Homology Model Construction and Docking Studies. Israa H, Isawi, Paula Morales, Noori Sotudeh, Dow P. Hurst, Diane L. Lynch and Patricia H. Reggio. Publicado el 7 de febrero de 2020. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/3/725>
9. Diseño de fármacos asistidos por ordenador. José María Sánchez-Montero.
10. Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results. José María Sánchez-Montero (2016). ISSN (online) 1697-4298. An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 2 (2016), pp. 168-184.
11. Artificial intelligence and big data facilitated targeted drug discovery. Liu, BQ (Liu, Benquan), He, HQ (He, Huiqin), Luo, HY (Luo, Hongyi), Zhang, TT (Zhang, Tingting), Jiang, JW (Jiang, Jingwei). Published: Dec 2019. DOI: 10.1136/svn-2019-000290.
12. The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design. Carlos P. Modenutti, Juan I. Blanco Capurro, Santiago Di Lella and Marcelo A. Martí. Published online 2019 Dec 3. doi: 10.3389/fchem.2019.00823 PMID: PMC6902271 PMID: 31850312.
13. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. Pedro H. M. Torres, Ana C. R. Sodero, Paula Jofily and Floriano P. Silva-Jr. Published online 2019 Sep 15. doi: 10.3390/ijms20184574
14. Mathematical Models to Shed Light on Amyloid-Beta and Tau Protein Dependent Pathologies in Alzheimer's Disease. Armin Vosoughi, Saeed Sadigh-Eteghad, Mohammad Ghorbani, Sedaghat Shahmorad, Mehdi Farhoudi, Mohammad A. Rafi and Yadollah Omid. A. Vosoughi et al. / Neuroscience 424 (2020) 45–57.

15. Molecular mechanism of intramembrane proteolysis by gamma-secretase. T. Tomita. Published 2014. Doi: 156(4):195-201.
16. GSK-3 $\beta$  Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS. Eldar-Finkelmann H, Martinez A. Front Mol. Neurosci. 2011; 4 (October): 1-18. Doi: 10.3389/fnmol.2011.00032.
17. 3D-QSAR and molecular docking studies on pyrazolopyrimidine derivatives as glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors. Dessalew N, Patel DS, Bharatam PV. J Mol Graph Model. 2007 Mar; 25(6):885-95. Epub 2006 Sep 3. DOI: 10.1016/j.jmglm.2006.08.009
18. Docking of GSK-3  $\beta$  with novel inhibitors, a target protein involved in Alzheimer's disease. Joshi, A (Joshi, Akankasha); Sharma, A (Sharma, Archit); Kumar, R (Kumar, Rajesh). Published: APR-JUN 2018. DOI: 10.21786/bbrc/11.1/13
19. Proposition of Potential GSK-3 $\beta$  Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: a Molecular Modeling Study. L Castro, Leandro; C S Picanco, Leide; V Silva, Jaderson; R Souza, Lucilene; P A Sousa, Kessia; A Pinheiro, Abraao; A Chaves, Gisele; R C Teixeira, Hueldem; M Silva, Guilherme; A Taft, Carlton. Current computer-aided drug design. Published: 2019-Oct-15. DOI:10.2174/1573409915666191015110734
20. Curcumin in Health and Diseases: Alzheimer's Disease and Curcumin Analogues, Derivatives, and Hybrids. Eirini Chainoglou and Dimitra Hadjipavlou-Litina. Published: 13 March 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21061975>
21. Muscarinic Receptors as Model Targets and Antitargets for Structure-Based Ligand Discovery. Kruse, AC; Weiss, DR; Rossi, M; Hu, JX; Hu, K; Eitel, K; Gmeiner, P; Wess, J; Kobilka, BK; Shoichet, BK. Published OCT 2013. DOI: 10.1124/mol.113.087551
22. Diseño racional, síntesis, estudios cinéticos y docking molecular de nuevos péptidos con actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa. Sanchis, Iván, Aimaretti, Florencia María, Spinelli, Roque, Siano, Álvaro Sebastián. Publicado el 18 de octubre de 2018.
23. 6CQY. Crystal Structure of Recombinant Human Acetylcholinesterase in Complex with EMPA and HI-6. DOI: 10.2210/pdb6CQY/pdb. Deposited: 2018-03-16. Released: 2018-12-05. Deposition Author(s): Bester, S.M., Guelta, M.A., Pegan, S.D., Height, J.J.
24. Design, synthesis and evaluation of new 4-arylthiazole-2-amine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. Yuan Xu, Meng Meng Jian, Chuang Han, Kan Yang, Li-gai Bai, Fei Cao, Zheng Yue Ma. Published: 15 March 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.126985>
25. De-novo Drug Design, Molecular Docking and *In-Silico* Molecular Prediction of AChE Analogues through CADD Approaches as Anti-Alzheimer's Agents. Surabhi Pandey, and B.K. Singh. Published online 2020 Feb. doi: 10.2174/1573409915666190301124210