



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 05 del mes de Diciembre del año 2018

El (la) que suscribe MC. ELENA STEPHANIE CASTRO SILVA Alumno (a) del Programa

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

con número de registro A150167 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. MARTINIANO BELLO RAMÍREZ y DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

y cede los derechos del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN In vitro E In silico DE FUCOSTEROL COO INHIBIDOR DE LA ENZIMA

ACETILCOLINESTERASA Y LA PROTEÍNA BETA AMILOIDE (BA 1-42)"

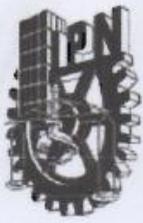
al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: pele_sd100@hotmail.com - mmo6709gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M en C. ELENA STEPHANIE CASTRO SILVA

Nombre y firma del alumno



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S. siendo las 12:00 horas del día 26 del mes de Noviembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"EVALUACIÓN *In vitro* E *In silico* DE FUCOSTEROL COMO INHIBIDOR DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA Y LA PROTEÍNA BETA AMILOIDE (BA₁₋₄₂)"

Presentada por el alumno:

CASTRO

Apellido paterno

SILVA

materno

ELENA STEPHANIE

nombre(s)

Con registro:

A	1	5	0	1	6	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

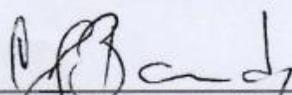
Directores de Tesis



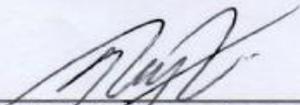
DR. MARTINIANO BELLO RAMÍREZ
Director de Tesis



DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA
2º. Director de Tesis



DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

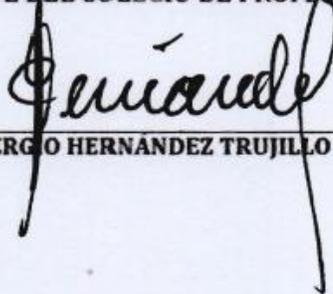


DR. JESÚS IVÁN MORILLO ÁLVAREZ



DR. JOSÉ CORREA BASURTO

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN*
SILICO DE FUCOSTEROL COMO INHIBIDOR DE LA
ENZIMA ACETILCOLINESTERASA Y LA PROTEÍNA
BETA AMILOIDE (βA_{1-42})**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

ELENA STEPHANIE }CASTRO SILVA

LA PAZ, B.C.S., 20 DE DICIEMBRE DEL 2018

Dedicatoria

“A todo aquel desdichado que le gusta la investigación y que a veces hasta con el corazón desvencijado encuentra el coraje para ser cada día mejor”

Elena Castro

Agradecimientos

A mi hijo Julián que es la razón de mi motivación.

A mi Madre Clara Silva, mi padre Miguel Castro y su esposa Chuyita, hermanas Paola y Yulissa, y mi hermano Jhonathan, porque sin la familia no se llega a ningún lado.

A mis mejores amigas Fernanda, Yazkara y Ramnces, por el aliento y apoyo incondicional en todo y siempre desde hace más de quince años; al Fernando Oliver (Don Oliverio) por cuidar y querer a mi Fer y siempre brindar su apoyo y amistad. A mis amigas desde ahora y para siempre Casandra, Gis, Angélica, Michelle, Pily por aparecer en mi vida y cambiarlo todo.

A mis perrijos Cirilo y Cuca, por ser mis compañeros nocturnos, mañaneros y vespertinos.

A mis compañeros en el Laboratorio de Química de Algas Marinas CICIMAR, M.C. Elizabeth Rodríguez, M.C. Dora Arvizu, Dr. Gustavo Carmona; M.C. Araceli, Miguel, Ana, Dania, Pepe, y Gaby por ayudarme en el laboratorio y su grata compañía.

A mis compañeros de laboratorio de la ESM-IPN: Dra. Martha, Dra. Marlet, Dra. Brenda, Dra. MaryCarmen, Yudibeth, Lety, Samuel, David, Alberto, Berenice, Edgar, Oscar, Anita, Gely y Selene que, gracias a su apoyo, buena vibra, amistad y ratos de comedera tan agradables jamás hubiera sido tan deliciosa esta etapa.

A mi comité tutorial: Dr. Iván Murillo, Dr. José Correa, Dr. Martiniano Bello, Dr. Mauricio Muñoz, Dra. Christine Band por su paciencia, apoyo y guía incondicional. Al Centro Interdisciplinario en Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) por prestar sus instalaciones para llevar a cabo todo el proceso de experimentación, así también a la Escuela Superior de Medicina y los proyectos CONACYT CB-254600 , APN-782 e INSIGNIA-IPN 2015. A sistemas de becas de posgrado de CONACYT, beca BEIFI y proyectos SIP por proporcionar los fondos de donde se deriva el presente trabajo.

Y por supuesto a todos aquellos que han creído en mí.

Índice

	Página
Índice de imagenes.....	ii
Índice de gráficas.....	v
Índice de tablas.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
1.Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1. Algas marinas como fuente de compuestos inhibidores de acetilcolinesterasa.....	4
2.2. Proteína beta amiloide (βA_{1-42}).....	9
2.3. Uso del acoplamiento y dinámica molecular en la búsqueda de compuestos de origen marino cómo inhibidores.....	16
3. Justificación.....	27
3.1. Hipótesis.....	28
4. Objetivo general.....	28
4.1.Objetivos particulares.....	28
5. Material y método.....	29
5.1.Determinación de la inhibición de la acetilcolinesterasa.....	29
5.1.1. Análisis de microplaca (96 posos).....	29
5.2. Fraccionamiento, purificación y caracterización del fucosterol	30

5.3 Cinética enzimática de AChE.....	31
5.4. Acoplamiento molecular (docking) con acetilcolinesterasa.....	32
5.5. Dinámica molecular con la enzima acetilcolinesterasa.....	32
5.5.1 Simulaciones de Dinámica Molecular (DM) y Cálculos de Energía Libre de Unión.....	32
5.5.2. Cálculo de energías libres de enlace absoluto y contribuciones por residuo.....	34
5.6. Análisis estadístico.....	34
5.7. Valoración del compuesto fucosterol como inhibidor de la agregación del βA_{1-42}	34
5.8. Fluorescencia con tioflavina (ThT).....	34
5.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	35
5.10. Microscopia de fuerza atómica.....	35
5.11. Acoplamiento molecular con beta amiloide ($A\beta_{1-42}$).....	35
6. Resultados.....	36
6.1. Determinación de la inhibición de la acetilcolinesterasa por técnicas colorimétricas y cromatografía de placa fina (TLC).....	36
6.2. Caracterización del fucosterol.....	37
6.3 Cinética enzimática.....	39
6.4 Acoplamiento molecular de acetilcolinesterasa, fucosterol y neostigmina.....	41
6.5. Modelado molecular con acetilcolinesterasa: Equilibrio de los complejos de hAChE-ligando.....	43

6.6. Análisis estructural de los complejos de hAChE-ligando.....	44
6.7. Cálculos de energía libre de enlace en hAChE.....	46
6.8. Acoplamiento molecular de beta amiloide, galantamina y fucosterol.....	47
6.9. Microscopia de fuerza atómica (MFA).....	54
6.10. Fluorescencia con tioflavina (ThT).....	56
6.11. Electroforesis de fucosterol con βA_{1-42}	57
7. Discusión.....	58
7.1. Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.....	58
7.2. Inhibición de la proteína beta amiloide.....	65
8. Conclusiones y sugerencias.....	68
9. Bibliografía.....	69

Índice de imágenes

	Página
Figura 1. Las 3 características principales de EA dentro del sistema neuronal. A representa un corte de PPA con formación y acumulación extraneuronal de β A. B establece la formación y depósito de NFT intraneuronales y en C se observa la disfunción sináptica debida a la acumulación de β A y su interacción con los receptores. Reproducido de Eterghat y colaboradores (2015).....	11
Figura 2. Ilustración esquemática de la patogénesis por beta amiloide y sus agregados. El extracto butanólico de <i>E. cava</i> inhibe la síntesis de β A a través de la inhibición de BACE reduciendo la oligomerización del β A y posterior fibrilización. Reproducido de Kang y colaboradores (2011).....	13
Figura 3. Estructura del compuesto fenólico marino (La).....	20
Figura 4. A, B y C dan los RMSD de los compuestos fenólicos La, La_ion1 y La_ion2 en relación con ALR2. La y La_ion2 tienen relativamente las curvas suaves, sus valores medios de RMSD son 1.7 y 3.0 Å. Actualmente, considerando que el propio ALR2 tiene un valor de 2.0Å.....	20
Figura 5. Diagrama de flujo del procedimiento de acoplamiento.....	21
Figura 6. Se pueden observar los modelos de acoplamiento de la inhibición de AR por fucosterol. (A) Inhibición de RLAR; (B) inhibición de HRAR; El fucosterol contiene un grupo 3 β -hidroxilo hidrofóbico que interactúa con los residuos Tyr49 y His11, así como con los residuos de aminoácidos adicionales Trp21, Trp112, Phe123 y Trp220	

respectivamente.....	24
Figura 7. Estructura del Dieckol.....	24
Figura 8. Modelos de acoplamiento molecular del complejo BACE1- Phlorotaninos; dónde eckol (A); Florofurofucoeckol-A (B); Dieckol (C) fueron los más activos. El análisis se realizó mediante AUTODOCK 4.0 (rosa) y FRED 2.0 (azul). Las porciones amarillas indican las posiciones de la hendidura o bolsillo entre los dos dominios BACE1. Reproducido de Jung et al (2010).....	26
Figura 9. Interacción de dolabelladienotriol (THD; color naranja) obtenido a partir del genero <i>Dictyota</i> . Los análisis se realizaron en la reversa transcriptasa mutada del VIH-1 RT3 (A) y RT4 (B). Los aminoácidos en azul son los que muestran mayor interacción. Reproducido de Miceli et al, (2013).....	26
Figura 10. Estructura 2D del fucosterol.....	38
Figura 11. Espectro de ¹ H-NMR de fucosterol.....	38
Figura 12. Espectro ¹³ C-NMR de fucosterol.....	39
Figura 13. Complejos de acoplamiento y mapa de interacciones entre AChE y fucosterol y neostigmina. Los enlaces de hidrógeno son flechas cargadas con residuos negativos (rojo), cargado positivo (azul), polar (magenta), hidrófobo (verde) y glicina (gris). Las figuras se realizaron con Maestro Schrödinger versión 10.5.....	42
Figura 14. Propiedades de equilibrio de los sistemas AChE-fucosterol y AChE-neostigmina a través de simulaciones DM. A) RMSD y B) Radio de	

giro para AChE-fucoesterol (negro) y AChE-neostigmina (rojo)..... 43

Figura 15. Mapa de interacciones para los sistemas AChE-fucoesterol y AChE-neostigmina. Los primeros y más poblados complejos AChE-fucoesterol (panel A y B) y AChE-neostigmina (panel C y D) derivados de un análisis de agrupación se utilizaron para obtener el mapa de interacciones..... 45

Figura 16. Se observa la Sub-unidad A de 1z0q (azul) y fucoesterol (rosa). Los residuos de interacción fueron histidina (HIS14) y Leucina (LEU34) con una energía de unión de -6.52 y K_i de 16.49 μ M 49

Figura 17. Se muestra la subunidad A de 1z0q (azul) y galantamina (naranja). Los residuos de interacción donde se observaron puentes de hidrógeno con glutamato (GLU3), fenilalanina (PHE4) y arginina (ARG5); interacciones hidrófobas con aspartato (ASP1), alanina (ALA2), serina (SER8), valina (VAL12); la energía de unión fue de -6.03 kcal / mol y k_i de 37.76 μ M..... 49

Figura 18. Muestra las subunidades A, B, C, D y E de 2beg (azul) y fucoesterol (rosa). Los residuos de interacción fueron metionina (MET35), valina (VAL36) y glicina (GLY37) para las subunidades B, C, D y E. Para las subunidad A, solo se mostró la interacción con (GLY37) y para la subunidad C también con la valina (VAL39). La energía de enlace fue -8.4 y K_i de 697.17 μ M..... 50

Figura 19. Muestra las subunidades A-E de la estructura beta amiloide 2beg (azul) y galantamina (naranja). El residuo de interacción con

el que se observó enlace hidrógeno fue la valina (VAL39) en la subunidad E, así como las interacciones con leucina (LEU17) y fenilalanina (PHE19); también interacciones con leucina (LEU17), fenilalanina (PHE19) y valina (VAL37) en la subunidad D. La energía de unión fue de -6.05 kcal / mol y ki 36.28 uM..... 50

Figura 20. Muestra las subunidades A-L de la estructura beta amiloide 2mxu (azul) y fucosterol (rosa). Los residuos de interacción fueron valina (VAL12) e isoleucina (ILE32) para la subunidad A; leucina (LEU17), isoleucina (ILE32) y glicina (GLY33) para la subunidad B; histidina (HIS14), leucina (LEU17, 34), isoleucina (ILE32) y glicina (GLY33) para la subunidad C; histidina (HIS14) y glicina (GLY33) para la subunidad D. La energía de enlace fue de -9.49 y Ki de 110.45 uM..... 51

Figura 21. Muestra las subunidades A-L de la estructura beta amiloide 2mxu (azul) y galantamina (naranja). Los residuos de interacción fueron valina (VAL12), isoleucina (ILE32), glicina (GLY33), leucina (LEU34) para la subunidad A; histidina (HIS14), isoleucina (ILE32), glicina (GLY33) y leucina (LEU34) para la subunidad B; isoleucina (ILE32) y glicina (GLY33) para la subunidad C. La energía de unión de galantamina fue de -6.57 kcal / mol y 15.24 uM..... 51

Figura 22. Muestra las subunidades A-F de la estructura beta amiloide 2nao (azul) y fucosterol (rosa). Los residuos de interacción fueron tirosina (TYR10), histidina (HIS13) y lisina (LIS16) para la subunidad A; tirosina (TYR10), valina (VAL12), histidina (HIS13), histidina (HIS14), lisina

(LYS16) y alanina (ALA21) para la subunidad B; alanina (ALA21) para la subunidad C. La energía de enlace fue de -7.82 y Ki de 1.87 uM..... 52

Figura 23. Muestra las subunidades A-F de la estructura beta amiloide 2nao (azul) y galantamina (naranja). Se observaron puentes de hidrógeno con valina (VAL12) en la subunidad D y con glutámico (GLU11) y valina (VAL12) con la subunidad E. También interacciones hidrófobas con tirosina (TYR10) en la subunidad D, histidina (HIS6, HIS13) y tirosina (TYR10) con la subunidad E; interacción con histidina (HIS6), glicina (GLY9) y valina (VAL12) en la subunidad F. Esta interacción refleja una energía de enlace de -7.71 kcal / mol y ki 2.24 uM..... 52

Figura 24. Muestra las subunidades A-R de la estructura amiloide beta 5kk3 (azul) y fucosterol (rosa). Los residuos de interacción fueron histidina (HIS13) para la subunidad D; glicina (GLY38) y valina (VAL39) para la subunidad J; glicina (GLY38), valina (VAL39) y valina (VAL40) para las subunidades K, L, M; glicina (GLY38) y valina (VAL40) para la subunidad N. La energía de enlace para eso fue de -8.11 kcal / mol y ki de 1.13 uM..... 53

Figura 25. Muestra las subunidades A-R de la estructura beta amiloide 5kk3 (azul) y galantamina (naranja). Se observaron puentes de hidrógeno con valina (VAL18) y alanina (ALA21) para la subunidad L; valina (VAL18), fenilalanina (PHE19), alanina (ALA21) y glutámico (GLU22) para la subunidad M; valina (VAL18), fenilalanina (PHE20), alanina (ALA21) y glutámico (GLU22) para la subunidad N. Finalmente glutámico

(GLU22) en la subunidad O. Estas interacciones reflejan una energía de enlace de -6.82 kcal / mol y k_i 10.1 μ M..... 53

Figura 26. En la figura se muestran las imágenes de MFA. La letra A es $A\beta_{1-42}$ después de la incubación de 37° C, en B se observa $A\beta_{1-42}$ y fucosterol (50 μ M), en C $A\beta_{1-42}$ y fucosterol (100 μ M) y D es $A\beta_{1-42}$ y galantamina (100 μ M)..... 55

Figura 27. Se muestra la electroforesis realizada con $A\beta_{1-42}$, fucosterol y galantamina. Donde 0) Azul de comasie, 1) es $A\beta_{1-42}$, 2) $A\beta_{1-42}+$ GAL, 3) $A\beta_{1-42}+$ F (50 μ M) y 4) $A\beta_{1-42}+$ F (100 μ M)..... 57

Indice de gráficas

Página

Grafica 1. En el eje de las equis se muestran las concentraciones 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1562 y 0.07 mg/mL probadas de *S. horridum*, *Gelidium sp.*, *Padina sp.* y fucosterol. En el eje ye se encuentra el porcentaje de inhibición de cada concentración..... 37

Grafica 2. La grafica muestra la V_{max} y K_m de fucosterol y neostigmina con hAChE. El simbolo \diamond representa a hAChE, el Δ es hAChE y fucosterol a 0.004 μ M de concentración; \square hAChE y neostigmina a 0.14 μ M; el simbolo x representa hAChE y fucosterol a 0.006 μ M de concentracion mientras que \circ AChE y fucosterol a 0.008 μ M de concentración..... 40

Gráfica 3. En la gráfica se observa el tiempo de recorrido en el

proceso de fibrilación (0, 1, 3, 24 h), obtenido a emisión de 480 nm en el espectro de fluorescencia. La línea azul representa a A β ₁₋₄₂ (rombos-AB), línea roja a A β ₁₋₄₂ y fucosterol (50 μ M; cuadrado-AB-C1), línea verde a A β ₁₋₄₂ y fucosterol (100 μ M; triánguloAB-C2) y línea morada A β ₁₋₄₂ y galantamina (100 μ M, cruz-AB-GAL)..... 56

Indice de tablas

Página

Tabla I. Concentración inhibitoria media (IC ₅₀) de extractos y compuestos obtenidos de algas marinas hacia la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Reproducido de Pangestuti y Kim (2011).....	8
Tabla II. Efecto del fucosterol y neostigmina en hAChE.....	40
Tabla III. Componentes de energía libre (en unidades de kcal/mol) para el complejo AChE-inhibidor usando el enfoque GB. F representa el fucosterol y N neostigmina	47

Resumen

Se evaluó la actividad *in vitro* e *in silico* del fucosterol obtenido del alga parda *Sargassum horridum* como potencial inhibidor de la acetilcolinesterasa humana (hAChE) y la proteína beta amiloide (βA_{1-42}). En los análisis de cinética enzimática el gráfico de Lineweaver-Burk mostró la naturaleza de inhibición no competitiva del fucosterol, siendo la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_m) estimadas. Con la concentración de fucosterol de $0.006 \mu M$ se obtuvo una $V_{max} = 0.015 \text{ } 1 \text{ } V_o \text{ } (\Delta A / h)$ y $K_m = 6.399 \text{ } 1 / [ACh] \text{ } mM^{-1}$, mientras que para neostigmina ($0.14 \mu M$) se obtuvieron la $V_{max} = 0.022 \text{ } 1 / V_o \text{ } (\Delta A / h)$ y $K_m = 6.726 \text{ } 1 / [ACh] \text{ } mM^{-1}$. Estos resultados mostraron una inhibición más efectiva por parte de fucosterol respecto a la neostigmina. El análisis de acoplamiento molecular reveló que la neostigmina alcanza sitios de unión diferentes en la hAChE, mientras que el fucosterol puede actuar como un inhibidor de la acetilcolinesterasa no competitivo y competitivo de acuerdo con los experimentos enzimáticos cinéticos. En los análisis de βA_{1-42} se determinó la potencialidad del fucosterol y galantamina por la técnica de tioflavina (ThT), microscopia de fuerza atómica (MFA) y electroforesis. La evaluación con ThT mostró efectividad del fucosterol (50 y $100 \mu M$) para inhibir la formación de fibrillas favoreciendo la formación de monómeros y sugiriendo que es mejor para evitar la oligomerización de βA_{1-42} . En los análisis de acoplamiento molecular el fucosterol y galantamina tuvieron un comportamiento similar con dos estructuras 3D (PDB 2beg y 2mxu) del βA_{1-42} . Los análisis de electroforesis no fueron concluyentes.

Abstract

The *in vitro* and *in silico* activity of fucosterol obtained from the brown alga *Sargassum horridum* was evaluated as a potential inhibitor of human acetylcholinesterase (hAChE) and amyloid beta protein (β A1-42). In the analysis of enzymatic kinetics, the Lineweaver-Burk graph showed the non-competitive inhibition nature of fucosterol, with the maximum speed (V_{max}) and the Michaelis-Menten constant (K_m) estimated. With the fucosterol concentration of 0.006 μ M, $V_{max} = 0.015 \text{ } 1 \text{ } V_o \text{ } (\Delta A / h)$ and $K_m = 6.399 \text{ } 1 / [ACh] \text{ } mM^{-1}$ were obtained, while for neostigmine (0.14 μ M) the $V_{max} = 0.022 \text{ } 1 / V_o \text{ } (\Delta A / h)$ and $K_m = 6.726 \text{ } 1 / [ACh] \text{ } mM^{-1}$. These results showed a more effective inhibition by fucosterol with respect to neostigmine. Molecular coupling analysis revealed that neostigmine reaches different binding sites in the hAChE, while fucosterol can act as an uncompetitive and competitive acetylcholinesterase inhibitor according to kinetic enzyme experiments. In the analysis of β A1-42, the potentiality of fucosterol and galantamine was determined by the thioflavin (ThT) technique, atomic force microscopy (MFA) and electrophoresis. The evaluation with ThT showed effectiveness of fucosterol (50 and 100 μ M) to inhibit the formation of fibrils favoring the formation of monomers and suggesting that it is better to avoid the oligomerization of β A1-42. In molecular coupling analyzes, fucosterol and galantamine had a similar behavior with two 3D structures (PDB 2beg and 2mxu) of β A1-42. The electrophoresis analyzes were not conclusive.

1. Introducción.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que causa deterioro en las funciones del sistema nervioso central afectando la memoria, generando problemas emocionales y cambios de personalidad. Aunque un pequeño porcentaje de casos de EA implican mutaciones en genes conocidos, la gran mayoría ocurren esporádicamente con etiología desconocida. Por lo tanto, ha sido necesario buscar los mecanismos responsables del deterioro cognitivo observando a pacientes con esta afección y su avance progresivo. El comportamiento del deterioro mostrado en pacientes con EA se atribuye en gran medida a la acumulación, conformación, estructura cuaternaria y morfología del péptido beta la amiloide (β A); dicha acumulación y deposición de β A ha sido implicada en la disfunción y pérdida neuronal que subyace a las manifestaciones clínicas, sin embargo, el daño sináptico observado antes de la formación de la placa amiloide se relaciona con el efecto neurotóxico de los oligómeros del beta amiloide (Castro y Martínez, 2001; Dinamarca et al, 2008; Dinamarca et al, 2010; Roleau et al, 2011).

Una de las varias proteínas asociadas con depósitos de placa amiloide es la enzima acetilcolinesterasa (AChE); dicha enzima está predominantemente ligada al núcleo amiloide de placas seniles maduras, depósitos difusos preamiloides, y vasos sanguíneos cerebrales en pacientes con cuadros clínicos de EA. La AChE ha sido descrita en procesos colinérgicos y no colinérgicos tanto en el sistema nervioso central y periférico. La enzima se secreta y se asocia con estructuras extracelulares, la lámina basal sináptica, en zona neuromuscular y, como se mencionó anteriormente, las placas amiloideas del cerebro (Dinamarca et al, 2008).

La acetilcolinesterasa (AChE) es una hidrolasa (EC. 3.1.1.7) que se localiza regularmente en el sistema nervioso, los músculos y es responsable de regular la concentración de acetilcolina (ACh). Adicionalmente a su función colinérgica convencional, la AChE participa en procesos de desarrollo y su secuencia contiene un dominio que se presenta en proteínas de adhesión celular como la glutactina, la neurotactina, la gliotactina y las neuroliginas (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008; Castellanos-Castillo, 2014).

Dependiendo de su edición alternativa en el extremo 3' de los transcritos y de modificaciones post traduccionales se originan tres variantes de la AChE; Una de ellas es la AChE-R que se expresa como monómeros en condiciones de estrés y neuropatológicas; la AChE-E como dímeros anfifílicos que están presentes en eritrocitos y la AChE-T se localiza principalmente en las sinapsis, en formas globulares como asimétricas (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008). Por lo tanto, los cambios en su concentración o propiedades están relacionadas con algunas neuropatologías (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008; Suganthy et. al., 2010).

Una estrategia prometedora para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el alzheimer, ha sido la utilización de inhibidores de la AChE con el fin de aumentar los niveles de acetilcolina en la sinapsis, mejorando de este modo la actividad colinérgica en las regiones afectadas del cerebro (Suganthy et. al., 2010; Pangestuti y Kim, 2011). Recientemente se ha determinado que la AChE se une a través de su sitio periférico a la forma no amiloidogénica de la proteína β -amiloide y a su vez actúa como una proteína chaperona e induce un cambio conformacional a la forma amiloidogénica con la posterior formación de fibrilla amiloide. Así mismo, se ha demostrado que las moléculas que pueden interactuar con el sitio activo y periférico de AChE (actividad inhibidora) podrían evitar la agregación de beta amiloide, por lo cual, los inhibidores con doble unión a AChE representan una nueva opción estratégica terapéutica (Eteghad et al, 2015).

Varios estudios muestran que las algas marinas poseen propiedades neuroprotectoras inclusive se observa la actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa a partir de extractos algales (Suganthy et. al., 2010; Pangestuti y Kim, 2011); así mismo, se ha reportado que las tres clases principales de macroalgas: Chlorophyceae, Rhodophyceae y Phaeophyceae producen una diversidad de compuestos como alcaloides, terpenos, polisacáridos, florotaninos y esteroides con propiedades anticolinesterásicas (Jung et al, 2013a,b; Mucchielli y Saint-Lebe, 1976). Los esteroides son extremadamente diversos y abundantes en las macroalgas, y se pueden biosintetizar vía mevalonato o rutas de 1-desoxifilulosa 5-fosfato / 2-C-metileritritol 4-fosfato. Estos compuestos se encuentran en forma libre, esterificados con ácidos grasos o conjugados con carbohidratos (glicosilados) (Barbosa et al,

2014). De acuerdo con Andrade et al (2013), se ha descubierto que las Phaeophytas son una fuente de esteroides con actividad anti-colinesterasa, debido a la gran cantidad de fucosterol presente en *Cystoseira usneoides* y en el género *Sargassum* sp. Los fitoesteroides son compuestos bioactivos ha demostrado que el consumo de esteroides vegetales puede ayudar a disminuir el nivel de colesterol en la sangre (Boulom et al, 2014).

El fucosterol es un compuesto predominante en las algas pardas, su concentración varía entre el 83 a 97% del contenido total de esteroides (Jung et al, 2016). Además, el fucosterol aislado de diferentes especies de algas pardas ha demostrado ser anticancerígeno, reductor del colesterol, antidiabético, antioxidante, antiadipogénico, antifúngico, antihistamínico, anticolinérgico, antileishmaniasis, antiinflamatorio, antiosteoporótico, anti-depredadores y selectivo con la butirilcolinesterasa (Adel et al, 2015; Abdul et al, 2016; Becerra et al, 2015; Boulom et al, 2014; Cho et al, 2008; Jung et al, 2013 a,b; Khanavi et al, 2012; Kumar et al, 2009; Mucchielli et al, 1976; Saeidniaa et al, 2012; Yoon et al, 2008).

En este estudio, se aisló el fucosterol de *Sargassum horridum* de Baja California Sur, México. Se analizó la actividad anti-acetilcolinesterasa del fucosterol tanto *in vitro* como *in silico* evaluando las propiedades de unión molecular sobre AChE en comparación con las propiedades de la neostigmina mediante la combinación de simulaciones de acoplamiento y dinámica molecular (DM). Así mismo se realizó el acoplamiento molecular del fucosterol con la proteína beta amiloide (βA_{1-42}), para observar los distintos mecanismos que llevaron a una visión estructural y diferencias de la actividad inhibidora en comparación con galantamina.

2. Antecedentes.

2.1. Algas marinas como fuente de compuestos inhibidores de acetilcolinesterasa.

La enzima acetilcolinesterasa ha sido estudiada intensamente desde que se extrajo en 1938 a partir de tejido de anguila eléctrica y en la década de 1940 se realizó su purificación en centenares de ocasiones. Sin embargo, las cantidades de proteína pura disponible aun no era suficiente para realizar los estudios cinéticos, el análisis de los grupos moleculares en el sitio activo y otros estudios afines permitió un mejor entendimiento de la estructura y así como de sus propiedades. No obstante, los avances de la química macromolecular en la última década, sobre todo la posibilidad de explorar las estructuras tridimensionales, hizo evidente la conveniencia de obtener la enzima en cantidades suficientemente grandes para la realización de dichos estudios (Leuzinger et al, 1967; De la Mora- Lugo y Rudiño-Piñera, 2008).

Así la cristalografía y el modelado molecular han hecho su aportación en el descubrimiento de las estructuras y componentes de la enzima (De la Mora- Lugo y Rudiño-Piñera, 2008). De igual manera, estudios estructurales han revelado los mecanismos de acción que contienen algunos inhibidores de la misma. Sin embargo, los compuestos inhibidores de acetilcolinesterasa han sido utilizados por el hombre desde tiempos inmemoriales; en África del Oeste se utilizaba el extracto de la nuez de Eseré *Physostigma venenosum* (haba de calabaz) como veneno en actos de brujería sin conocer que el compuesto principal causante de los efectos era la fisostigmina, la cual fue aislada posteriormente en 1864 y utilizada para el tratamiento del Glaucoma en 1877 (Cálix-Peralta, 1989).

El primer compuesto organofosforado fue sintetizado en 1854, sin embargo, no fue sino hasta 1932 en que se inicia la búsqueda de más compuestos de este tipo y su aplicación como pesticidas, el paratión fue sintetizado en 1944 siendo el compuesto de su clase más utilizado en la industria agrícola. Por su parte, los carbamatos se sintetizaron a partir de 1950, siendo el propoxur el más relevante. Desde entonces su uso se ha extendido para fines terapéuticos (fisostigmina,

neostigmina) y como pesticidas (organofosforados y carbamatos). En cuanto a carbamatos y organofosforados, se ha presenciado la aparición de intoxicaciones por vía iatrogénica, laboral, accidental, con fines de suicidio u homicidio; ya sea en forma aislada o grupal, los pesticidas son los compuestos más frecuentemente envueltos en intoxicaciones humanas (Cálix-Peralta, 1989).

Por otro lado, también se tienen compuestos como la tacrina que es un inhibidor de la acetilcolinesterasa utilizado comercialmente, que puede tener una unión de ligando pequeño con cadenas laterales aromáticas, incluyendo los aminoácidos Trp-84, Tyr-121, Trp-279, Phe-290, Phe-330, Phe 331, Tyr-334, y Trp-432; así mismo la acetilcolina hace unión (muelles) con tacrina en la orientación específica entre los aminoácidos Trp-84 y Phe-330. Estos datos se obtuvieron en Stanford Synchrotron Laboratory (SSRL) a línea de luz 9-1 y 100 K usando cristales de crio-enfriado (Bencharit et al., 2003).

No obstante, la tacrina tiene varios efectos secundarios como náuseas, vómitos, diarrea, disepsia, anorexia y mialgia; también tiene una vida media plasmática corta (de 2 a 4 horas) por lo que es necesario la administración de cuatro dosis diarias, representando un problema para el paciente cuando no dispone de cuidador; así como este, muchos otros fármacos tienen efectos secundarios, es por esta razón que se ha iniciado la búsqueda de nuevos compuestos que ayuden a disminuir o prevenir el Alzheimer (René y Estela, 2000). En las últimas décadas, las algas marinas han recibido una gran atención pues son reconocidas como fuentes ricas de compuestos biológicamente activos, estructuralmente diversos y con un gran potencial farmacéutico y biomédico (Pangestuti y Kim, 2011; Trigui et al. 2013).

Diversas investigaciones han revelado que los compuestos provenientes de algas exhiben actividades biológicas como anticoagulantes, anti-virales, antioxidantes, anti-alérgicos, anti-cancerígenos, anti-inflamatorios, contra la obesidad y neuroprotectoras, entre otras (Pangestuti y Kim, 2011). Los extractos algales y sus metabolitos secundarios pueden contener ácidos grasos poli-insaturados y monoinsaturados, compuestos fenólicos, terpenoides, polisacáridos, alcaloides, pigmentos, esteroides, entre otros los cuales ofrecen una ventana de oportunidad para la investigación detallada de sus posibles actividades biológicas (Pangestuti y Kim,

2011; Trigui et al. 2013; Barbosa et al., 2014). Así mismo, una extracción estratégica de metabolitos secundarios aumenta el potencial para el descubrimiento de nuevos compuestos y con una actividad biológica específica (Trigui et al. 2013).

Por ejemplo, se ha encontrado que los extractos metanólicos de las tres clases principales de macroalgas tienen gran potencial inhibitorio sobre la acetilcolinesterasa como se puede observar en la tabla I (Pangestuti y Kim, 2011). Entre varias clases de polifenoles, los phlorotaninos son compuestos farmacológicamente prominentes. Ellos se componen de varias unidades de phloroglucinol (1, 3, 5-trihidroxibenceno), unidos entre sí y de acuerdo con la naturaleza de los vínculos estructurales entre unidades phloroglucinol y el número de grupos hidroxilo presentes, estos compuestos pueden subdividirse en seis grupos específicos: phlorethols, fuhalols, fucols, fucophlorethols, eckols y carmalols. La distribución de phlorotaninos se limita a las algas pardas y su concentración puede variar entre las especies; la composición estructural de los phlorotaninos cambia con el tamaño de las algas, edad (etapa reproductiva), tipo de tejido y los factores ambientales como salinidad, estacionalidad, concentración de nutrientes, intensidad luminosa, la intensidad de herbivoría y la temperatura del agua (Barbosa et al., 2014).

Myung y colaboradores (2005) evaluaron los phlorotaninos dieckol y phlorofucofuroeckol extraídos del alga parda *Ecklonia cava*; dichas moléculas fueron probadas en un modelo animal para inhibir la AChE buscando incrementar los principales neurotransmisores, en particular la acetilcolina. Así mismo, hay otras algas pardas que presentan phlorotaninos inhibidores de la AChE como *Ishige okamurae*, *Ecklonia stolonifera* y *Ecklonia maxima* (Pangestuti y Kim, 2011; Kannan et al, 2013; Barbosa et al., 2014).

Los alcaloides se clasifican en cuatro grupos: los derivados de la 2-feniletilamina, el indol, el indol halogenado y la 2,7-naftiridina. Los alcaloides halogenados solo se encuentran en las macroalgas, siendo las estructuras moleculares que contienen bromo y cloro particularmente dominantes en las Chlorophytas; la mayoría de los alcaloides del grupo de indol se presentan en Rhodophytas (Barbosa et al., 2014). Recientemente, se extrajo del alga verde

Caulerpa racemosa los alcaloides racemosin A y racemosin B; el racemosin A posee un esqueleto indol [3, 2- α] carbazol con dos unidades de indolinenona conjugados con propenoato de metilo (Liu et al., 2013; Barbosa et al., 2014).

El racemosin B es su derivado ciclado. Ambos alcaloides se evaluaron *in vitro* para la actividad neuroprotectora contra el daño celular A β -SH-SY5Y inducido. Los dos compuestos mostraron un cierto grado de neuroprotección, siendo el racemosin A el agente más potente, lo que sugiere que este alcaloide en particular puede ser responsable de la modulación de los procesos importantes que intervienen en la neurodegeneración (Liu et al., 2013; Barbosa et al., 2014).

Los terpenos son una de las principales clases de metabolitos producidos por algas marinas. Químicamente, se derivan del isopentenil pirofosfato (IPP) una molécula de cinco carbonos (C5) y se clasifican en hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) y politerpenos. Choi y colaboradores (2007) mencionan aislaron dos meroterpenos: el ácido sargaquinoico y el sargachomenol de *Sargassum sagamianum*. Ambos compuestos mostraron actividad inhibidora moderada contra la AChE; sin embargo, el ácido sargaquinoico fue particularmente potente contra la butirilcolinesterasa (BuChE). Así mismo de la misma alga se han extraído derivados de la farnesilacetona que han presentado actividad moderada contra la AChE y la BuChE (Choi et al., 2007; Barbosa et al., 2014).

Otros metabolitos de interés farmacéutico de las macroalgas son los carotenoides; algunos de estos pigmentos de las macroalgas que además de sus efectos fotosintéticos y pigmentación, presentan numerosas propiedades beneficiosas para la salud humana. Estos compuestos se derivan de unidades de isopreno enzimáticamente polimerizados para formar estructuras regulares, altamente conjugados (tetraterpenos). Los carotenoides incluyen los hidrocarburos no polares, los carotenos y las xantofilas; la fucoxantina es una xantofila con una estructura única, que incluye un enlace alénico y un 5,6-monoepóxido. La fucoxantina posee numerosas actividades biológicas, incluyendo antioxidante, antitumoral, anti-inflamatorio, anti-obesidad, anti-angiogénicos, entre otros (Ikeda et al., 2003).

Ikedá y colaboradores (2003) estudiaron el efecto de la fucoxantina aislado del alga *Undaria pinnatifida* sobre la muerte celular neuronal en condiciones isquémicas. Ellos mostraron que la fucoxantina fue capaz de atenuar el daño celular en neuronas corticales en condiciones de hipoxia y reoxigenación. Las propiedades biológicas notables de la fucoxantina, se basan en su estructura molecular. La presencia del enlace alénico y los átomos de oxígeno intramoleculares pueden correlacionarse con la actividad antioxidante. Así también se han evaluado los efectos citoprotectores de la fucoxantina aislado de *Sargassum siliquastrum* la cual inhibe eficazmente la formación de especies reactivas de oxígeno a nivel intracelular, el daño del ADN y la apoptosis inducida por H₂O₂ (Heo et al, 2008).

Tabla I. Concentración inhibitoria media (IC₅₀) de extractos y compuestos obtenidos de algas marinas hacia la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Reproducido de Pangestuti y Kim (2011).

Alga	Extracto/compuesto	IC ₅₀
Chlorophyta		
<i>Caulerpa racemosa</i>	MeOH	5.5 mg mL ⁻¹
<i>Codium capitatum</i>	MeOH	7.8 mg mL ⁻¹
<i>Ulva fasciata</i>	MeOH	4.8 mg mL ⁻¹
<i>Ulva reticulata</i>	MeOH	10 mg mL ⁻¹
<i>Halimeda cuneata</i>	MeOH	5.7 mg mL ⁻¹
Rhodophyta		
<i>Amphiora ephedraea</i>	MeOH	5.1 mg mL ⁻¹
<i>Amphiora bowerbankii</i>	MeOH	5.3 mg mL ⁻¹
<i>Gracilaria edulis</i>	MeOH	3 mg mL ⁻¹
<i>Hypnea valentiae</i>	MeOH	2.6 mg mL ⁻¹
Phaeophyta		
<i>Dictyota humifusa</i>	MeOH	4.8 mg mL ⁻¹
<i>Padina gymnospora</i>	MeOH	3.5 mg mL ⁻¹
<i>Ecklonia stolonifera</i>	EtOH	108.11 µg mL ⁻¹
<i>Ecklonia stolonifera</i>	24-hidroperoxi-24-vinilcolesterol	389.1 µM
<i>Ecklonia stolonifera</i>	Eckstolonol	42.66 µM
<i>Ecklonia stolonifera</i>	Eckol	20.56 µM
<i>Ecklonia stolonifera</i>	Phlorofucofluoroeckol-A	4.89 µM
<i>Ecklonia stolonifera</i>	Dieckol	17.11 µM
<i>Ecklonia stolonifera</i>	2-phloroockol	38.13 µM
<i>Ecklonia stolonifera</i>	7-phloroockol	21.11 µM
<i>Ishige okamurae</i>	MeOH	163.07 µM
<i>Ishige okamurae</i>	EtOAc	137.25 µM

2.2 Proteína beta amiloide (βA_{1-42}).

El conocimiento sobre las placas beta amiloide data desde el siglo XIX, cuando los padres de la patología moderna Rudolf Virchow (1821-1902) y Carl F. Rokitansky (1804-1878) observaron en autopsias un proceso infiltrativo producido por una sustancia amorfa que denominaron proceso de degeneración lardácea, (del latín, Laridum). Al conservar los órganos afectados en yodo, notaron que dichos depósitos adquirirían una coloración azul semejante al almidón, así es como se comenzó a utilizar el término amilosis o amiloidosis (del griego Amylon, almidón. Eidos, forma). Esta sustancia se encontraba con frecuencia en autopsias de pacientes que habían padecido una enfermedad inflamatoria o infecciosa crónica, constatándose que era una sustancia de la matriz extracelular formada por ácido condroitin sulfúrico y otras proteínas mal definidas de origen reactivo (Herrera, 2005).

En la actualidad, se conoce a la proteína beta amiloide (βA) como una molécula biológica compleja que interactúa con muchos tipos de receptores formando en ocasiones conjuntos insolubles. Sus deposiciones no fisiológicas se alternan con las condiciones neuronales normales que producen la desregulación del nivel de beta amiloide (βA). Por consiguiente, desde un punto de vista histológico, la progresión de la EA se asocia con tres características neuropatológicas cardinales: la acumulación de placas seniles extracelulares mediado por la beta amiloide (βA): ovillos intracelulares - neurofibrilares (NFT) y degeneración sináptica (Figura 1; Dinamarca et al, 2008; Gupta et al, 2011; Eteghad et al., 2015).

Existen modelos que intentan explicar la manera en que se lleva a cabo el proceso. Este se divide en dos vías, la ruta no amiloidogénica en la que intervienen α - y γ -secretasas y la amoloidogénica. En la primera, la escisión se da a través de β - y γ -secretasas produciendo varias especies de fragmentos βA . El sitio de la β - genera un anclaje con la proteína precursora del beta amiloide (PP βA) y la enzima β -secretasa (BACE1) en el cerebro. Formas neurotóxicas de βA creadas por escisión de PP βA e inicialmente por BACE1 producen los fragmentos C99 y PP βA soluble; el

C99 es entonces escindido por la γ -secretasa para producir β A (figura 1 A; Eteghad et al., 2015).

La proteína Tau también está relacionada con este proceso y se puede encontrar en los ovillos de degeneración neurofibrilar, específicamente en el citoplasma neuronal y su concentración está directamente relacionado con la severidad de la demencia. Su constitución se basa en cúmulos de filamentos helicoidales emparejados, que presentan características diferentes de los neurofilamentos y microtúbulos normales; los ovillos de degeneración neurofibrilar suelen ser más abundantes en las áreas donde es más intensa la destrucción neuronal, es decir, el hipocampo y las zonas adyacentes del lóbulo temporal, estructuras que tienen una gran importancia en la función de la memoria (Menéndez et al, 2001).

La ruta amiloidogénica la PPA se divide primero por la β -secretasa (BACE1), en lugar de la α -secretasa y esto es seguido por la escisión de la γ -secretasa. Los productos de escisión pueden contribuir a la neurotoxicidad por la deposición de β A monomérico soluble. Se generan agregados de oligómeros en diversos tamaños o fibrillas insolubles, que posteriormente forman placas neuríticas. Los monómeros β A se crean en la mayoría de las células del cuerpo, incluidas células endoteliales vasculares, células epiteliales y tiroideas (Prasansuklab y Tencomnao, 2013).

Para reducir los costos socio-económicos y la carga de la enfermedad en los pacientes causada por la amiloidosis, recientemente se han realizado esfuerzos notables para encontrar marcadores de diagnóstico que pronostiquen la enfermedad más tempranamente, así como la búsqueda de compuestos inhibidores del beta amiloide que permitan una mejor calidad de vida. Los métodos de neuroimagen como la resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones se han desarrollado para permitir a los investigadores diagnosticar la EA en sus etapas iniciales. Además, varios biomarcadores, que son cruciales para detectar las características patológicas de la EA, se han encontrado en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y se pueden evaluar (Eteghad et al., 2015).

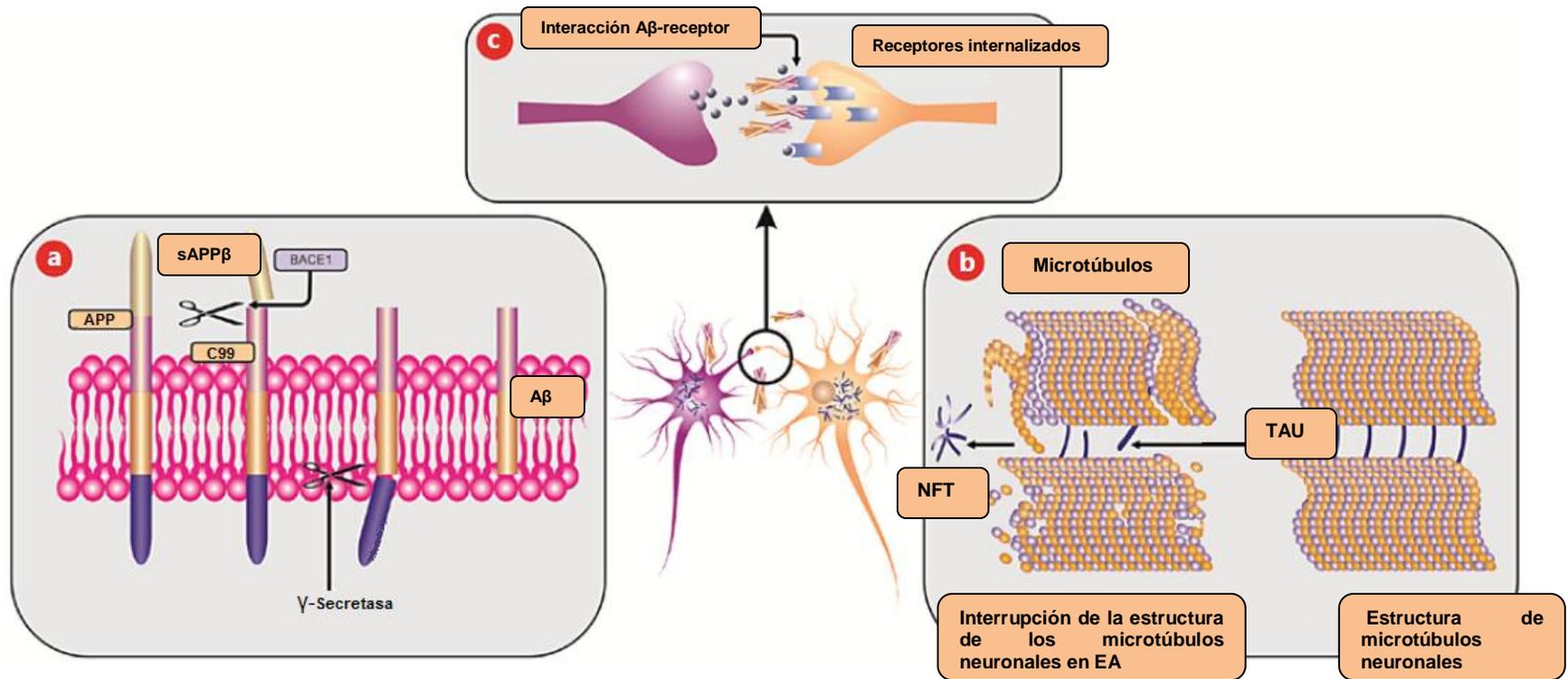


Figura 1. Las 3 características principales de EA dentro del sistema neuronal. A representa un corte de PPA con formación y acumulación extraneuronal de β A. B establece la formación y depósito de NFT intraneuronales y en C se observa la disfunción sináptica debida a la acumulación de β A y su interacción con los receptores. Reproducido de Eterghat y colaboradores (2015).

Así mismo, el conocimiento de la estructura molecular de la beta amiloide ha permitido buscar alternativas para los tratamientos. Lürhs y colaboradores (2005) determinaron sólo unas cuantas estructuras fibrilares en 3D (ID PDB 2beg) debido a que estas no cristalizan, son insolubles y heterogéneas, lo que hace difícil describirlas con ayuda de rayos X y RMN; sin embargo lograron dilucidar que los residuos 1-17 están desordenados, los residuos 18-42 forman una cadena β que contiene dos hojas β intermoleculares, paralelas formadas por los residuos 18-26 (β 1) y 31-42 (β 2). Por su parte Tomaselli y colaboradores (2006) establecieron la conformación estructural de una sola fibra con ID PDB 1z0q y en sus análisis mostraron que la región más estructurada corresponde al segmento 10-23. Esta región está en una conformación α -helicoidal así cómo la región 28-38 fue también una hélice regular. Xiao y colaboradores (2015) describieron fragmentos en 3D de la proteína beta amiloide que denominaron con ID PDB 2mxu, Wälti y colaboradores (2016) al ID PDB 2nao así como Colvin y colaboradores (2016) han descrito ID PDB 5kk3, con estructuras más completas de las fibras $A\beta_{1-42}$. Por lo tanto, la determinación de sus diferentes conjuntos moleculares y los mecanismos subyacentes a sus efectos patológicos ahora son posibles de analizar *in silico* y constatarlo *in vitro*.

Los estudios de inhibición anti-amiloidogénica *in vitro* partiendo de compuestos de origen algal aún son mínimos en comparación con reportes de moléculas de origen sintético o de plantas terrestres. Dado que los productos naturales se consideran la tendencia alternativa actual para el descubrimiento de fármacos, se ha evaluado el potencial de extractos algales y otros organismos marinos buscando la prevención de la agregación y desagregación en la formación de fibrillas. Kang y colaboradores (2011) reportan que el extracto butanólico de *E. cava* reduce la segregación del βA en células HEK293 que expresan proteína precursora de βA_{1-42} amiloide. Además, inhibe la oligomerización de βA , particularmente el oligómero de tamaño mediano.

Así mismo, se encontró que el extracto inhibía la formación de fibrillas βA de manera efectiva (50 $\mu\text{g/mL}$ de extracto). Su evaluación concluye con una posible ruta de inhibición (Figura 2) y sugieren a los compuestos del alga como candidatos a

utilizar en tratamientos ya que también puede proteger neuronas corticales primarias de la muerte celular inducida por β A, especialmente la inducida por oligómeros.

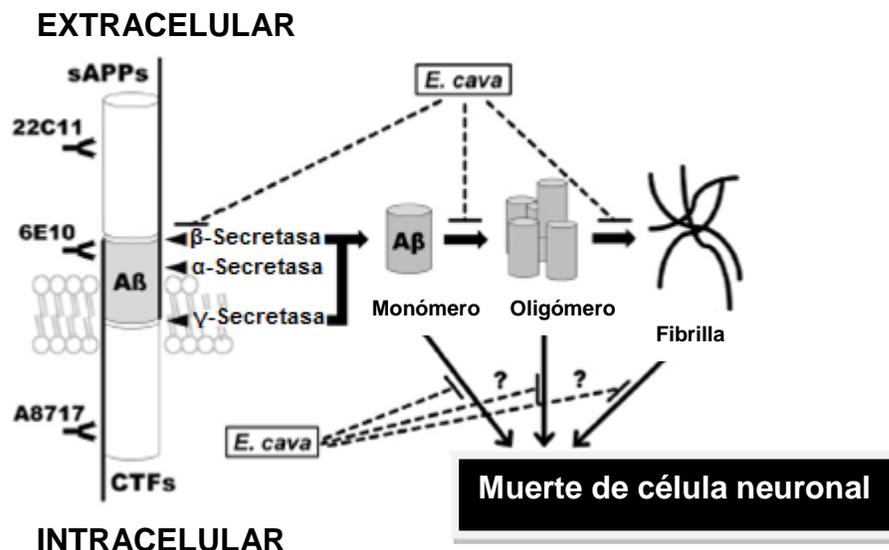


Figura 2. Ilustración esquemática de la patogénesis por beta amiloide y sus agregados. El extracto butanólico de *E. cava* inhibe la síntesis de β A a través de la inhibición de BACE reduciendo la oligomerización del β A y posterior fibrilización. Reproducido de Kang y colaboradores (2011).

Gao y colaboradores (2012) indican que el polisacárido sulfatado fucoidan mejora el deterioro cognitivo (aprendizaje y memoria) en ratas con infusión de β A₁₋₄₀. Además, este compuesto es capaz de revertir la actividad disminuída de la acetilcolina- transferasa (ChAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y el contenido de acetilcolina (ACh); aumenta la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) y el contenido de malondialdehído (MDA) en el tejido hipocampal de ratas inyectadas con β A. Estos resultados sugirieron que el fucoidan podría mejorar las habilidades de aprendizaje y memoria en las ratas inducidas por β A y los mecanismos parecían deberse a la regulación del sistema colinérgico, la reducción del estrés oxidativo y la inhibición de la apoptosis celular.

En el 2012, Ahn y colaboradores evaluaron los efectos neuroprotectores del extracto metanólico de *Eisenia bicyclis*, sus fracciones solubles (n-butanol y acetato de etilo) además de algunos phlorotaninos aislados como phloroglucinol,

dioxinodehydroeckol, eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol y 7-phloroekol sobre toxicidad inducida por β A; se determinó la viabilidad en líneas intracelulares ROS con niveles de Ca_2^+ y en células PC12. La adición del extracto de metanólico, así como las fracciones de acetato de etilo y n-butanol de *E. bicyclis* (2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) revirtieron marcadamente la toxicidad inducida por β A. También los phlorotaninos: phloroglucinol, dioxinodehidroekol, eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol y 7-phloroekol disminuyeron significativamente la muerte celular inducida por β A. Kang y colaboradores (2013) reportan el extracto butanólico de *Ecklonia cava* como un reductor de la producción beta amiloide (βA_{1-40} y βA_{1-42}) y modulador de la expresión de enzimas α - y β - secretasa representativas de las vías amiloidogénica y no amiloidogénica; la reducción de βA_{1-40} fue mayor en células tratadas con 50 mg/mL de extracto atribuyendo su efecto a los posibles phlorotaninos presentes.

Ogara y colaboradores (2014) mencionan que la familia Laminareaceae tiene especies prometedoras para la extracción de compuestos con actividad inhibitoria β A en comparación con la de otros grupos. Determinaron que la concentración efectiva media (EC_{50}) de los extractos etanólicos de 11 especies algas marinas fue de 4.9 mg/mL para la inhibición de agregación de β A; también el EC_{50} de extractos acuosos (obtenidos a 100 °C) fue de 0.013-0.42 mg/mL sugiriendo la eficiencia de los inhibidores obtenidos por extracción acuosa es mayor que la etanólica.

Shanmuganathan y colaboradores (2015) evaluaron el efecto inhibitorio de los extractos de acetona de *Padina gymnospora* (ACTPG) mediante el ensayo de tioflavina T en la protenina beta amiloide βA_{25-35} . El ensayo mostró un aumento en la intensidad de fluorescencia de β A y el tratamiento con ACTPG (250 $\mu\text{g} / \text{mL}$) en βA_{25-35} ; se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia en ambas fases, lo que sugiere que ACTPG previene la formación de los oligómeros y desagregación de fibrillas maduras.

El extracto se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna y las fracciones obtenidas se evaluaron con actividad inhibitoria de la colinesterasa. Los resultados sugieren que el alfa bisabolol presente, podría ser responsable de la inhibición de la colinesterasa con valor $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ tanto para AChE como para

BuChE siendo mayor la actividad en comparación con el fármaco estándar donepezil (valor $IC_{50} < 6 \mu\text{g} / \text{mL}$). Estos resultados respaldan el uso de extractos y compuestos de *P. gymnospora* para el tratamiento de trastornos neurológicos.

Así también, en el 2017 Alonso y colaboradores reportaron el compuesto gambierol proveniente de *Gambierdiscus toxicus* (dinoflagelado epífito de macroalgas); dicha molécula y sus análogos tetra y heptacíclicos mostraron ser prometedoras para la modulación de las características de la enfermedad de Alzheimer en las neuronas corticales primarias de los fetos de ratón (cepa 3xTg-AD). En su trabajo, se evaluó el análogo tetracíclico del gambierol que provocó una disminución de los niveles de amiloide βA_{1-42} a una concentración de $50 \mu\text{g} / \text{kg}$ y una inhibición dependiente de la dosis en la enzima β -secre tase-1

Por otro lado, la actividad *in vivo* contra la beta amiloide ha sido evaluada por Gan y colaboradores (2018); estos autores reportan al fucosterol obtenido del alga parda *Padina australis* como neuroprotector. Las células SH-SY5Y se expusieron a diferentes concentraciones de fucosterol, en rangos de 0.0032 a $20 \mu\text{M}$ antes de la inducción de βA . El efecto sobre la apoptosis se determinó utilizando tinción con Anexina V FITC y la expresión del ARNm se estudió mediante RT-PCR. La citometría de flujo confirmó los efectos protectores del fucosterol en las células SH-SY5Y contra la apoptosis inducida por βA , así como el tratamiento previo con fucosterol aumentó los niveles de NGB-ARNm pero redujo los niveles de PPA-ARNm y βA intracelular en dichas células evitando la formación de fibras.

Dados los antecedentes mostrados anteriormente, es claro que la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria del beta amiloide provenientes del medio marino tiene un potencial. En el presente documento se discuten algunas de las formas estructurales del beta amiloide mediante análisis *in vitro* e *in silico* (PDB 1z0q, 2beg, 2nao, 2mxu, 5kk3) bien establecidas, sus interacciones con el fucosterol y los posibles mecanismos de inhibición.

2.3 Uso del acoplamiento y dinámica molecular en la búsqueda de compuestos de origen marino como inhibidores.

Desde sus inicios en los años 60 el acoplamiento junto con los tremendos desarrollos en física, química, bioquímica y tecnología (computadoras) se ha convertido en una herramienta poderosa y una técnica esencial no sólo en la identificación de moléculas de interés farmacológico sino también en las interacciones proteína-proteína y en el comportamiento a nivel atómico de los nanomateriales (Chen, 2015). Sin embargo, los productos naturales, por la razón que sea han sido poco incluidos en los programas de búsqueda *in silico*. Estos enfoques computacionales pueden considerar evaluaciones estructurales en los sitios activos de enzimas, así como de dominios de asociación proteína-proteína, sitios alostéricos y otros plegamientos de unión a fármacos y proteínas (Coyne et al., 2010; Gerwick y Moore, 2012).

Cuando el sitio de unión puede ser identificado o razonablemente inferido se pueden realizar análisis con enfoques de biología estructural muy rápidos en un receptor específico, además existen 143,581 estructuras proteicas disponibles en Protein Data Bank (PDB) para desarrollarlos. Sin embargo, hay una continua necesidad de mejorar y hacer más fiables los parámetros establecidos en dichos análisis; un ejemplo son los campos de fuerza con los que se calculan energías tanto de proteínas como de moléculas pequeñas. Para ello, la química medicinal, los métodos biofísicos como la cristalografía, la RMN o la calorimetría de titulación isotérmica (ITC), se han enfocado en las interacciones de unión a nivel computacional utilizando estructuras de productos naturales completos o fragmentos farmacofóricos como un método para mejorar la afinidad de unión de las pequeñas moléculas a sus dianas proteínicas (Coyne et al., 2010; Gerwick y Moore, 2012).

El uso de modelos computacionales para proporcionar información sobre la farmacología de los productos naturales ha seguido en la mayoría de los casos el mismo camino utilizado en proyectos de descubrimiento de fármacos convencionales: se identifican pequeñas moléculas con propiedades fisiológicas deseables, ya sea evaluando sus interacciones potenciales con un objetivo de interés mediante el acoplamiento del ligando al sitio activo de una proteína. También se ha

intentado asignar un puntaje a la interacción resultante o inferir un modelo predictivo que contraste con la potencialidad bioactiva de uno de los compuestos ensayados *in vivo* o *in vitro* (Harvey et al, 2010; Honarparvar et al, 2013).

Estos modelos predictivos se basan en características del tipo farmacológico como restos hidrófobos o hidrófilos deseables dentro de los compuestos activos, o en huellas moleculares que indexan grupos funcionales o fragmentos moleculares que están o no presentes en sus estructuras. Se han descrito numerosos ejemplos de modelos recientes y farmacóforos utilizados con éxito para identificar nuevos inhibidores moleculares (Harvey et al, 2010; Honarparvar et al, 2013)

La mayoría de estos modelos se han construido a partir de productos naturales bioactivos y se utilizan para la detección de compuestos disponibles comercialmente en un intento de identificar los candidatos más susceptibles a la modificación sintética y la optimización para el blanco farmacológico de interés. En otros casos, se han utilizado modelos para identificar ligandos dentro de bases de datos, buscando compuestos o productos naturales para determinar nuevas estructuras químicas a las que se pueden realizar modificaciones posteriores. De forma similar, los experimentos de acoplamiento con ligandos son reportados frecuentemente a pesar de no cumplir el requisito de una estructura cristalográfica de alta resolución en la que se observen los ligandos acoplados (Harvey et al, 2010; Ou-Yang et al, 2012;).

Este enfoque se ha extendido para incluir moléculas de productos naturales en los sitios activos, aplicando una técnica denominada "pesca del objetivo", con la finalidad de dilucidar la compleja polifarmacología expresada por muchos productos naturales y establecer un mapa de los posibles objetivos para cada molécula. TarFisDock, es un recurso web de acceso abierto desarrollado para este propósito y proporciona a los usuarios los mejores candidatos de ligandos con base a su puntuación de energía (Harvey et al, 2010; Ou-Yang et al, 2012;).

La dinámica molecular se utiliza para estudiar casi todos los tipos de interacción entre las macromoléculas y proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos de interés biológico o medicinal. Las simulaciones abarcan amplios rangos espaciales, y temporales (Plimpton, 1995; Borhani & Shaw, 2012). La simulación de dinámica

molecular (DM) es el nombre de una técnica en la que se determinan las trayectorias de los átomos que componen un sistema mediante la resolución de las ecuaciones del movimiento. En las últimas décadas se ha desarrollado una gama muy amplia de aplicaciones en dinámica molecular, por ejemplo, el estudio de transiciones de fase y la dinámica de defectos microscópicos en sólidos. De hecho, este rápido desarrollo se ha mantenido a un ritmo creciente en relación con los avances en el poder de cómputo.

Un requisito esencial para resolver las ecuaciones clásicas del movimiento es la capacidad de calcular las fuerzas sobre las partículas. Hay muchas maneras de hacer esto. Las fuerzas se pueden obtener a partir de un potencial de interpartícula o de las constantes de fuerza en un sistema acoplado. Alternativamente, las fuerzas en un sistema atómico podrían ser evaluadas a partir de los primeros principios de mecánica cuántica (Chaplot, 2006).

En DM, todo átomo o miles de millones de átomos individuales se representan, por ejemplo, todos los átomos de una proteína y moléculas de agua circundantes, se mueven en una serie de pasos de tiempo discretos (por ejemplo, 2 fs). En cada paso, las fuerzas sobre cada átomo determinado a partir del campo de fuerza, es representado por una colección de parámetros físicos. Se observan tanto átomos enlazados como no enlazados (por ejemplo, van der Waals), fuerzas interatómicas, se calculan la posición atómica y la velocidad de acuerdo con las leyes de movimiento de Newton (Borhani & Shaw, 2012).

Este proceso se repite miles de millones de veces para obtener trayectorias atómicas continuas que duran desde 1 femtosegundo hasta la escala de milisegundos o segundos, o incluso más. Se pueden encontrar numerosos ejemplos o revisiones recientes sobre el uso de las simulaciones DM en el descubrimiento de fármacos. Los sistemas biológicos estudiados usando simulaciones DM pueden ser muy grandes, comprendiendo millones átomos, por ejemplo, varias de estas simulaciones se han hecho en complejo de ARN ribosomal de bacterias, medio por el cual se han obtenido proteínas fundamentales como objetivo de diversos antibióticos (Borhani & Shaw, 2012).

Por lo tanto, la dinámica molecular está cada vez más asociada con experimentos donde se pueden evaluar el comportamiento de un sistema biológico en particular. Se puede determinar una extensa escala espaciotemporal de la relación dominio-escala hasta miles de angstroms, con precisión atómica, y escalas de tiempo de hasta milisegundos y en una resolución de femtosegundo. Este poder de las simulaciones se ha visto incrementada por los avances metodológicos en los últimos 25 años y el estado de la química computacional en el diseño de fármacos ha cambiado considerablemente. Al examinar los datos de Journal of Computer-Aided Molecular Design (JCAMD), es notorio que muchas de las cuestiones importantes en los inicios de estas técnicas, siguen siendo de interés hoy en día, y muchos métodos entonces nuevos se han convertido en nuestros métodos de elección (Borhani & Shaw, 2012).

Actualmente, las simulaciones DM son una de las más versátiles y hay muchos programas que se pueden utilizar para realizar simulaciones, algunos de ellos son GROMACS (GROningen MAchine for Chemical Simulations), AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) y NAMD (Not (just) Another Molecular Dynamics Program) entre otros. Las simulaciones DM son útiles no sólo para explorar cambios conformacionales acoplados a complejos proteína-ligando y su estabilidad estructural, la movilidad de proteínas intrínsecamente ordenadas, la coordinación de metales, sino también para refinar estructuras que se determinaron experimentalmente por rayos X y RMN (Bello et al., 2013).

Por mencionar un ejemplo de DM, se han realizado análisis para explorar las interacciones de seis inhibidores fenólicos de origen marino en la aldosa reductasa humana (ALR2). Se consideró el ambiente fisiológico, todos los estados neutros y otros dos estados ionizados de cada compuesto fenólico (Figura 3) y variantes utilizando GROMACS; los cálculos indicaron que todos los compuestos son capaces de formar un enlace estable con el sitio activo de ALR2 que está construida principalmente por los residuos TYR48, HIS110 y TRP111, e imponen el efecto de inhibición ocupando el espacio activo. Con ello se determinó que los valores RMSD del inhibidor relativo a ALR2 son estables, reiterando lo anterior en la figura 4 donde

se puede observar que las enzimas se estabilizan después de 2 ns en todos los sistemas con un valor medio de RMSD de 2.0 Å (Wang et al., 2009).

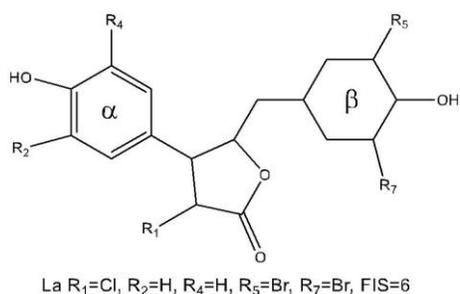


Figura 3. Estructura del compuesto fenólico marino (La).

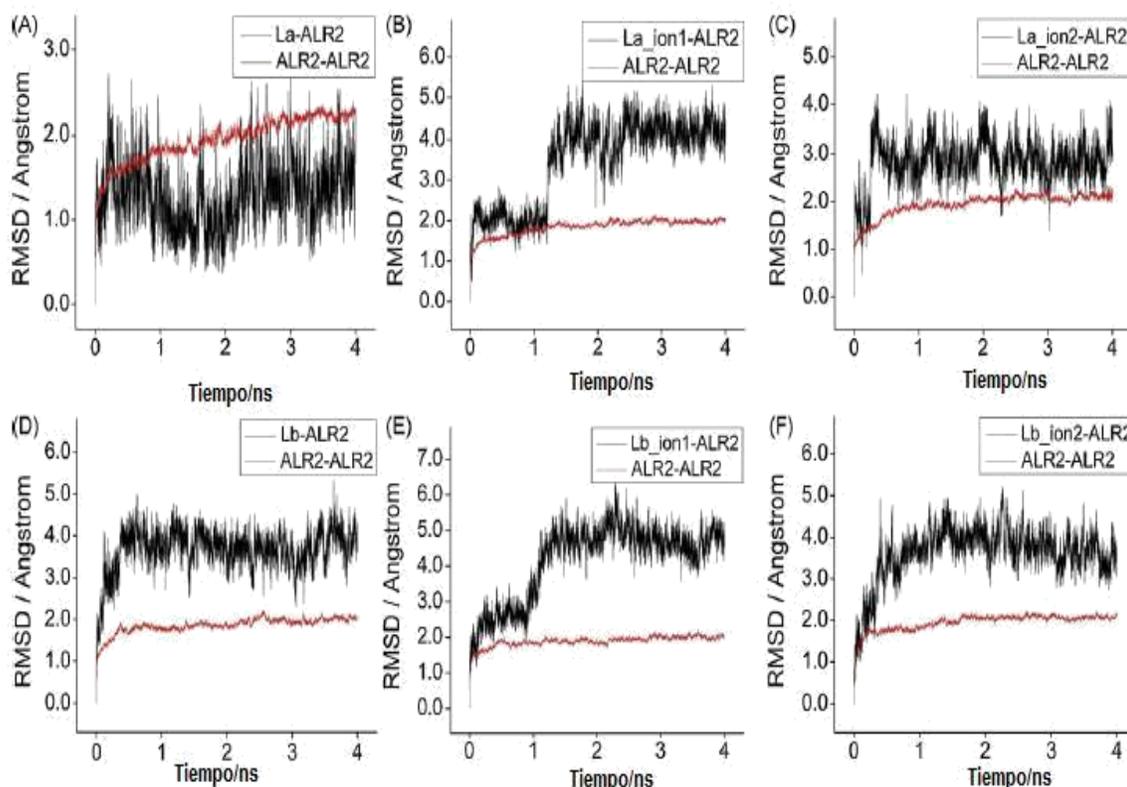


Figura 4. A, B y C dan los RMSD de los compuestos fenólicos La, La_ion1 y La_ion2 en relación con ALR2. La y La_ion2 tienen relativamente las curvas suaves, sus valores medios de RMSD son 1.7 y 3.0 Å. Actualmente, considerando que el propio ALR2 tiene un valor de 2.0 Å.

Por otro lado, el acoplamiento molecular (Docking) también es en la actualidad una exploración virtual rutinaria para la detección y diseño de fármacos. El número de documentos relacionados con ello ha aumentado dramáticamente en la última década (Chen, 2015). Al igual que los análisis de dinámica, en el acoplamiento molecular hay diferentes consideraciones que se tienen en cuenta antes de llevar a cabo un análisis (Figura 5).

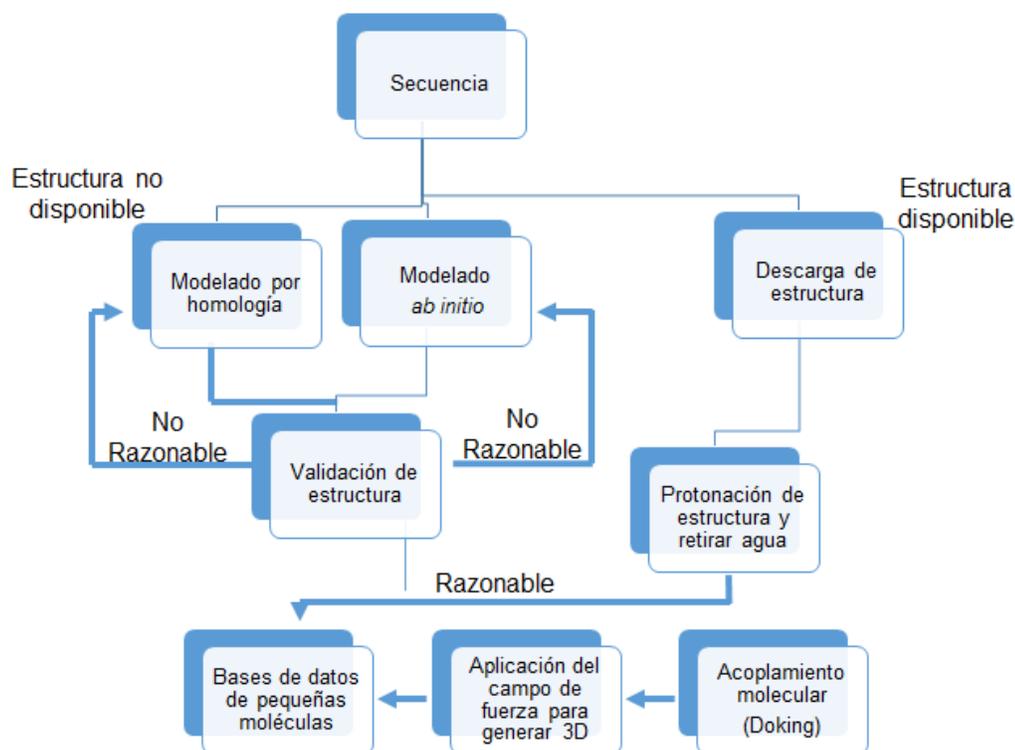


Figura 5. Diagrama de flujo del procedimiento de acoplamiento.

El acoplamiento molecular ha sido utilizado para resolver las incógnitas sobre cómo se origina la actividad biológica de diferentes compuestos. A continuación, se muestran algunos ejemplos que han ayudado a comprender la relación proteína-ligando para pruebas específicas o enfermedades degenerativas. Por ejemplo, existen análisis *in silico* sobre el acoplamiento molecular de los compuestos de origen marino como antidiabéticos. Tal es el caso del fucosterol (Figura 6) obtenido de las algas pardas *Eisenia bicyclis* y *Ecklonia stolonifera*; la investigación se realizó

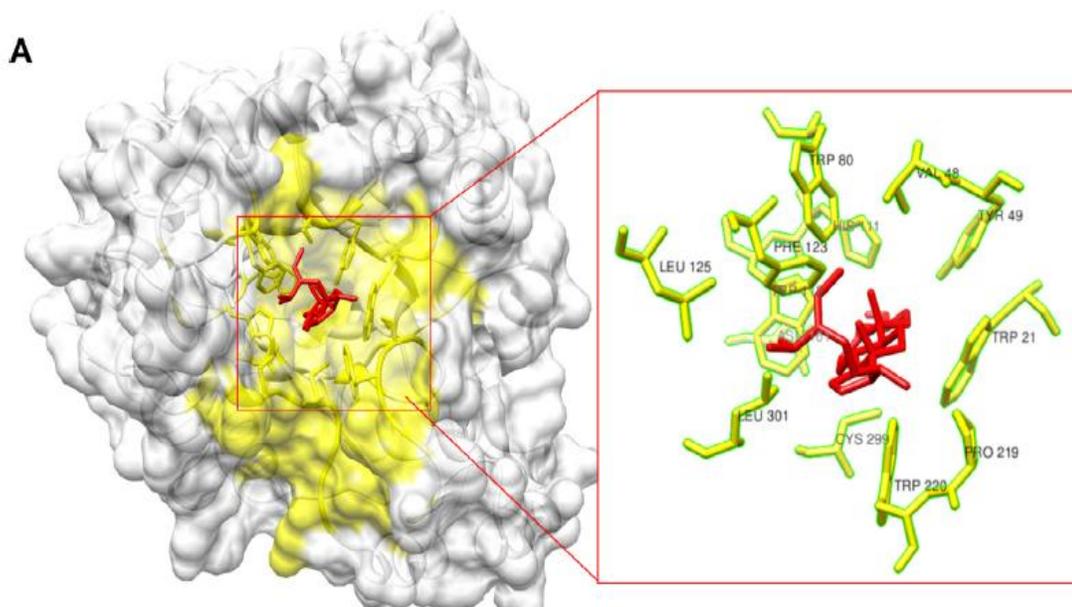
en la aldosa reductasa de rata (RLAR), aldosa reductasa recombinante humana (HRAR), la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) y la glucosidasa (Jung et al, 2013).

El fucosterol mostró una inhibición moderada contra RLAR, HRAR y PTP1B. Sin embargo, mostró una actividad débil o nula contra la formación de AGE y α -glucosidasa. Además, el estudio cinético reveló que el fucosterol realiza una inhibición de tipo mixto contra RLAR y HRAR, mientras mostró ser un inhibidor no competitivo con 1B PTP. Dado que el fucosterol inhibió la aldosa reductasa (AR), se estableció que es una gran promesa para su uso en el tratamiento de las complicaciones diabéticas (Jung et al, 2013). Así también Jung y colaboradores (2016) evaluaron la fucoxantina y el fucosterol obtenido de las macroalgas *Undaria pinnatifida* y *Ecklonia stolonifera*. Los análisis se realizaron *in vitro* con la proteína beta secretasa (BACE1), así las como predicciones de acoplamiento molecular. Los resultados de la simulación demostraron que el residuo Lys224 de BACE1 interactuó el grupo hidroxilo de fucosterol, mientras que dos residuos BACE1 adicionales (Gly11 y Ala127) interactuaron con dos grupos hidroxilo de fucoxantina.

Así mismo, el compuesto dieckol (Figura 7) del alga *Ecklonia cava* fue examinado por sus efectos inhibidores sobre la síntesis de melanina, ya que suelen ser los inhibidores de tirosinasa humana, blanco principal de los productos cosméticos. Por lo tanto, se evaluaron los efectos inhibitorios de dieckol en la tirosinasa de un hongo, así como los modos de unión en la estructura cristalina de tirosinasa descrita de *Bacillus megaterium* (PDB ID: 3NM8; Kang et al, 2012). Para el análisis se utilizó un algoritmo de acoplamiento del programa CDOCKER para simular la unión entre la tirosinasa y el dieckol. Estos estudios de modelado molecular fueron exitosos (valor energético de unión calculado: - 126.12 kcal / mol), e indicaron que el dieckol interacciona con la His208, la Met215 y la Gly46. Estos resultados sugieren que el dieckol tiene un gran potencial para desarrollarse adicionalmente como agente farmacéutico o cosmético para su uso en dermatología, específicamente en trastornos asociados con la melanina (Kang et al, 2012).

Así mismo, el dieckol de *E. cava* fue evaluado como agente anti-proliferativo y anti-angiogénico en la línea celular EA.hy926 (híbridos de células somáticas).

También se realizaron cálculos de acoplamiento en las proteínas AP-N, VEGFR-1, MMP-2, MMP-9, Akt y Erk2 utilizando el Dock-ingServer; se determinó que el dieckol suprimió la proliferación de células EA.hy926 inducidas por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Además, el compuesto mostró una inhibición significativa de la migración celular mediante la inhibición de la proteína y los niveles de expresión génica de las metaloproteinasas MMP-2 y -9. La cascada de señalización subyacente a estas respuestas se determinó como la inhibición inducida por dieckol en las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), ERK y p38. (Li et al, 2015).



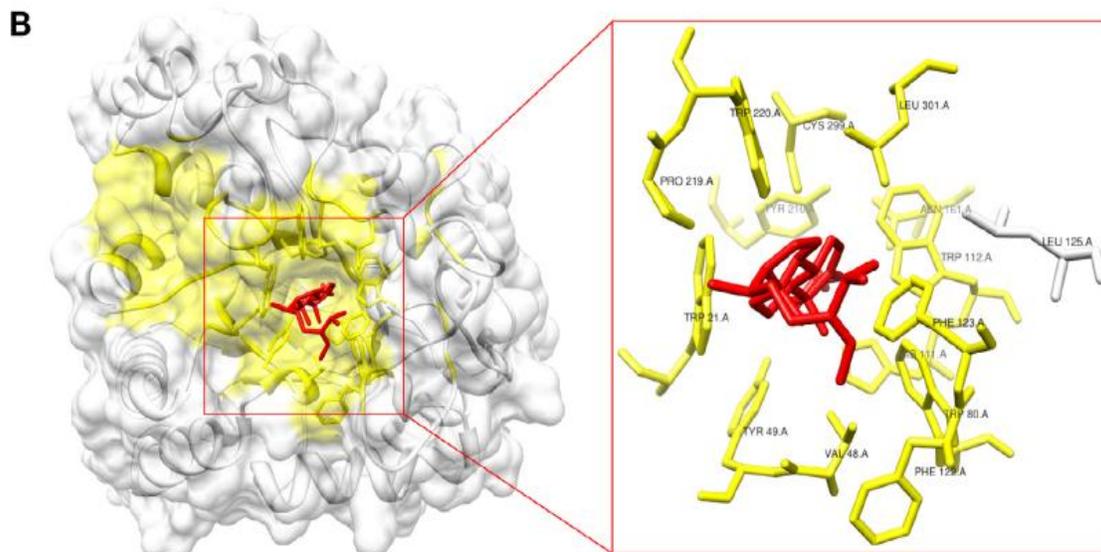


Figura 6. Se pueden observar los modelos de acoplamiento de la inhibición de AR por fucosterol. (A) Inhibición de RLAR; (B) inhibición de HRAR; El fucosterol contiene un grupo 3 β -hidroxilo hidrofóbico que interactuó con los residuos Tyr49 y His111 y así como con los residuos de aminoácidos adicionales Trp21, Trp112, Phe123 y Trp220 respectivamente.

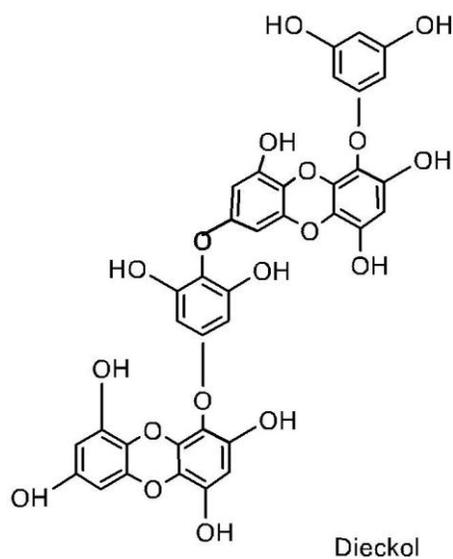


Figura 7. Estructura del Dieckol.

Hay otros estudios de acoplamiento molecular en que se han evaluado phlorotanninos de *Eisenia bicyclis* con actividad inhibitoria en BACE1 utilizando

Autodock 4.0; dónde se determinó al eckol, el phlorofurofucoeckol-A y el dieckol como los phlorotaninos más prometedores como agentes preventivos de Alzheimer. Las interacciones de estos compuestos con la proteína fueron similares con TYR132 y THR133 (Figura 8; Jung et al, 2010). Rajamanikandan y colaboradores (2011) reportaron compuestos provenientes de bacterias y organismos fúngicos marinos, como objetivos atractivos para las terapias contra el cáncer contra mucinas; evaluando su potencial mediante acoplamiento molecular (Arguslab) encontraron interacción con al menos 28 aminoácidos.

Siguiendo la misma línea de carcinogénesis, Preamnath y colaboradores (2012) reportaron estudios de acoplamiento molecular de fucosa sulfatada de origen marino, contra la proteína p53 humana; los resultados mostraron una energía de unión que variaba de 134.817 kcal/mol a 185.738 kcal/mol. Estos estudios de acoplamiento molecular podrían contribuir al desarrollo adicional de inhibidores de p53 mutagénicos para la prevención y tratamiento del cáncer. Por otro lado, el análisis de acoplamiento con Autodock 4.2 de tres diterpenos (ADD, HDD y THD) provenientes del género *Dictyota*, han mostrado actividad inhibitoria contra mutágenos de la transcriptasa del virus de VIH; el diterpeno dolabelladienotriol (THD) mostró mayor actividad y se observó que preserva las interacciones con los mismos residuos. Sin embargo, para algunas mutaciones de la transcriptasa del VIH, se observaron nuevas interacciones de Van der Waals tales como Lys102, Val189, Gly190 y Phe227 en RT-3; Phe227 en RT-4; (Figura 9; Miceli et al 2013).

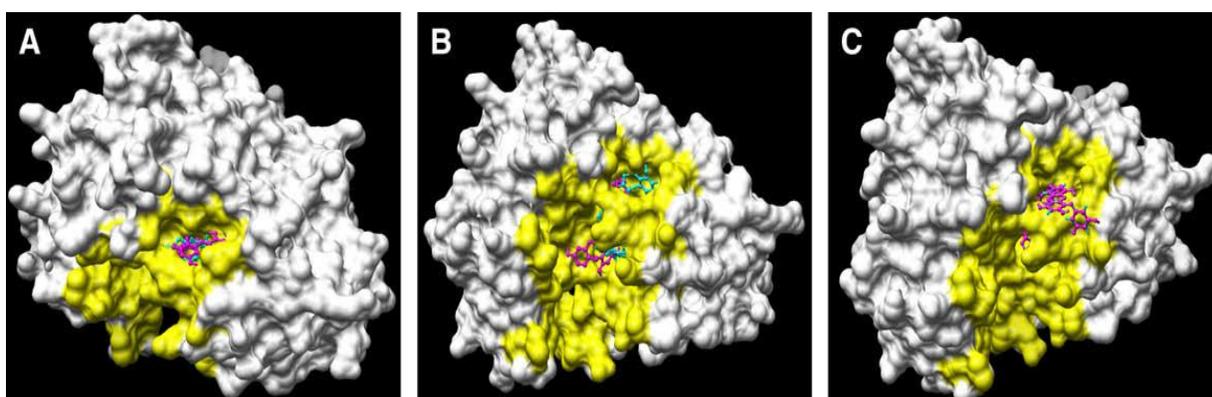


Figura 8. Modelos de acoplamiento molecular del complejo BACE1-Phlorotaninos; dónde eckol (A); Florofurofucoeckol-A (B); Dieckol (C) fueron los más

activos
Las po
domini

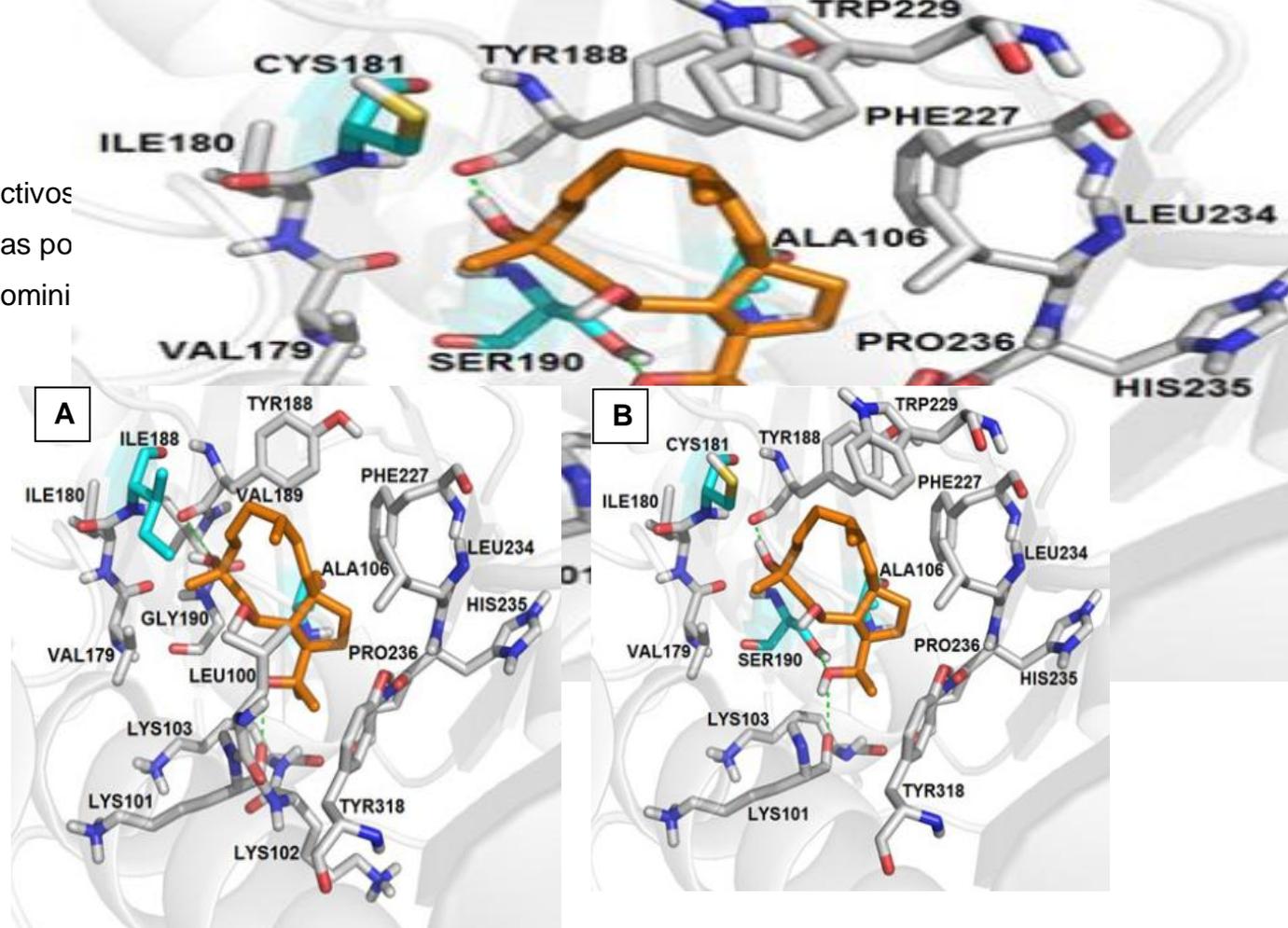


Figura 9. Interacción de dolabelladienotriol (THD; color naranja) obtenido a partir del genero *Dictyota*. Los análisis se realizaron en la reversa transcriptasa mutada del VIH-1 RT3 (A) y RT4 (B). Los aminoácidos en azul son los que muestran mayor interacción. Reproducido de Miceli et al, (2013).

Castellanos-Castillo (2014) desarrolló su tesis doctoral enfocándose en la búsqueda de compuestos inhibitorios de la enzima acetilcolinesterasa utilizando Autodock y encontró que el cembranoide (1 α): 14 acetocicrassina proveniente del octocoral *Pseudoplexaura sp* es altamente activo. Devi y Velmurugan (2015) analizaron 126 compuestos de origen marino con ese mismo fin, además de la actividad anti-malarial y anti-viral utilizando ese mismo paquete informático.

Balachandran y colaboradores (2016) evaluaron compuestos antiinflamatorios provenientes de *Sargassum wightii* con el paquete informático GLIDE; La estructura cristalina obtenida del banco de datos de proteínas se acopló contra siete compuestos utilizando el software Schrödinger Maestro

(versión 2013.1). Los resultados del acoplamiento molecular mostraron que de los siete compuestos bioactivos analizados: el salicilato de metilo, el ácido benzoico, el 2-hidroxi, el éster etílico, el ftalato de dietilo, el ácido hexadecanoico, el etilo éster, el éster etílico del ácido y (E) -9-octadecenoico inhibieron eficazmente la proteína COX2.

Todas estas investigaciones son solo unos cuantos ejemplos junto a los mencionados en los párrafos anteriores, que nos demuestran qué cada grupo de investigación elige el paquete informático más afín a sus necesidades de análisis. También cabe señalar que la mayoría de los reportes son de años recientes, lo que nos indica que la combinación del acoplamiento molecular y la búsqueda de actividad en compuestos de origen marino están en sus inicios. Lo cual es congruente considerando que la investigación de compuestos de origen marino data de alrededor de 50 años en comparación con los terrestres.

3. Justificación.

La baja efectividad y los efectos secundarios que ejercen los actuales fármacos utilizados como inhibidores de la acetilcolinesterasa en la terapéutica justifican por sí solos la búsqueda de nuevas alternativas. Por ejemplo, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer se aplican diferentes drogas inhibitoras de AChE como la galantamina, rivastigmina, donepezilo y tacrina. Sin embargo, sólo pueden ofrecer efectos de corto plazo, y dichos inhibidores ejercen efectos en el sistema periférico, causan hepatotoxicidad y desordenes gastrointestinales. Por lo tanto, todavía hay una gran demanda en la búsqueda nuevos fármacos candidatos para su tratamiento (Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar, 2003; Mukherjee et al., 2007; Suganthy et. al., 2010; Syad et. al., 2012).

Por otro lado, la incidencia de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la enzima acetilcolinesterasa, como es el caso de la proteína beta amiloide, impide poder generalizar pautas terapéuticas comunes. El enfoque terapéutico se basa en tres objetivos: a) reducir la síntesis de la proteína precursora de las fibrillas amiloide (inhibición), b) evitar el depósito y polimerización de la misma en las fibrillas amiloide, c) tratamiento sintomático de

los órganos afectados. Se sabe que los extractos algales tienen gran potencial en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y como se ha mencionado anteriormente, aquellos compuestos que presentan esta característica pueden tener propiedades inhibitorias de βA_{1-42} .

Aunado a lo anterior, pocos estudios se enfocan a comprender la inhibición a nivel molecular lo cual hace imprescindible determinar el acoplamiento enzima-inhibidor. Se conoce perfectamente la estructura de la acetilcolinesterasa y las variantes estructurales de βA_{1-42} , así como de algunos compuestos responsables de su inhibición pero aún no existe un estudio donde se establezca el mecanismo de acción específico que pudieran tener los compuestos de origen algal en ambas moléculas. Por consiguiente, el presente estudio se enfocó en la evaluación del fucosterol como inhibidor de la acetilcolinesterasa y la proteína beta amiloide con la finalidad de proponer los mecanismos por los cuales se genera la actividad biológica.

3.1. Hipótesis

En base a los estudios reportados sobre la actividad inhibitoria enzimática de los extractos de algas marinas así como de compuestos puros, se sostiene que el fucosterol es un inhibidor de la acetilcolinesterasa y la proteína beta amiloide (βA_{1-42}) que tiene mecanismos diferentes a los inhibidores comercialmente conocidos.

4. Objetivo general.

Evaluar por diferentes técnicas la capacidad del fucosterol como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y la proteína β -amiloide (βA_{1-42}).

4.1. Objetivos particulares

A. Determinar por diversas técnicas espectroscópicas la estructura del fucosterol.

B. Determinar los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m ,) de la enzima acetilcolinesterasa y el fucosterol.

- C. Proponer los mecanismos de inhibición del fucosterol a partir del análisis de acoplamiento y dinámica molecular.
- D. Determinar por la técnica de fluorescencia con ThT la capacidad del fucosterol para inhibir la formación de fibrillas beta amiloide.
- E. Determinar por electroforesis en gel de poliacrilamida la unión de la proteína-ligando.
- F. Determinar por microscopía de fuerza atómica (ATM) la inhibición de la agregación beta amiloide (βA_{1-42})
- G. Evaluar por acoplamiento y dinámica molecular la inhibición de la agregación beta amiloide (βA_{1-42}).

5. Material y método.

5.1 Determinación de la inhibición de la acetilcolinesterasa.

5.1.1. Análisis de microplaca (96 posos).

Para el ensayo colorimétrico de microplaca (96 posos) se utilizó la metodología establecida por Rhree y colaboradores (2001) así como la de Ellman y colaboradores (1961). Se agregaron 10 μ L (0.09 U/ mL) de una solución de AChE, y se incubó con diferentes concentraciones de *Sargassum horrdum* y fucosterol (de 10 a 50 μ) en 0.05 M de tris-HCl buffer (pH 8.0) por 45 min a temperatura ambiente. Luego de la incubación se añadieron 125 μ L a 3mM de ácido 5,5'-Ditio-bis (2-nitrobenzoico) ó (DTNB) y el volumen total se llevó hasta 1mL con el tampón de Tris-HCl (pH 8.0). La actividad enzimática fue iniciada al agregar 25 μ L a 15 mM de yoduro de acetilcolina (ATCI) y yoduro butirilticolina (BuTCl). La hidrólisis de ATCI y BuTCl se monitoreó hasta observar la coloración amarilla del anion 5-tio-2-nitrobenzoato que se origina como resultado de la reacción de DTNB con ticolina.

La catálisis de la enzima fue obtenida en un espectrofotómetro UV-Visible a 405nm. Los experimentos se realizaron por triplicado y se utilizó el Donepezil como estándar (fármaco anticolinesterasa actualmente empleado). El porcentaje de inhibición de AChE se determinó con la siguiente ecuación:

$$\frac{E-S}{E} \times 100$$

Donde:

E = es la actividad de la enzima sin extracto

S = es la actividad de la enzima con extracto

5.2. Fraccionamiento, purificación y caracterización del fucosterol.

El fucosterol utilizado para los análisis del presente estudio se tomó del acervo de compuestos que existen en el laboratorio de química de macroalgas del CICIMAR-IPN, previamente obtenido en el trabajo de tesis de Muñoz-Ochoa (2010). La extracción del fucosterol se realizó a partir de 590g del alga parda *Sargassum horridum* seca y molida por maceración con etanol destilado en proporción de 1:2 (masa: volumen). Cada tercer día se cambió el disolvente. El extracto resultante fue concentrado a sequedad a presión reducida en un rotavapor Yamato RE500. Se obtuvieron 26.8 g de sólido (extracto etanólico crudo) que se transfirió a un vial tarado y etiquetado como ESL2. Posteriormente se sometió ESL2 a extracción sólido-líquido en silica gel de fase normal (60g) con lo que se obtuvieron las fracciones de ESL2F1 a la ESL2F5 y ESL2FI. Los 0.520 mg de la fracción ESL2F1 se sometieron a una columna cromatográfica en silica gel en fase normal con hexano, diclorometano, etanol y agua.

Con ello se obtuvieron 10 fracciones (de CC25F1 a CC25F10). La fracción CC25F7695 (159 mg) se sometió a una columna cromatográfica de silica gel en fase reversa eluida con etanol y agua (9:1). Obteniendose tres fracciones: de CC26F1 a CC26F3. Así mismo, la fracción CC26F3 se sometió a purificación por columna cromatográfica de fase reversa y se eluyó con un sistema isocrático de EtOH: H₂O (98:2); las fracciones obtenidas fueron unidas por similitud en 3

grandes fracciones CC27F1 a CC27F3. La fracción CC27F3 mostró ser un compuesto aparentemente puro. El fucosterol fue sometido a análisis de resonancia magnética nuclear (RMN). La identificación estructural se realizó por comparación de espectros previamente reportados (Adel et al, 2015; Bouzidi et al, 2014; Chen et al, 2014; Khanavi et al, 2012; Singh et al, 2014).

5.3 Cinética enzimática de hAChE.

Para la actividad inhibitoria de hAChE, se utilizó el inhibidor comercialmente conocido como neostigmina y fucosterol. Ambos se evaluaron mediante el método colorimétrico informado por Bonting y Featherstone (1956) que mide la cantidad restante de ACh. La solución de ensayo consistió en un tampón de fosfato a 0.1 M a pH 8 y 0.02 unidades de hAChE (Sigma Chemical C1682), así mismo concentraciones crecientes de yoduro de ACh (0, 2, 0, 4, 0, 8, 1, 6, 3, 2, 6, 4 y 12, 8 mM) como sustrato. El fucosterol (0.004, 0.006 y 0.008 μ M) y la neostigmina (0.14 μ M) se agregaron a la solución de ensayo enzimático durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente se agregó el sustrato. Los cambios de absorbancia se registraron después de 60 minutos de incubación con el sustrato usando celdas de cuarzo de longitud de trayectoria de 1 cm en un espectrofotómetro UV/VIS (Perkin lambda 25) a 500 nm. Las velocidades de reacción se compararon, y se calculó la inhibición en presencia de los compuestos de ensayo.

5.4. Acoplamiento molecular (docking) con acetilcolinesterasa.

La conformación inicial de la enzima hAChE se eligió de un estudio previo realizado por Correa-Basurto y colaboradores (2014). Se usaron paquetes AutoDock 4.2.6 y AutoDockTools 1.5.2 (Morris et al, 1998) para examinar la capacidad de reconocer fucosterol y neostigmina. Las estructuras químicas de dos dimensiones (2D) de los ligandos sintetizados se dibujaron con el programa ChemBioDraw Ultra 11.0. La matriz Z del fucosterol y la neostigmina se generaron con el programa Gauss View 5.0 (Dennington et al., 2009) para asignar la distancia interatómica correcta y los tipos de hidrógeno a través de una

minimización energética y de geometría bajo un método semiempírico AM1 empleando el paquete químico cuántico de Gaussian 09W (Frisch, 2009).

Se agregaron átomos de hidrógeno polar en los átomos apropiados de hAChE y se les asignaron cargas de Kollman (Kollman et al, 2000), mientras que las cargas de Gasteiger se asignaron a ligandos. El sitio de acoplamiento se basó en el conocimiento de la localización del sitio catalítico activo de hAChE. Teniendo en consideración la información anterior, se utilizó un procedimiento basado en cuadrículas para generar los mapas de afinidad que delimitan el sitio de unión de proteínas con los siguientes parámetros de cuadrícula: XYZ de 70 X 104 X 112 Å y 70 X 94 X 104 Å, con un espaciado de puntos de rejilla de 0.375 Å³. El algoritmo genético lamarckiano se seleccionó como una función de puntuación con parámetros de búsqueda de una población aleatorizada inicial de 100 individuos y un número máximo de evaluaciones de energía de 1 X 10⁷ ciclos. El procedimiento de acoplamiento fue validado para garantizar su coherencia. Esto se llevó a cabo acoplando el donepezilo presente en el complejo humano AChE-donepezil (entrada PDB 4EY7) con nuestra estructura AChE humana, revelando una postura de unión similar.

5.5. Dinámica molecular con la enzima acetilcolinesterasa.

5.5.1 Simulaciones de dinámica molecular (DM) y cálculos de energía libre de unión.

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) de los complejos hAChE-ligando se realizaron usando el paquete AMBER 12 del módulo PMEMD (Case et al., 2005) y el campo de fuerza ff99SB (Duan et al., 2003). Las topologías de los complejos hAChE-ligando fueron construidas por el módulo Leap, y sus parámetros se determinaron con el módulo de antecámara, basado en el campo de fuerza Amber generalizado (GAFF) (Wang et al., 2004). Las cargas atómicas AM1-BCC se calcularon con el módulo de la antesala. Ocho iones de sodio se colocaron en diferentes lugares mediante LEaP para neutralizar las cargas negativas alrededor de los modelos complejos a pH 7.

Se aplicó una caja rectangular de moléculas de agua TIP3P (Jorgensen et al., 1983) para solvatar los complejos, extendiéndose al menos 12 Å del complejo proteína-ligando. Antes de las simulaciones DM, los sistemas se minimizaban y equilibraban. Los sistemas se minimizaron a través de 1000 pasos de minimización de descenso más empinada seguido de 1000 pasos de minimización de gradiente conjugado; los sistemas se calentaron de 0 a 310 K durante 200 picosegundos (ps) de simulaciones DM con restricciones de posición a volumen constante. Sucesivo conjunto isotérmico-isobárico (NPT) de DM simulaciones se realizó para 200 ps para ajustar la densidad del disolvente seguido de 600 ps de equilibrio de presión constante a 310 K, utilizando el algoritmo SHAKE (Van Gunsteren y Berendsen, 1977) en átomos de hidrógeno, un paso de tiempo de 2 femtosegundos (fs) y dinámica de Langevin para control de temperatura. Las ejecuciones de equilibrio fueron seguidas por simulaciones de DM de 100 ns de longitud sin restricciones de posición, bajo condiciones de contorno periódicas (PBC) y usando un conjunto de NPT a 310K.

El término electrostático se describió mediante el método Ewald de malla de partículas (Darden et al, 1993), y se utilizó un corte de 10 Å para las interacciones de van der Waals. El paso del tiempo de las simulaciones DM se estableció en 2,0 fs, y el algoritmo SHAKE (Van Gunsteren & Berendsen, 1977) se usó para restringir las longitudes de enlace en sus valores de equilibrio. La temperatura y la presión se mantuvieron usando el algoritmo de acoplamiento débil (Berendsen et al., 1984) con las constantes de acoplamiento τ_T y τ_P de 1,0 y 0,2 ps, respectivamente (310 K, 1 atm). Las coordenadas se guardaron para análisis cada 20 ps. La herramienta "ptraj" en AMBER 12 se utilizó para analizar la dependencia del tiempo de la desviación cuadrática media (RMSD), el radio de giro (RG) y el análisis de agrupamiento. Las imágenes y las representaciones estructurales se prepararon utilizando PyMOL v0.99 (PyMOL, 2017) y Maestro Schrödinger versión 10.5 (Maestro, 2018).

5.5.2. Cálculo de energías libres de enlace absoluto y contribuciones por residuo.

A esto, se extrajeron 500 instantáneas a intervalos de tiempo de 100 ps de las últimas 50 ns de simulaciones DM, usando una concentración de sal de 0,1 M y el modelo de disolvente implícito Born (Onufriev et al., 2004) después de eliminar las moléculas de agua y los contraiones. Los análisis se realizaron utilizando el script MMPBSA Perl (Gohlke et al., 2004) proporcionado en los paquetes AMBER 12 (Case et al., 2005). La energía libre de unión de cada complejo se puede calcular como:

$$\Delta G_{\text{mmgbsa}} = G^{\text{complejo}} - G^{\text{receptor}} - G^{\text{ligando}}$$

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta S_{\text{olvatación}} - T\Delta S$$

5.6 Análisis estadístico.

Los análisis cinéticos enzimáticos se realizan con Microsoft Excel. Los datos obtenidos de las pruebas se promediaron y la desviación estándar ($SD \pm 2$). Posteriormente, estos datos promedio se sometieron a regresión lineal, ecuación de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk, respectivamente.

5.7. Valoración del compuesto fucosterol como inhibidor de la agregación del βA_{1-42}

Se evaluó la capacidad del fucosterol para inhibir la formación de fibrillas y oligómeros de βA_{1-42} , mediante estudios de fluorescencia con Tioflavina T (ThT), electroforesis en gel de poliacrilamida y microscopía de fuerza atómica (MFA).

5.8. Fluorescencia con tioflavina (ThT).

Se preparó una dilución de βA_{1-42} (Calbiochem, No. Cat. PP69) a una concentración 50 μM en agua miliQ, en presencia y ausencia del compuesto a concentraciones de 50 y 100 μM . Cada alícuota se incubó en una celda de cuarzo de 0.5 cm a 37 °C con agitación constante durante 24 h, tomando alícuotas a los 0, 60,

180 y 1440 min de incubación. La muestra se colocó en una celda de cuarzo que contenía HEPES a una concentración de 20 mM y 100 mM de NaCl con pH 7.4 y ThT 3 μ M. El incremento de la Fluorescencia de ThT se midió a una $\lambda_{emisión}=480$ nm usando un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS-45 usando una $\lambda_{excitación}=445$ nm (Hernández-Rodríguez et al, 2013).

5.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para determinar si la incubación de βA_{1-42} en presencia del compuesto favorece la formación de oligómeros de βA_{1-42} , se preparó una dilución de βA_{1-42} a una concentración de 100 μ M en agua miliQ, en presencia y ausencia de fucosterol a una concentración de 50 y 100 μ M, incubando a 37°C durante 24 h. Alícuotas (15 μ l) de las muestras se mezclaron con 15 μ l de buffer de carga y se mezclaron durante 1 min. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, siendo posteriormente teñido con plata (Hernández-Rodríguez et al, 2014). El peso molecular de las bandas se determinó por comparación con el marcador de peso molecular de referencia (Azul 6x).

5.10. Microscopia de fuerza atómica (MFA).

Para la determinación de las características morfológicas del βA_{1-42} en presencia y ausencia del fucosterol (50 y 100 μ M), 5 μ l de βA_{1-42} a una concentración de 50 μ M incubados durante 24 h a 37°C en agitación continua, fueron depositadas sobre una placa de vidrio y secados a temperatura ambiente. Las imágenes fueron escaneadas en el aire mediante MFA (MultiMode V; Veeco, EE.UU.), utilizando el modo tapping (Hernández-Rodríguez et al, 2014).

5.11. Acoplamiento molecular con beta amiloide (βA_{1-42})

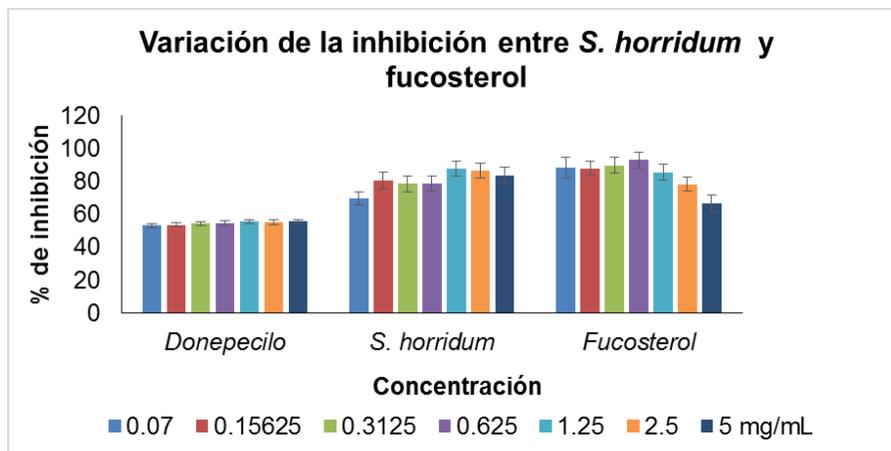
Las conformaciones utilizadas de la proteína beta amiloide fueron 1z0q, 2beg, 2mxu, 2nao y 5kk3 que se eligieron de la base de datos del Protein data bank (<https://www.rcsb.org/>). Se usaron paquetes AutoDock 4.2.6 y AutoDockTools 1.5.2 (Morris et al, 1998) para examinar la capacidad de reconocer fucosterol y galantamina. Las estructuras químicas de dos dimensiones (2D) de los ligandos

sintetizados se dibujaron con el programa ChemBioDraw Ultra 11.0. La matriz Z del fucosterol y galantamina se generaron con el programa Gauss View 5.0 (Dennington et al., 2009) para asignar la distancia interatómica correcta y los tipos de hidrógeno a través de una minimización energética y de geometría bajo un método semiempírico AM1 empleando el paquete químico cuántico de Gaussian 09W (Frisch, 2009). Se agregaron átomos de hidrógeno polar en los átomos apropiados de beta amiloide y se les asignaron cargas de Kollman (Kollman et al, 2000), mientras que las cargas de Gasteiger se asignaron a ligandos. Así mismo, se utilizó un procedimiento basado en cuadrículas para generar los mapas de afinidad que delimitan el sitio de unión de proteínas con los siguientes parámetros de cuadrícula: XYZ de 70 X 104 X 112 Å y 70 X 94 X 104 Å, con un espaciado de puntos de rejilla de 0.375 Å. El algoritmo genético lamarckiano se seleccionó como una función de puntuación con parámetros de búsqueda de una población aleatorizada inicial de 100 individuos y un número máximo de evaluaciones de energía de 1 X 10⁷ ciclos.

6. Resultados.

6.1. Determinación de la inhibición de la acetilcolinesterasa por técnicas colorimétricas y cromatografía de placa fina (TLC).

Como se puede observar en la gráfica 1, la concentración 0.625 mg/mL de fucosterol inhibió más del 80% a la acetilcolinesterasa de anguila eléctrica mientras que el extracto de *S. horridum* mostró una actividad inhibitoria arriba del 80% a una concentración de 1.25 mg/mL. El inhibidor comercial no presentó mayor actividad en comparación con el extracto y el fucosterol.



Grafica 1. En el eje de las X se muestran las concentraciones 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1562 y 0.07 mg/mL probadas de donepecilo, *S. horridum* y fucosterol. En el eje Y se encuentra el porcentaje de inhibición de cada concentración.

6.2. Caracterización del fucosterol.

El espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) mostró picos (δ in ppm) a 5.15 ppm (1H, q, H-28), 2.2 (1H, s, H-25), 1.24 (3H, d, H-29), 1.01 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d, H-21), 0.98 (3H, d, H-27), 0.97 (3H, s, H-26), 0.68 (3H, s, H-18) (Figura 10 y 11); El espectro de ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) mostró 147.01 (C24), 140.78 (C5), 121.70 (C6), 115.8 (C28), 71.7 (C3), 56.7 (C14), 55.7 (C17), 50.1 (C9), 42.4 (C13), 39.9 (C12), 37.1 (C1), 36.43 (C20), 35.3 (C22), 34.6 (C25), 31.8 (C8), 31.5 (C2), 28.3 (C1 nb6), 25.6 (C23), 24.2 (C15), 22.4 (C27), 22.0 (C26), 21.10 (C11), 19.3 (C19), 18.5 (C21), 13.0 (C29), 11.58 (C18) (Figura 10 y 12). Todos los datos registrados son consistentes con los reportados en otros trabajos (figura 11; Adel et al, 2015; Bouzidi et al, 2014; Chen et al, 2014; Khanavi et al, 2012; Singh et al, 2014).

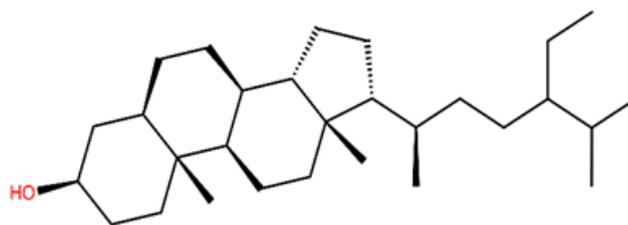


Figura 10. Estructura 2D del fucosterol.

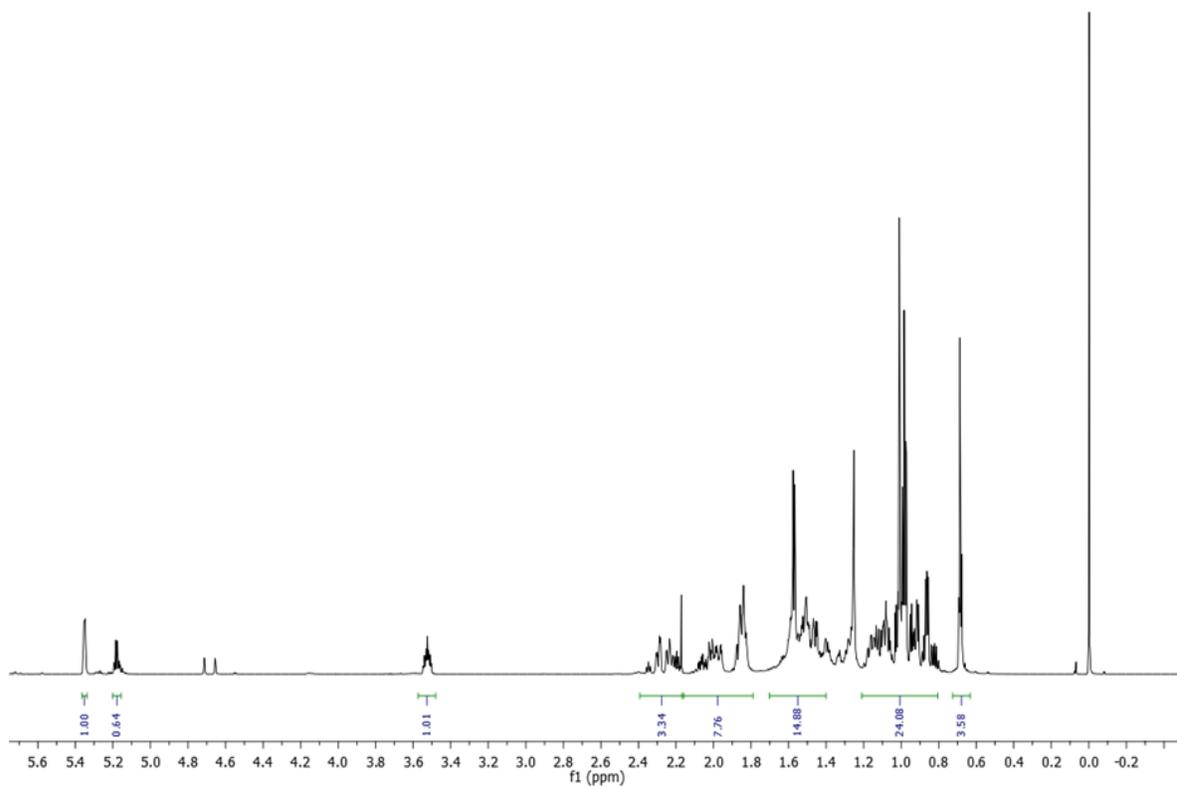


Figura 11. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de fucosterol.

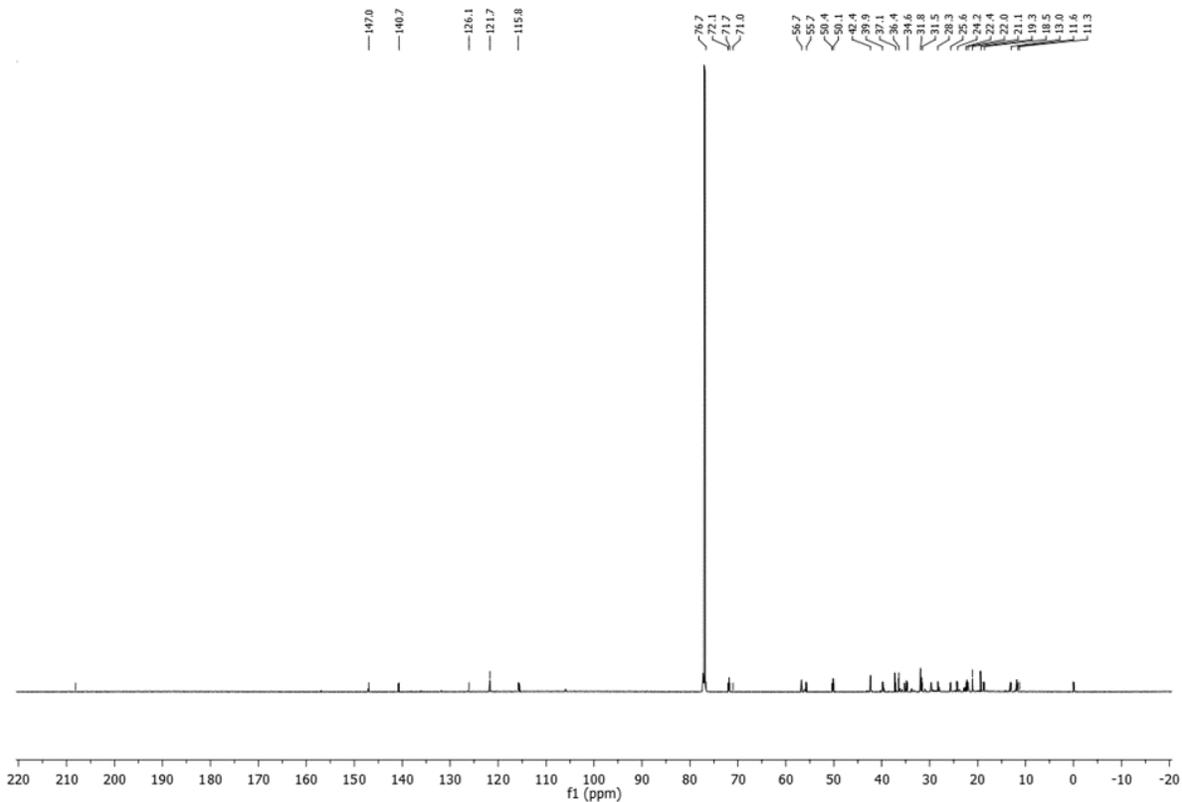


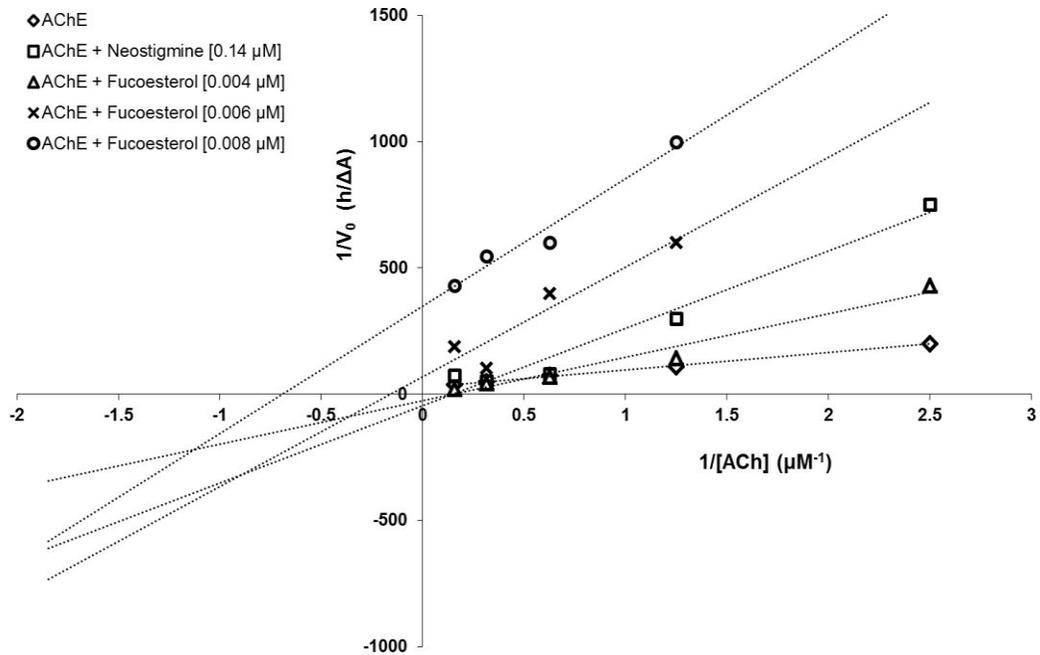
Figura 12. Espectro ^{13}C -NMR de fucosterol.

6.3 Cinética enzimática.

Se determinó el efecto inhibitorio de fucosterol en hAChE utilizando diferentes concentraciones del compuesto y analizándolo en gráficos de Lineweaver-Burk y Dixon con diferentes concentraciones de sustrato e inhibidor (Figura 4). A una concentración de $0.006 \mu\text{M}$ de fucosterol, los valores de V_{max} y K_{m} fueron de $0.015 \text{ } 1/V_0$ ($\Delta\text{A/h}$ y $6.399 \text{ } 1/[\text{ACh}] \text{ mM}^{-1}$ respectivamente. Para neostigmina ($0.14 \mu\text{M}$) los valores fueron $V_{\text{max}}=0.022 \text{ } 1/V_0 \Delta\text{A/h}$ y $K_{\text{m}}=6.726 \text{ } 1/[\text{ACh}] \text{ mM}^{-1}$. Este resultado indicó una mayor afinidad de fucosterol que la neostigmina en hAChE (Tabla II, Grafica 2). Estos datos mostraron que el fucosterol es un inhibidor no competitivo de hAChE (Tabla II).

Tabla II. Efecto del fucosterol y neostigmina en hAChE

	AChE	AChE + Neo[0.14μM]	AChE + fucosterol [0.004μM]	AChE + fucosterol [0.006μM]	AChE + fucostero l [0.008 μM]
V_{max} (1/V_o (ΔA/h	0.038	0.022	0.038	0.015	0.003
K_m (1/[ACh] mM⁻¹)	2.608	6.726	6.591	6.399	1.451



Grafica 2. La grafica muestra la V_{max} y K_m de fucosterol y neostigmina con hAChE. El simbolo \diamond representa a hAChE, el Δ es hAChE y fucosterol a 0.004 μM de concentración; \square hAChE y neostigmina a 0.14 μM ; el simbolo x representa hAChE y fucosterol a 0.006 μM de concentración mientras que \circ AChE y fucosterol a 0.008 μM de concentración.

6.4 Acoplamiento molecular de acetilcolinesterasa, fucosterol y neostigmina.

Los resultados del acoplamiento molecular mostraron que el fucosterol y la neostigmina están acoplados al sitio de unión de AChE que comparte un mapa de contactos similar (Figura 13). La mayoría de los residuos que estabilizan los tres complejos son residuos hidrofóbicos con valores de energía libre en el rango picomolar y nanomolar para fucosterol (-10.68 kcal / mol) y neostigmina (-7.02 kcal / mol), respectivamente. Aunque el complejo hAChE-fucosterol indica la falta de enlaces de hidrógeno implicados en la estabilización del complejo, se observó que su grupo hidroxilo se localiza en las proximidades de Ser293 (≤ 4 Å). La estabilización de neostigmina se caracteriza por el mayor número de interacciones polares, que el grupo N, N, N-trimetilanilinio forma una interacción π -catión con Trp86 y un puente de sal con Glu202 y un enlace de hidrógeno entre el oxígeno del Grupo Dimetilamino-carbonil-oxi. El mecanismo de unión comparativo mostró que el fucosterol y la neostigmina pudieron establecer interacciones similares (Trp86, Gly121, Gly122, Tyr124, Ser125, Glu202, Ser203, Tyr337 e His447) a las observadas para el complejo cocrystalizado entre (-) -huperzina A (HupA) y hAChE (entrada PDB 4ey5).

Por lo tanto, los complejos proteína-ligando obtenidos mediante cálculos de acoplamiento se enviaron a simulaciones de DM de 100 ns de longitud acopladas al enfoque de MMGBSA. El sitio activo catalítico hAChE se localiza en un desfiladero largo y estrecho de aproximadamente 5 Å de diámetro y 20 Å de profundidad que se extiende desde la superficie de la proteína hasta el sitio catalítico. Este desfiladero tiene dos sitios de unión de ligando distintos: el subsitio "aniónico" del sitio catalítico y el sitio periférico "aniónico". El primero está situado cerca del más bajo de la garganta y contiene una tríada catalítica (H440-E327-S200) y un residuo aromático (Trp84), mientras que el último está cerca de la entrada del desfiladero del sitio activo, y contiene Trp279, un importante constituyente de este sitio aniónico.

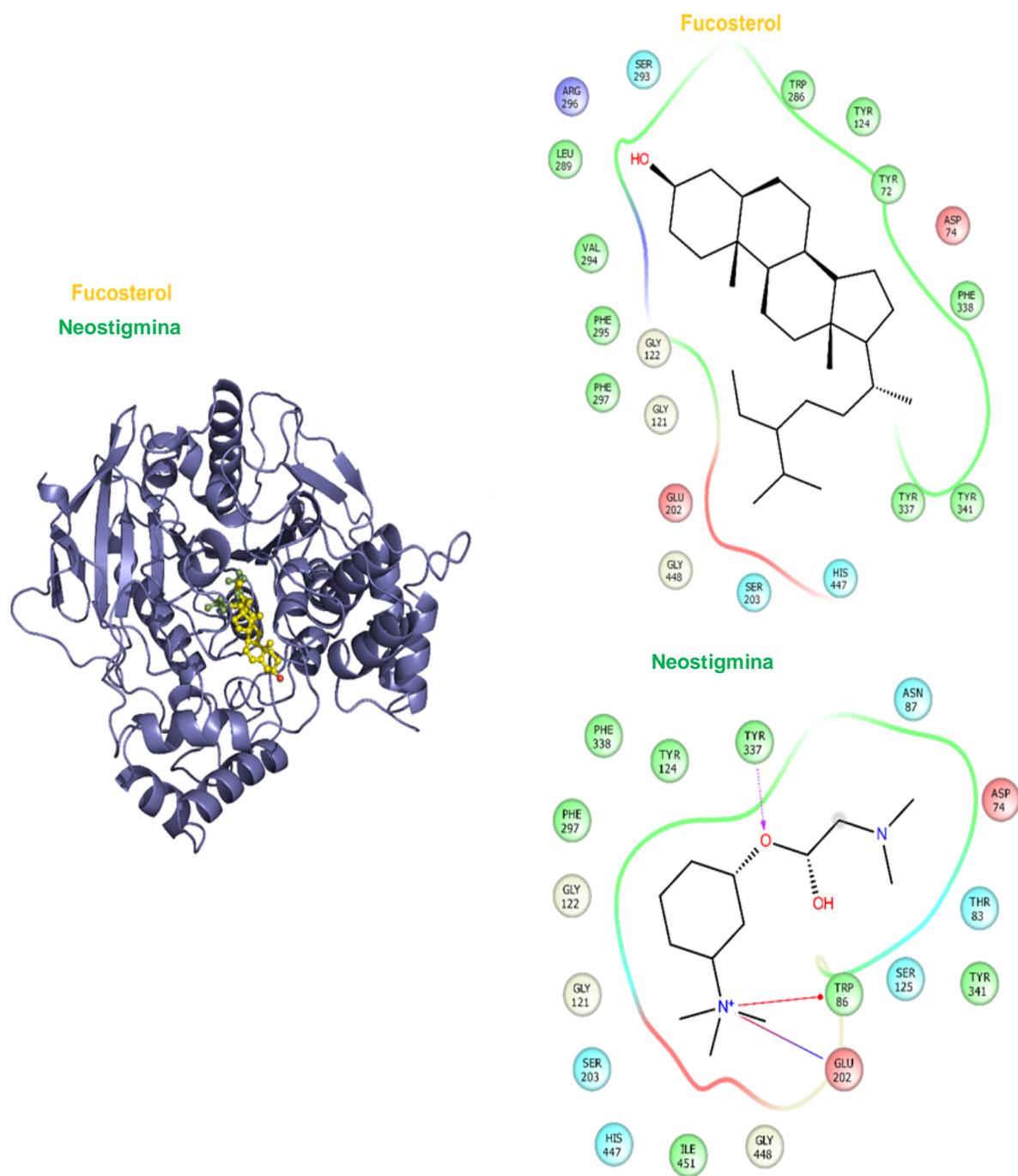


Figura 13. Complejos de acoplamiento y mapa de interacciones entre AChE y fucosterol y neostigmina. Los enlaces de hidrógeno son flechas cargadas con residuos negativos (rojo), cargado positivo (azul), polar (magenta), hidrófobo

(verde) y glicina (gris). Las figuras se realizaron con Maestro Schrödinger versión 10.5.

6.5. Modelado molecular con acetilcolinesterasa: Equilibrio de los complejos de hAChE-ligando.

La estabilidad del complejo AChE-ligando durante las simulaciones DM se midió mediante la evaluación de la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD) y el radio de giro (RG). El análisis de ambos parámetros geométricos demuestra que los complejos AChE-fucoesterol y AChE-neostigmina alcanzaron estabilidad entre 40 y 50 ns (Figura 14) con valores de RMSD de 2.10 ± 0.13 , 2.25 ± 0.14 y 2.15 ± 0.18 Å para AChE-fucoesterol y AChE-neostigmina, respectivamente (Figura 14 A). El análisis de RG mostró valores de 23.28 ± 0.05 y 23.27 ± 0.07 Å para AChE-fucoesterol y AChE-neostigmina, respectivamente (Figura 14 B). Por lo tanto, todos los análisis posteriores se realizaron excluyendo los primeros 50 ns de las simulaciones de DM de 100 ns-long.

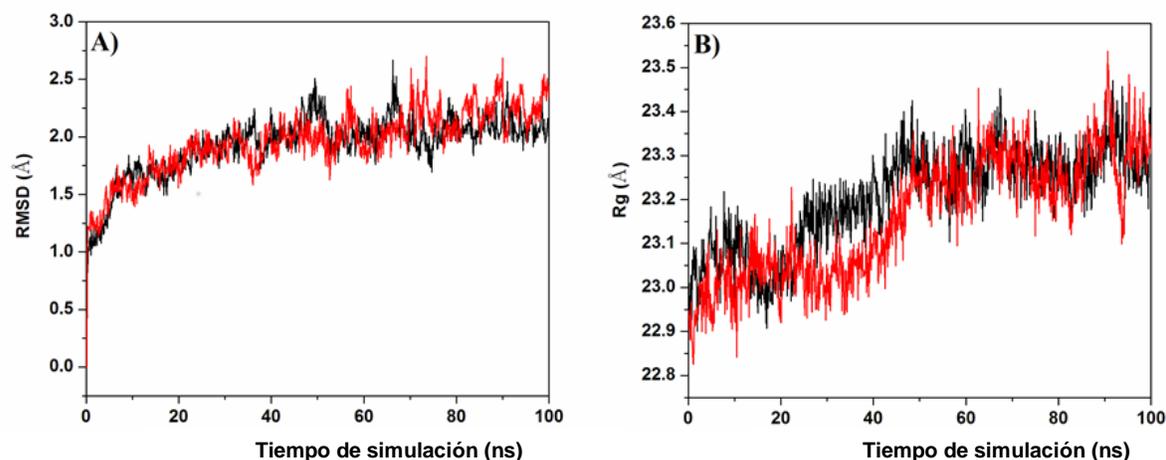


Figura 14. Propiedades de equilibrio de los sistemas AChE-fucoesterol y AChE-neostigmina a través de simulaciones DM. A) RMSD y B) Radio de giro para AChE-fucoesterol (negro) y AChE-neostigmina (rojo).

6.6 Análisis estructural de los complejos de AChE-ligando.

El análisis estructural sobre los complejos más poblados (ver métodos) mostró que los complejos de AChE-fucoesterol y AChE-neostigmina están mayormente estabilizados por residuos hidrófobos. La Figura 15 C muestra que la neostigmina mantuvo un mayor número de interacciones de residuos mediante cálculos de acoplamiento (Trp86, Gly121, Tyr124, Ser125, Glu202 y Tyr337) y otras interacciones no presentes en la conformación inicial pero presentes en la cristalización conjunta (entrada de PDB 4EY5) aparece (Gly126) durante las simulaciones DM. Para el caso del fucoesterol, la mayoría de las interacciones presentes en la conformación inicial desaparecen excepto en Trp86 (Figuras 14 y 15 A). Sin embargo, las nuevas interacciones presentes durante las simulaciones DM también están presentes en el complejo co-cristalizado con galantamina (entrada PDB 4EY6, Phe295, Phe297 y Phe338) o donepezilo (entrada PDB 4EY7, Tyr72, Trp286, Val294, Phe295, Phe338 y Tyr341) .

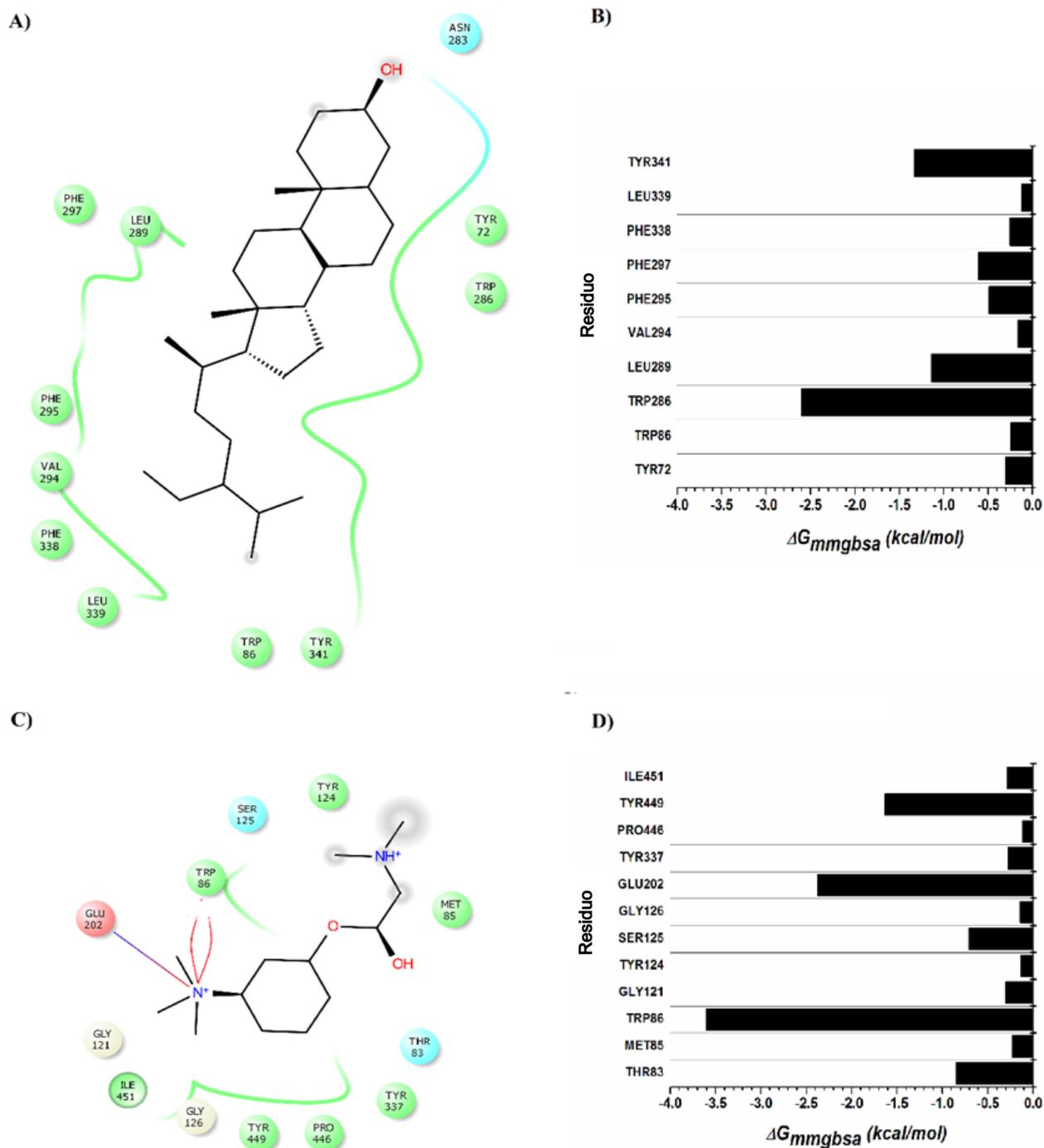


Figura 15. Mapa de interacciones para los sistemas AChE-fucosterol y AChE-neostigmina. Los primeros y más poblados complejos AChE-fucosterol (panel A y

B) y AChE-neostigmina (panel C y D) derivados de un análisis de agrupación se utilizaron para obtener el mapa de interacciones.

6.7. Cálculos de energía libre de enlace en hAChE.

Se llevaron a cabo cálculos de energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) para cuantificar las contribuciones energéticas con respecto a las energías no covalentes en el sitio de unión de los complejos hAChE-fucoesterol y hAChE-neostigmina (véase Material y métodos). Este análisis reveló que los valores de $\Delta G_{\text{unión}}$ para los dos complejos son termodinámicamente favorables para todos los complejos (sin considerar el componente entrópico) (Tabla III). La principal contribución energética a $\Delta G_{\text{unión}}$ fue guiada por las interacciones hidrofóbicas ($\Delta E_{\text{no-polar}} = \Delta E_{\text{vwd}} + \Delta G_{\text{npol, sol}}$), mientras que las contribuciones polares ($\Delta E_{\text{polar}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{pol, sol}}$) muestran un rendimiento termodinámicamente desfavorable que se opone al proceso de unión para todos los complejos. La energía libre de descomposición por residuo nos permite observar la contribución energética de cada residuo estabilizando ambos complejos observados en la figura 12. Este análisis muestra que los residuos con valores $\Delta G_{\text{mmgsa}} \geq -0.5$ kcal / mol, Trp286, Leu289, Phe295, Phe297 y Tyr341 fueron los que más contribuyeron a la final ΔG_{bind} de la estabilización del sistema hAChE-fucoesterol (Figura 15-B). Mientras que Thr83, Trp86, Ser125, Glu202 y Tyr449 son la fuente más de la $\Delta G_{\text{unión}}$ final en la estabilización del sistema hAChE-neostigmina (Figura 15C-D).

Tabla III. Componentes de energía libre (en unidades de kcal/mol) para el complejo AChE-inhibidor usando el enfoque GB. F representa el fucosterol y N neostigmina.

Sistema	ΔE_{vdw}	ΔE_{ele}	$\Delta G_{ele,sol}$	$\Delta G_{npol,sol}$	Epolar	$\Delta E_{non-polar}$	$\Delta G_{unión}$
F	-38.50 (0.15)	-1.68 (0.1)	20.97 (0.1)	4.42 (0.1)	19.29	-42.92	-23.63 (0.12)
N	-29.56 (0.18)	-461.55 (1.2)	472.74 (1.24)	3.95 (0.2)	11.19	-33.51	-22.32 (0.12)

Contribuciones Polares ($\Delta E_{polar} = \Delta E_{ele} + \Delta G_{ele,sol}$) y non-polares ($\Delta E_{non-polar} = \Delta E_{vdw} + \Delta G_{npol,sol}$). Todas las energías se promedian en más de 500 instantáneas a intervalos de tiempo de 100 ps de las últimas 50 ns de producción y están en kcal / mol (\pm desviación estándar).

6.8. Acoplamiento molecular de beta amiloide, galantamina y fucosterol.

El análisis de acoplamiento molecular mostró que el fucosterol tiene interacción con los residuos histidina (His14) y Leucina (Leu34) de la estructura beta amiloide 1z0q (subunidad A). Este complejo tuvo una energía de unión de -6.52 kcal/mol y K_i de 16.49 μ M (Figura 16). Así mismo en la figura 17 la subunidad A de 1z0q y galantamina. Los residuos de interacción donde se observaron puentes de hidrógeno fueron glutamato (Glu3), fenilalanina (Phe4) y arginina (Arg5); interacciones hidrofóbicas con aspartato (Asp1), alanina (Ala2), serina (Ser8), valina (Val12) con una energía de unión de -6.03 kcal/mol.

Por otro lado, en la figura 18 se observan interacciones con las subunidades A, B, C, D y E de la estructura beta amiloide (βA_{1-42}) denominada 2beg. Los residuos de interacción con el fucosterol fueron la metionina (Met 35), valina (Val36) y Glicina (Gly37) para las subunidades B, C, D y E. Para las subunidad A sólo se mostró interacción con (Gly37) y para C también con valina (Val39). La energía de unión fue -8.4 y K_i de 697.17 μ M. En la figura 19 se observa a las subunidades A-E de 2beg y su interacción con galantamina. El residuo de interacción con que se observó puente de hidrógeno fue valina (Val39) en la subunidad E así como interacciones con

leucina (Leu17) y fenilalanina (Phe19); interacciones con leucina (Leu17), fenilalanina (Phe19) y valina (Val37) con la subunidad D.

Por su parte la figura 20 muestra el análisis de acoplamiento de la estructura beta amiloide 2mxu y el fucosterol, dónde los residuos de interacción fueron valina (Val12) e isoleucina (Ile32) para la subunidad A; leucina (Leu17), isoleucina (Ile32) y Glicina (Gly33) para la subunidad B; histidina (His14), leucina (Leu17), leucina (Leu34), isoleucina (ILE32) y Glicina (Gly33) para la subunidad C; histidina (His14) y Glicina (Gly33) para la subunidad D. La energía de unión fue -9.49 y Ki de 110.45 uM. En la figura 21 se observan las subunidades A-L de 2mxu ($A\beta_{1-42}$) y galantamina. Los residuos de interacción fueron valina (Val12), isoleucina (Ile32), glicina (Gly33), leucina (Leu34) para la subunidad A; histidina (His14), isoleucina (Ile32), glicina (Gly33) y leucina (Leu34) para la subunidad B; isoleucina (Ile32) y glicina (Gly33) para la subunidad C.

El fucosterol mostró residuos de interacción con la estructura de beta amiloide 2nao en tirosina (Tyr10), histidina (His13) y lisina (Lis16) para la subunidad A; tirosina (Tyr10), valina (Val12), histidina (His13), histidina (His14), lisina (Lys16) y alanina (Ala21) para la subunidad B; alanina (Ala21) para la subunidad C. La energía de unión fue -7.82 y Ki de 1.87 Um (Figura 22). Así mismo, la figura 23 se observan las subunidades A-F de 2nao y galantamina. Fue evidente la formación de puentes de hidrógeno con valina (Val12) en la subunidad D, con glutámico (Glu11) y valina (Val12) en la subunidad E. También interacciones hidrofóbicas con tirosina (Tyr10) en la subunidad D, histidina (His6, His13) y tirosina (Tyr10) con la subunidad E; interacción con histidina (His6), glicina (Gly9) y valina (Val12) en la subunidad F.

La figura 24 muestra la estructura del beta amiloide 5kk3 y el fucosterol. Los residuos de interacción fueron histidina (HIS13) para la subunidad D; glicina (Gly38) y valina (Val39) para la subunidad J; glicina (Gly38), valina (Val39) y valina (Val40) para las subunidades K,L,M; glicina (Gly38) y valina (Val40) para la subunidad N. En la figura 25 se observan las subunidades A-R de 5kk3 ($A\beta_{1-42}$) y galantamina. Se observaron puentes de hidrógeno con valina (Val18) y alanina (Ala21) para la subunidad L; valina (Val18), fenilalanina (Phe19), alanina (Ala21) y glutámico (Glu22)

para la subunidad M; valina (Val18), fenilalanina (Phe20), alanina (Ala21) y glutámico (Glu22) para la subunidad N. Por último, glutámico (Glu22) en la subunidad O.

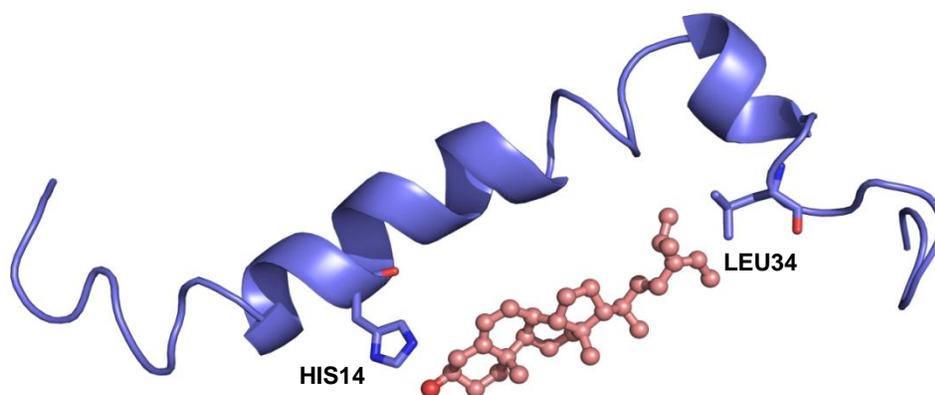


Figura 16. Se observa la Sub-unidad A de 1z0q (azul) y fucosterol (rosa). Los residuos de interacción fueron histidina (HIS14) y Leucina (LEU34) con una energía de unión de -6.52 y K_i de 16.49 μM .

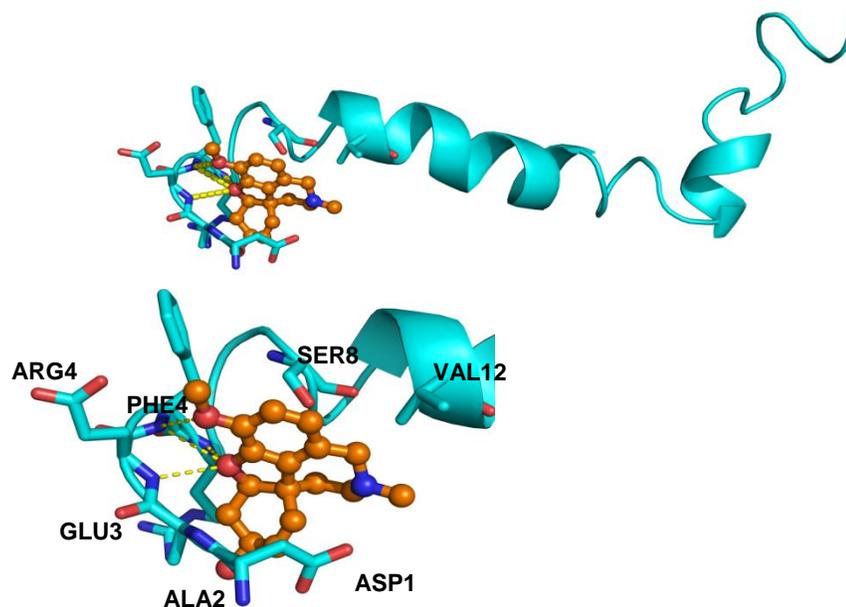


Figura 17. Se muestra la subunidad A de 1z0q (azul) y galantamina (naranja). Los residuos de interacción donde se observaron puentes de hidrógeno con glutamato (GLU3), fenilalanina (PHE4) y arginina (ARG5); interacciones hidrófobas con aspartato (ASP1), alanina (ALA2), serina (SER8), valina (VAL12); la energía de unión fue de -6.03 kcal / mol y k_i de 37.76 μM .

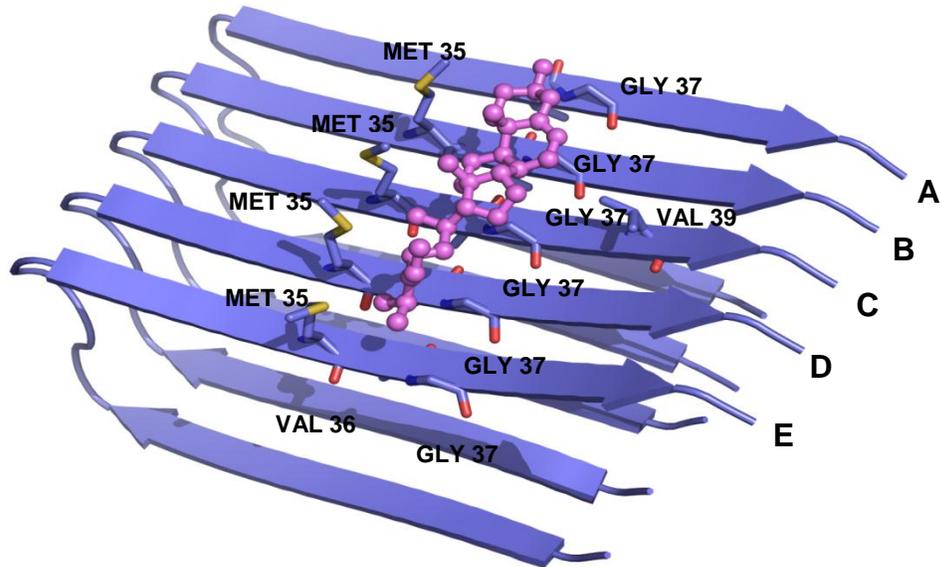


Figura 18. Muestra las subunidades A, B, C, D y E de 2beg (azul) y fucosterol (rosa). Los residuos de interacción fueron metionina (MET35), valina (VAL36) y glicina (GLY37) para las subunidades B, C, D y E. Para las subunidad A, solo se mostró la interacción con (GLY37) y para la sub-unidad C también con la valina (VAL39). La energía de enlace fue -8.4 y K_i de 697.17 μ M.

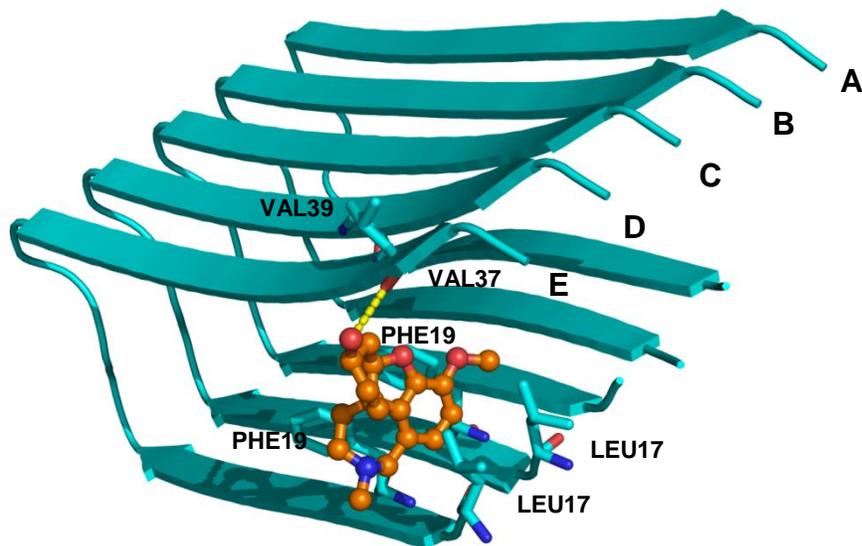


Figura 19. Muestra las subunidades A-E de la estructura beta amiloide 2beg (azul) y galantamina (naranja). El residuo de interacción con el que se observó enlace hidrógeno fue la valina (VAL39) en la subunidad E, así como las interacciones con leucina (LEU17) y fenilalanina (PHE19); también interacciones con leucina

(LEU17), fenilalanina (PHE19) y valina (VAL37) en la subunidad D. La energía de unión fue de -6.05 kcal / mol y k_i 36.28 μ M.

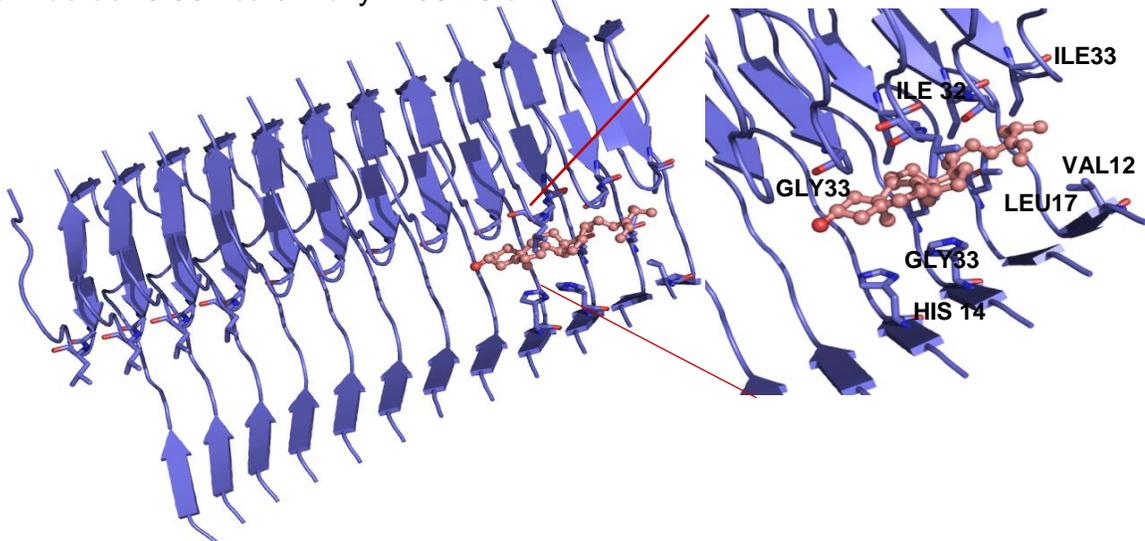


Figura 20. Muestra las subunidades A-L de la estructura beta amiloide 2mxu (azul) y fucosterol (rosa). Los residuos de interacción fueron valina (VAL12) e isoleucina (ILE32) para la subunidad A; leucina (LEU17), isoleucina (ILE32) y glicina (GLY33) para la subunidad B; histidina (HIS14), leucina (LEU17, 34), isoleucina (ILE32) y glicina (GLY33) para la subunidad C; histidina (HIS14) y glicina (GLY33) para la subunidad D. La energía de enlace fue de -9.49 y K_i de 110.45 μ M.

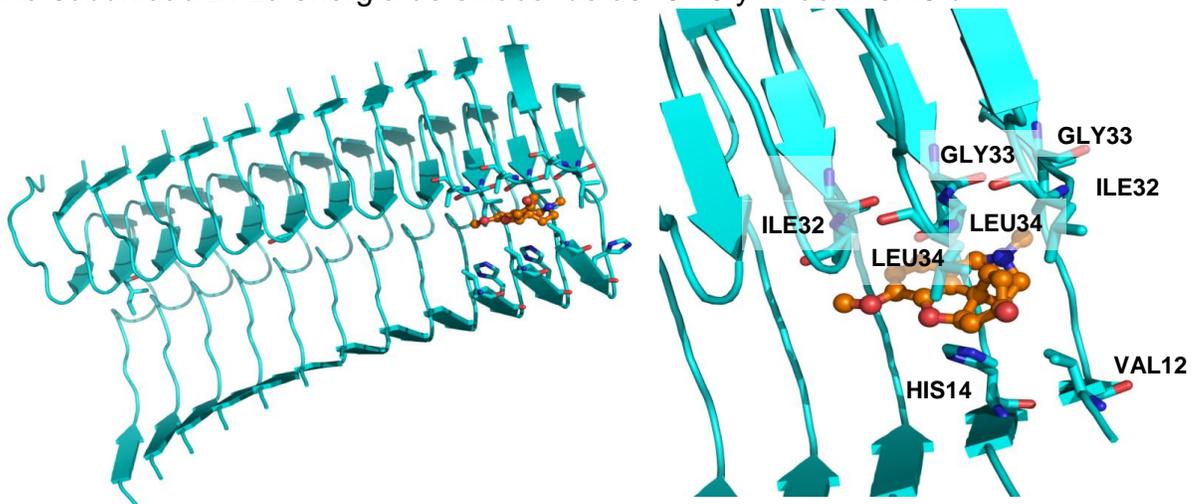


Figura 21. Muestra las subunidades A-L de la estructura beta amiloide 2mxu (azul) y galantamina (naranja). Los residuos de interacción fueron valina (VAL12), isoleucina (ILE32), glicina (GLY33), leucina (LEU34) para la subunidad A; histidina (HIS14), isoleucina (ILE32), glicina (GLY33) y leucina (LEU34) para la subunidad B;

isoleucina (ILE32) y glicina (GLY33) para la subunidad C. La energía de unión de galantamina fue de -6.57 kcal / mol y 15.24 μ M.

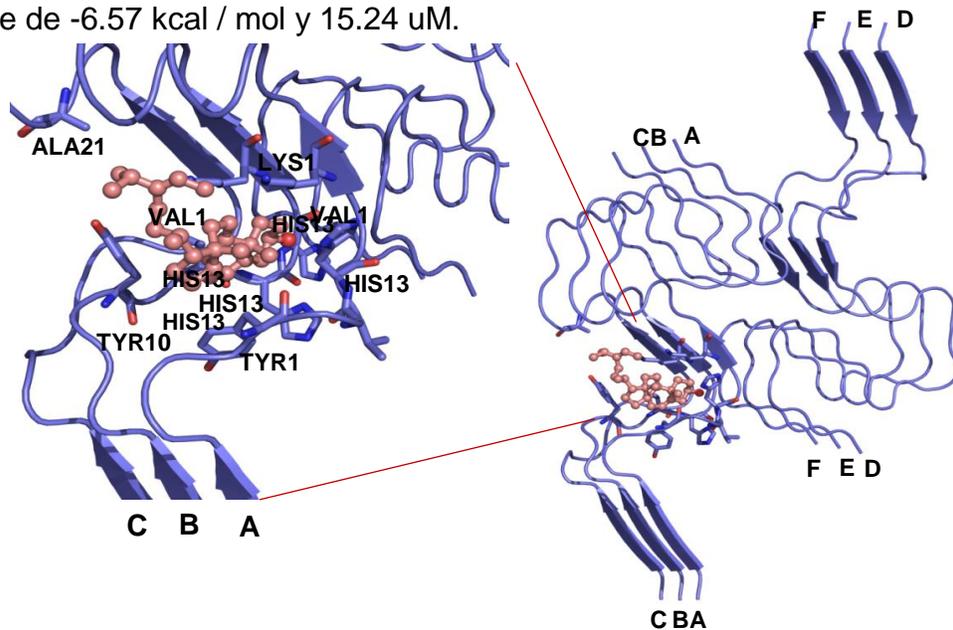


Figura 22. Muestra las subunidades A-F de la estructura beta amiloide 2nao (azul) y fucosterol (rosa). Los residuos de interacción fueron tirosina (TYR10), histidina (HIS13) y lisina (LIS16) para la subunidad A; tirosina (TYR10), valina (VAL12), histidina (HIS13), histidina (HIS14), lisina (LYS16) y alanina (ALA21) para la subunidad B; alanina (ALA21) para la subunidad C. La energía de enlace fue de -7.82 y K_i de 1.87 μ M.

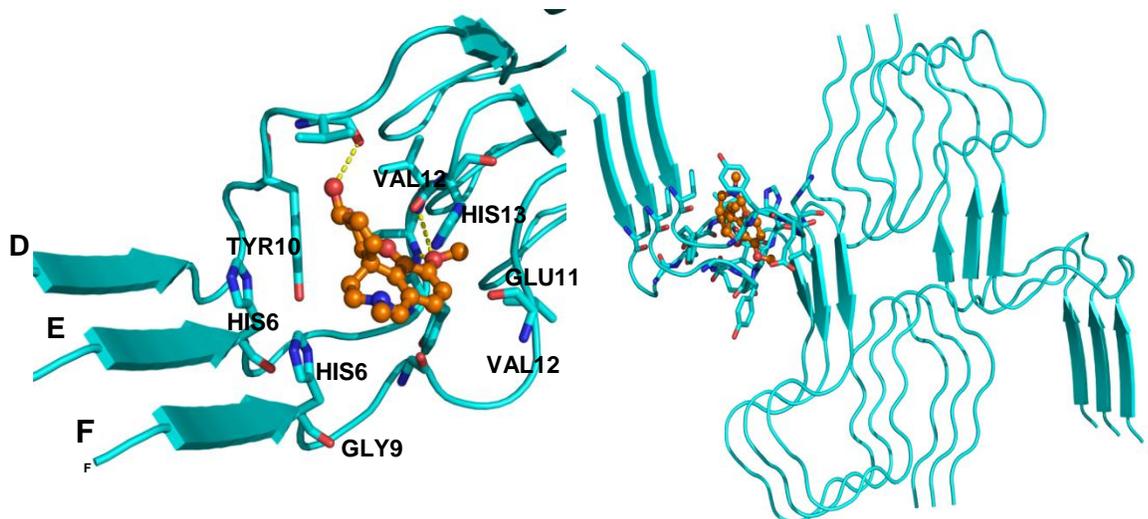


Figura 23. Muestra las subunidades A-F de la estructura beta amiloide 2nao (azul) y galantamina (naranja). Se observaron puentes de hidrógeno con valina (VAL12) en la subunidad D y con glutámico (GLU11) y valina (VAL12) con la

subunidad E. También interacciones hidrófobas con tirosina (TYR10) en la subunidad D, histidina (HIS6, HIS13) y tirosina (TYR10) con la subunidad E; interacción con histidina (HIS6), glicina (GLY9) y valina (VAL12) en la subunidad F. Esta interacción refleja una energía de enlace de -7.71 kcal / mol y ki 2.24 μ M.

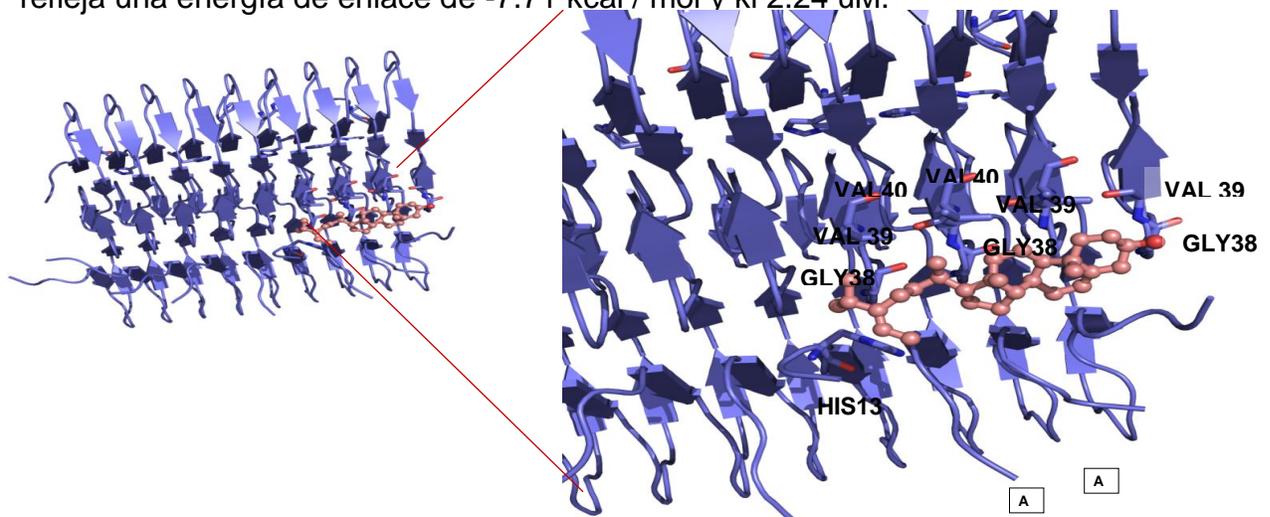


Figura 24. Muestra las subunidades A-R de la estructura amiloide beta 5kk3 (azul) y fucosterol (rosa). Los residuos de interacción fueron histidina (HIS13) para la subunidad D; glicina (GLY38) y valina (VAL39) para la subunidad J; glicina (GLY38), valina (VAL39) y valina (VAL40) para las subunidades K, L, M; glicina (GLY38) y valina (VAL40) para la subunidad N. La energía de enlace para eso fue de -8.11 kcal / mol y ki de 1.13 μ M.

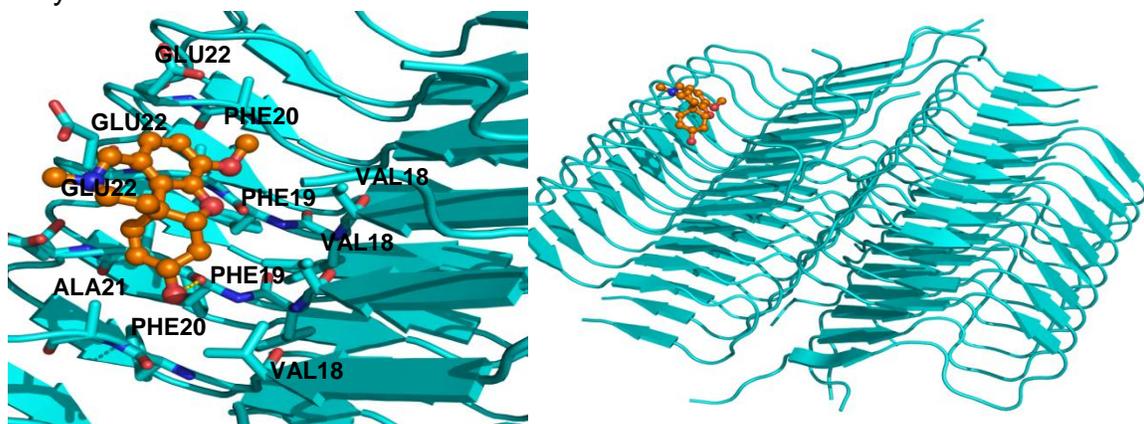


Figura 25. Muestra las subunidades A-R de la estructura beta amiloide 5kk3 (azul) y galantamina (naranja). Se observaron huesos de hidrógeno con valina (VAL18) y alanina (ALA21) para la subunidad L; valina (VAL18), fenilalanina (PHE19), alanina (ALA21) y glutámico (GLU22) para la subunidad M; valina (VAL18), fenilalanina

(PHE20), alanina (ALA21) y glutámico (GLU22) para la subunidad N. Finalmente glutámico (GLU22) en la subunidad O. Estas interacciones reflejan una energía de enlace de -6.82 kcal / mol y k_i 10.1 μ M.

6.9. Microscopia de fuerza atómica (MFA).

Se utilizó MFA para estudiar el tamaño y morfología de los agregados $A\beta_{1-42}$ en ausencia o presencia de fucosterol y galantamina después de 24 h de incubación en condiciones de formación de fibrillas. La morfología de los agregados de $A\beta_{1-42}$ en presencia de compuestos seleccionados es muy diferente al de fibrillas obtenidas por la incubación de $A\beta_{1-42}$ sin compuestos. La figura 26 A muestra la característica fibrillas de $A\beta_{1-42}$, que son aproximadamente de 30 nm en ancho y 20 nm de altura. La incubación de $A\beta_{1-42}$ en presencia de los compuestos, sin embargo, favorece el predominio de monómeros $A\beta_{1-42}$ con un radio de 2 nm (Fig. 26 B, C); en la figura 26 D se observa a la galantamina con $A\beta_{1-42}$, dónde es clara la oligomerización aún. Por lo tanto, los datos sugieren que el fucosterol es mejor para inhibir la oligomerización de $A\beta_{1-42}$.

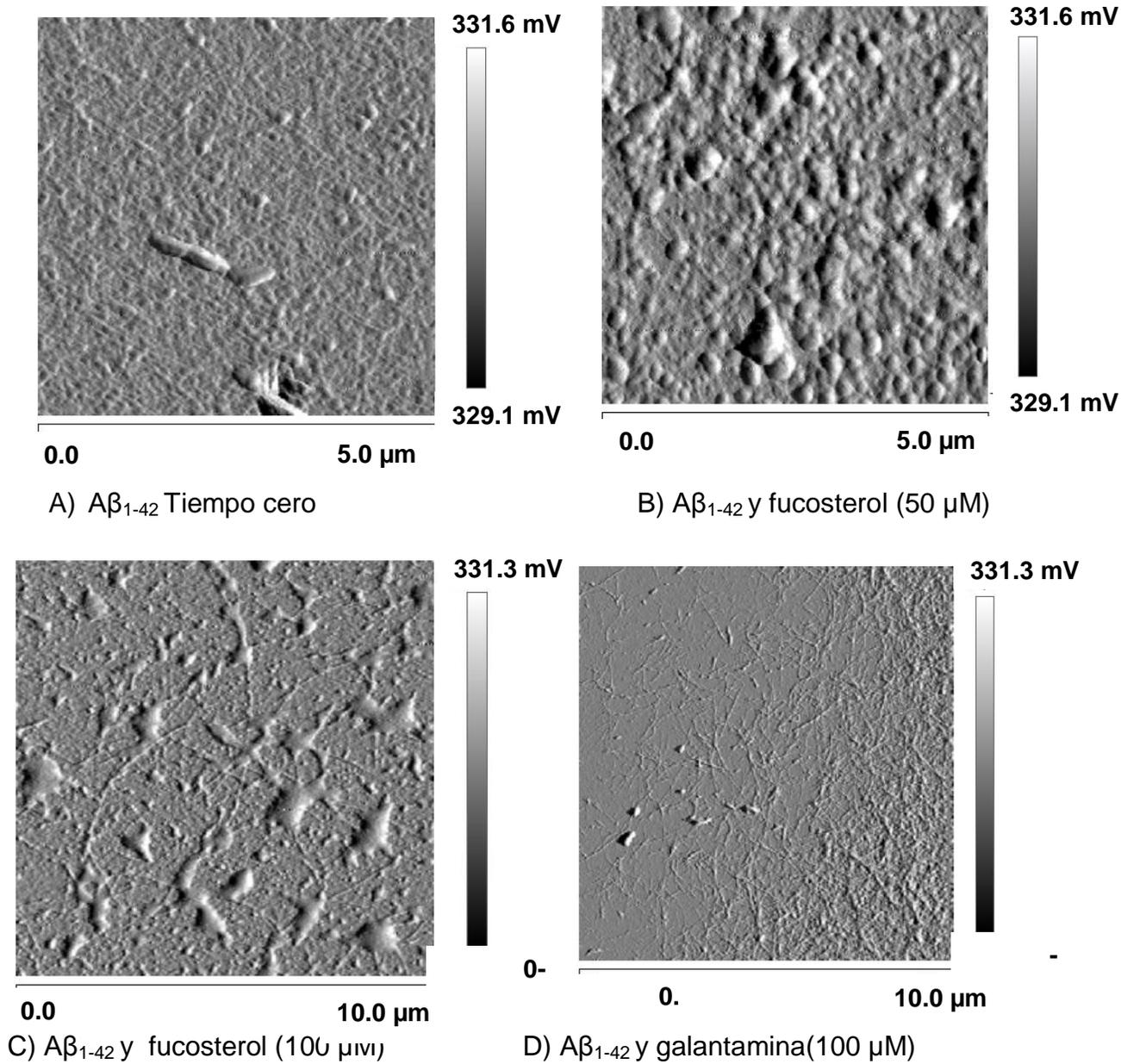
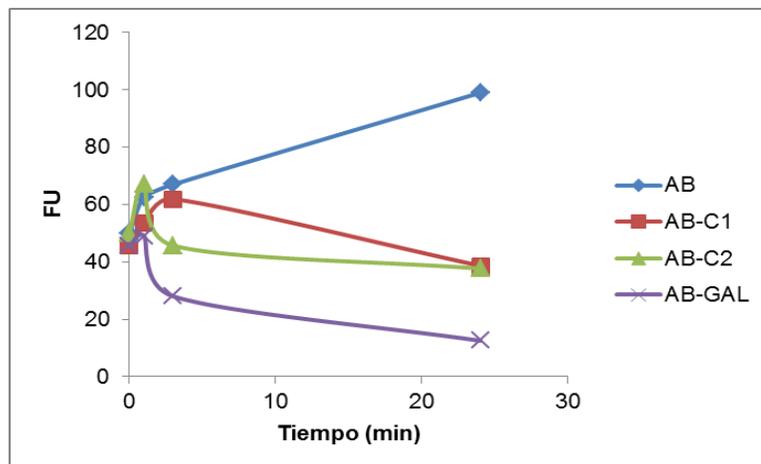


Figura 26. En la figura se muestran las imágenes de MFA. La letra A es $A\beta_{1-42}$ después de la incubación de 37° C, en B se observa $A\beta_{1-42}$ y fucosterol (50 μM), en C $A\beta_{1-42}$ y fucosterol (100 μM) y D es $A\beta_{1-42}$ y galantamina (100 μM).

6.10. Fluorescencia con tioflavina (ThT).

La señal de fluorescencia permite dilucidar cómo la tioflavina (ThT) aumenta cuando está unido a estructuras o agregados proteicos mal plegados. Se ensayó el péptido $A\beta_{1-42}$ no fibrilado como control del proceso de fibrilación, siendo el aumento en la intensidad de la señal de fluorescencia de ThT asociado con fibrilación de $A\beta_{1-42}$ (Gráfica 3). El curso del tiempo de la formación de fibrillas se observó a través del monitoreo continuo de los cambios en la intensidad de fluorescencia ThT en 480 nm durante 24 h, ya que este período es suficiente para la formación de fibrillas en condiciones de incubación y agitación.

La adición del fucosterol (50 y 100 μM) mostró prevenir la fibrilación de beta amiloide, ya que después de la adición, la señal de fluorescencia para el ThT sufrió un pequeño aumento, mientras que $A\beta_{1-42}$ solo mostró un rápido aumento en la señal de fluorescencia de ThT. Estos resultados se muestran en la Gráfica 3, que representa una curva de crecimiento en dos fases típica de formación de fibrillas amiloide; en el final de la incubación (24 h), fue posible observar que el fucosterol a una concentración de 100 μM es capaz de inhibir la formación de fibrillas en un 96%, mientras que el compuesto a una concentración de 50 μM inhibió en 85%. Estos resultados se corroboran con los obtenidos en el acoplamiento molecular.



Gráfica 3. En la gráfica se observa el tiempo de recorrido en el proceso de fibrilación (0, 1, 3, 24 h), obtenido a emisión de 480 nm en el espectro de fluorescencia. La línea azul representa a $A\beta_{1-42}$ (rombos-AB), línea roja a $A\beta_{1-42}$ y

fucosterol (50 μM ; cuadrado-AB-C1), línea verde a $\text{A}\beta_{1-42}$ y fucosterol (100 μM ; triánguloAB-C2) y línea morada $\text{A}\beta_{1-42}$ y galantamina (100 μM , cruz-AB-GAL).

6.11. Electroforesis de fucosterol con βA_{1-42} .

El gel de poliacrilamida es la matriz que tiene como característica retener a las proteínas manteniéndolas uniformes antes que ellas migren hacia el gel de resolución. Este proceso permite mejorar la resolución de las proteínas; como se observa en la figura 27, sólo el marcador viajó por todo el gel.



Figura 27. Se muestra la electroforesis realizada con $\text{A}\beta_{1-42}$, fucosterol y galantamina. Donde 0) Azul de comasie, 1) es $\text{A}\beta_{1-42}$, 2) $\text{A}\beta_{1-42} + \text{GAL}$, 3) $\text{A}\beta_{1-42} + \text{F}$ (50 μM) y 4) $\text{A}\beta_{1-42} + \text{F}$ (100 μM)

7. Discusión.

7.1. Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

Gannhadi y colaboradores (2013) establecen que extractos del género *Sargassum* fueron los más activos probados en sus estudios contra acetilcolinesterasa; *Sargassum angostifolium* mostró IC_{50} de 5 mg/mL, *Sargassum olygosistum* de 2.5 mg/mL y *Sargassum boveanum* de 1 mg/mL en el ensayo de microplaca para acetilcolinesterasa. Ellos adjudican esta actividad de los alcaloides, terpenoides, glucósidos informados previamente, dos plastoquinonas, ácido sargaquinoico y sargacromenol. Los últimos tres compuestos mencionados mostraron actividad inhibitoria moderada de AChE en un rango micromolar y se aislaron de *S. serratifolium* y *S. sagamianum*. En el presente estudio, el extracto etanólico de *S. horridum* mostró una inhibición de 80% en la acetilcolinesterasa de anguila eléctrica con una concentración de 1.25 mg/mL, lo cual es semejante reportado en párrafos anteriores y el fucosterol mostró una inhibición más del 90% a una concentración de 0.625 mg/ mL (Grafica 1).

De acuerdo con Andrade y colaboradores (2013) las Phaeophytas han demostrado ser el grupo más prometedor en cuanto a la inhibición colinesterasica (ChE), debido a la gran cantidad de fucosterol presente en algunas especies. No obstante, el fucosterol obtenido a partir del fraccionamiento con solventes no polares ha sido mayormente utilizado en investigaciones de bioactividad como antioxidante, antidiabético y hepatoprotectoras (Yoon et al, 2008). Así mismo, Yoon y colaboradores (2008) reportaron que el fucosterol inhibió la actividad de AChE a concentraciones >500 mM y Kumar y colaboradores (2009) demostraron que el fucosterol ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) tiene una actividad anticolinérgica del 94% de la acetilcolina en el músculo. Así mismo compararon las propiedades del fucosterol con el compuesto farmacológico pancuronio y descubrieron que se une a los sitios colinoreceptivos y bloquea la acción del transmisor de la acetilcolina, lo que podría sugerir que el mecanismo de acción del fucosterol está mediado por el bloqueo de los receptores muscarínicos.

Ahmed y colaboradores (2006) estudiaron los esteroides de *Haloxylon recurvum*, identificando a los esteroides como posibles inhibidores de la colinesterasa. En sus estudios el haloxiesteroil A mostr6 actividad inhibidora en un ensayo *in vitro* (IC_{50}) de $8.3 \pm 0.02 \mu M$ y $K_i = 7.6 \pm 0.01 \mu M$. Del mismo modo, el 24-etil-colest-6-eno-3,5-diol mostr6 mayor actividad a concentraciones de $3.5 \pm 0.03 \mu M$ y $4.0 \pm 0.09 \mu M$, respectivamente. Se consider6 que ambos compuestos tenian inhibici6n no competitiva. Suganthy y colaboradores (2010) realizaron estudios *in vitro* de extractos metan6licos de diversas algas marinas d6nde *Hypnea valentiae*, *Padina gymnospora*, *Ulva reticulata* y *Gracilaria edulis* exhibieron actividad inhibidora en AChE con un valor de IC_{50} de 2.6, 3.5, 10 y 3 mg/mL, respectivamente. *U. reticulata* mostr6 un valor de K_i menor a 0.735 ± 0.02 ($K_m = 1.34 \pm 0.12 \text{ 1 / [ACh] mM}^{-1}$) comparado con el donepezil y otras algas marinas. Estos autores consideraron que un potente inhibidor colinesterasico puede actuar como un buen neuroprotector porque cuanto m6s peque1o es el valor K_i m6s fuerte es la inhibici6n.

En el presente trabajo se evalu6 la cin6tica enzim6tica de la acetilcolinesterasa humana (hAChE) y el fucosterol obtenido de *S. horridum* utilizando gr6ficos de Lineweaver-Burk y Dixon con diferentes concentraciones de sustrato e inhibidor (Grafica 2). A una concentraci6n de $0.006 \mu M$ de fucosterol, los valores de V_{max} y K_m fueron de $0.015 \text{ 1 / } V_o$ ($\mu A / \text{hy}$ $6.399 \text{ 1 / [ACh] mM}^{-1}$), respectivamente. Para la neostigmina ($0.14 \mu M$) los valores fueron $V_{max} = 0.022 \text{ 1 / } V_o$ ($\mu A / \text{hy}$ $K_m = 6.726 \text{ 1 / [ACh] mM}^{-1}$). Este resultado indica una mayor afinidad de fucosterol que la neostigmina en hAChE (Tabla II, Grafica 2). Estos datos mostraron que el fucosterol es inhibidor de hAChE no competitivo.

Vale la pena se1alar el hecho de que un compuesto puro como fucosterol tiene una mayor actividad inhibidora de AChE en comparaci6n con el extracto crudo de *S. horridum*, ya que en algunos casos sucede lo contrario. La AChE humana es sensible a los inhibidores reversibles e irreversibles. Mientras que la inhibici6n irreversible puede ser perjudicial al bloquear bruscamente la neurotransmisi6n mediada por acetilcolina, los inhibidores de AChE reversibles pueden modelar moderadamente la inhibici6n de AChE al prolongar la acci6n en

sus receptores postsinápticos. Los inhibidores de AChE son efectivos para tratar algunas enfermedades en las que hay una falta de ACh (*Miastenia gravis*) debido a su producción reducida (enfermedad de Alzheimer) (Ahmed et al 2006, Kumar et al, 2009; Yoon et al, 2008).

En cuanto al acoplamiento molecular se refiere, el sitio activo catalítico de hAChE se localiza en un desfiladero largo y estrecho de aproximadamente 5 Å de diámetro y 20 Å de profundidad que se extiende desde la superficie de la proteína hasta el sitio catalítico. Este desfiladero tiene dos sitios de unión para el ligando que son distintos: el subsitio "aniónico" del sitio catalítico y el sitio periférico "aniónico". El primero está situado cerca de la parte más baja de la garganta y contiene una tríada catalítica (H440-E327-S200) y un residuo aromático (Trp84), mientras que el último está cerca de la entrada del desfiladero del sitio activo, y contiene Trp279, un importante constituyente de este sitio aniónico. En el medio de este desfiladero, hay una región estrecha formada por las cadenas laterales de F330 e Y12 que solo permiten el paso de la molécula de agua (Liu et al., 1986; Sussman et al, 1991). Aunque este hecho significa que el sustrato no entraría en la garganta de la enzima si esta región proteínica fuera completamente rígida, los estudios de simulación de DM en ratones AChE demostraron una ampliación de la garganta en la escala de tiempo de nanosegundos que permite el acceso del ligando al sitio catalítico activo (Peters et al., 2016).

Para el caso de los esteroides, Ahmed y colaboradores (2006) revelaron que el patrón de actividad de diferentes esteroides contra hAChE y hBuChE depende de los enlaces -OH y olefina. Estas funcionalidades parecen jugar un papel clave en el potencial inhibidor de estos compuestos, tal vez mediante la formación de puentes de hidrógeno e interacciones π - π con los residuos de aminoácidos del sitio activo de AChE y BChE. Aunado a esto, recientes hallazgos han demostrado que además de su función catalítica, AChE puede mediar en su otro sitio aniónico periférico relacionado, por ejemplo, la formación de fibrillas en el proceso de deposición de procesos de péptidos amiloides (Fallarero et al, 2008). Hoy en día, una mejor opción para el tratamiento de la EA se ha centrado en los inhibidores de AChE que son capaces de unir los sitios catalíticos y periféricos de la enzima.

Teniendo en cuenta la literatura y nuestros hallazgos experimentales, se realizaron análisis moleculares de acoplamiento con fucosterol como inhibidor potencial de AChE en comparación con neostigmina, un conocido inhibidor de hAChE sintético que actúa como un inhibidor no competitivo de hAChE. Los resultados del acoplamiento molecular mostraron que el fucosterol y la neostigmina están acoplados al sitio de unión de AChE que comparte un mapa de contactos similar (Figura 15). La mayoría de los residuos que estabilizan los dos complejos son residuos hidrofóbicos con valores de energía libre en el rango picomolar y nanomolar para fucosterol (-10,68 kcal/mol) y neostigmina (-7,02 kcal/mol), respectivamente, lo que sugiere una mayor afinidad del fucosterol por AChE que la neostigmina. Aunque el complejo AChE-fucosterol indica la falta de enlaces de hidrógeno implicados en la estabilización del complejo, se observó que su grupo hidroxilo se localiza en las proximidades de Ser293 ($\leq 4 \text{ \AA}$). Esta proximidad permite la formación de un enlace de hidrógeno, de acuerdo con informes anteriores que señalan la importancia de los grupos OH en la formación de interacciones polares (Ahmed et al., 2006).

La estabilización de neostigmina se caracteriza por el mayor número de interacciones polares, que el grupo N, N, N-trimetilanilinio forma una interacción π -catión con Trp86, un puente de hidrógeno con Glu202 y un enlace de hidrógeno entre el oxígeno del grupo oxo-carbonilo-dimetilamino. El mecanismo de unión comparativo mostró que el fucosterol y la neostigmina pudieron establecer interacciones similares (Trp86, Gly121, Gly122, Tyr124, Ser125, Glu202, Ser203, Tyr337 e His447) a las observadas para el complejo cocrystalizado entre (-) -huperzina A (HupA) y hAChE (entrada PDB 4EY5). Esta similitud sugiere que el fucosterol actúa como un inhibidor competitivo de hAChE en contraste con los resultados de los ensayos cinéticos enzimáticos. Aunque los procedimientos del acoplamiento nos permiten identificar la postura de enlace de los ligandos evaluados, la persistencia de las conformaciones proteína-ligando predichas por Autodock debe corroborarse empleando métodos más robustos como las simulaciones DM, por lo tanto, los sistemas proteína-ligando obtenidos a través de

los estudios de acoplamiento molecular fueron enviados a simulaciones de DM de 100 ns de largo acopladas al enfoque de MMGBSA.

Por otro lado, la estabilidad del complejo AChE-ligando durante las simulaciones DM se midió mediante la evaluación de la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD) y el radio de giro (RG) (Figura 14). El análisis de ambos parámetros geométricos demuestra que los complejos AChE-fucoesterol y AChE-neostigmina alcanzaron estabilidad entre 40 y 50 ns (Figura 14) con valores de RMSD de 2.10 ± 0.13 , 2.25 ± 0.14 y 2.15 ± 0.18 Å para AChE-fucoesterol y AChE-neostigmina, respectivamente (Figura 14 A). El análisis de RG mostró valores de 23.28 ± 0.05 y 23.27 ± 0.07 Å para AChE-fucoesterol y AChE-neostigmina, respectivamente (Figura 14 B). Por lo tanto, todos los análisis posteriores se realizaron excluyendo los primeros 50 ns de las simulaciones de DM a 100 ns de longitud.

El análisis estructurales sobre los complejos (ver métodos) mostró que los análisis de AChE-fucoesterol y AChE-neostigmina están mayormente estabilizados por residuos hidrófobos. La Figura 15 C muestra que la neostigmina mantuvo un mayor número de interacciones de residuos mediante cálculos de acoplamiento (Trp86, Gly121, Tyr124, Ser125, Glu202 y Tyr337) y otras interacciones no presentes en la conformación inicial pero presentes en la cristalización conjunta (entrada de PDB 4EY5) aparece (Gly126) durante las simulaciones DM. Para el caso del fucoesterol, la mayoría de las interacciones presentes en la conformación inicial desaparecen excepto en Trp86 (Figuras 14 y 15 A).

Sin embargo, las nuevas interacciones presentes durante las simulaciones DM también están presentes en el complejo co-cristalizado con galantamina (entrada PDB 4EY6, Phe295, Phe297 y Phe338) o donepezilo (entrada PDB 4EY7, Tyr72, Trp286, Val294, Phe295, Phe338 y Tyr341) . Esto indica que el fucoesterol cambia su coordinación inicial a un estado mejor estabilizado con residuos que pertenecen al sitio "aniónico" periférico. Mientras que el acoplamiento de neostigmina está de acuerdo con la estabilización del subsitio "aniónico" del sitio catalítico. Las diferencias en el reconocimiento molecular en AChE son comprensibles por las diferencias en los valores logP: 10.41 y -3.03

(calculados con el programa ACD/LogP) para fucosterol y neostigmina, respectivamente. La comparación de las interacciones polares mostró que el grupo hidroxilo del fucosterol se localiza muy cerca de Asn283 ($\leq 4 \text{ \AA}$) para formar un puente de hidrógeno (Figura 15 A), sin embargo, este enlace no está establecido.

Aunque esta interacción polar difiere de la inicialmente identificada mediante procedimientos de acoplamiento molecular (docking; Figura 14), la persistencia de mantener puentes de hidrógeno con el grupo OH corrobora la importancia de este grupo polar en el reconocimiento molecular de esteroides por hAChE (Ahmed et al., 2006). Por el contrario, la neostigmina puede formar interacciones electrostáticas (debido a su mayor número de grupos aceptores o donantes), así como su mayor polaridad, le permite establecer interacciones hidrófobas con residuos no polares (Figura 15 C). En general, estos resultados demuestran que el fucosterol se estabiliza de manera similar al donepezil (inhibidor no competitivo de hAChE), que es diferente a la estabilización de la galantamina (inhibidor competitivo de hAChE).

Así también, se determinaron las energías libres de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) para cuantificar las contribuciones energéticas con respecto a las energías no covalentes en el sitio de unión de los complejos hAChE-fucosterol y hAChE-neostigmina (véase Material y métodos). Este análisis reveló que los valores de $\Delta G_{\text{unión}}$ para los dos complejos son termodinámicamente favorables (sin considerar el componente entrópico) (Tabla II). La principal contribución energética a $\Delta G_{\text{unión}}$ fue guiada por las interacciones hidrofóbicas ($\Delta E_{\text{non-polar}} = \Delta E_{\text{vwd}} + \Delta G_{\text{npol, sol}}$), mientras que las contribuciones polares ($\Delta E_{\text{polar}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{pol, sol}}$) muestran un rendimiento termodinámicamente desfavorable que se opone al proceso de unión para todos los complejos. La energía libre de descomposición por residuo nos permite observar la contribución energética de cada residuo estabilizando ambos complejos observados en la figura 14.

Este análisis muestra que los residuos con valores ΔG_{mmgsa} de $\geq -0.5 \text{ kcal / mol}$, Trp286, Leu289, Phe295, Phe297, y Tyr341 fueron los que más contribuyeron a la final $\Delta G_{\text{unión}}$ de la estabilización del sistema hAChE-fucosterol (Figura 15 A-B).

Mientras que Thr83, Trp86, Ser125, Glu202 y Tyr449 son la fuente más de la $\Delta G_{\text{unión}}$ final de la estabilización del sistema hAChE-neostigmina (Figura 15 C-D). Se llevaron a cabo cálculos de energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) para cuantificar las contribuciones energéticas con respecto a las energías no covalentes en el sitio de unión entre los complejos hAChE - fucosterol y hAChE - neostigmina (ver Métodos). Castro y Martínez (2001) mencionan que los residuos Trp 84 y 279 han sido claves para el diseño de una nueva generación de inhibidores AChE. Así, ligandos capaces de interactuar simultáneamente con los sitios activos y sitios periféricos podrían implicar varias ventajas sobre inhibidores conocidos, que por un lado deberían mejorar mucho la potencia inhibitoria y, por otro, deberían involucrarse en la actividad neurotrófica.

Por otro lado, el sistema hAChE-fucosterol muestra una $\Delta G_{\text{unión}}$ de unión más energéticamente favorable que la hAChE-neostigmina, lo cual está de acuerdo con una coordinación más fuerte por residuos hidrófobos (el principal contribuyente a la unión $\Delta G_{\text{unión}}$; Figura 15 B y 15 D). Curiosamente, aunque la neostigmina presenta importantes interacciones electrostáticas polares, se estabiliza por un menor número de contactos hidrofóbicos que contribuyen a una menor afinidad por hAChE. Para la estabilización del sistema con valores $\Delta G_{\text{mmgsa}} \geq -0.5$ kcal / mol, los residuos Trp286, Leu289, Phe295, Phe297 y Tyr341 fueron los que más contribuyeron al ΔG final de hAChE-fucosterol (Figura 15 A-B). Mientras que Thr83, Trp86, Ser125, Glu202 y Tyr449 son la fuente más de la $\Delta G_{\text{unión}}$ final de la estabilización del sistema hAChE-neostigmina (Figura 15 C-D). Con base en este hecho y el aumento de peso energético en la estabilización del complejo, se puede proponer que Trp286, Leu289 y Tyr341 son residuos cruciales en el acoplamiento del sitio "aniónico" periférico, mientras que Trp86, Glu202 y Tyr449 son importantes en la unión al subsitio "aniónico" del sitio catalítico.

7.2 Inhibición de la proteína beta amiloide.

Los prometedores resultados con AChE y fucosterol impulsaron a extender el estudio para verificar la posible actividad anti-amiloidogénica. Los análisis con beta amiloide mostraron un enfoque de la bioactividad del fucosterol y su potencial como inhibidor de la agregación y desagregación de la beta amiloide ($A\beta_{1-42}$); así probablemente usarse para combatir la EA. Identificar la ubicación de los sitios de unión del ligando en una proteína es de importancia fundamental para el diseño de drogas e identificación estructural del *novo* y comparación de sitios funcionales (Rajamanikandan et al, 2011). El acoplamiento molecular mostró que el fucosterol tiene interacción hidrofóbica con los residuos histidina (His14) y Leucina (Leu34) en la subunidad A de 1z0q. Este complejo tuvo una energía de unión de -6.52 (Figura 16). Lo cual contrasta con los resultados acoplados en galantamina (Figura 17) pese que tuvieron una energía de unión similar (-6.03). De igual manera los resultados de acoplamiento entre beta amiloide, fucosterol y galantamina difieren en las conformacion 5kk3.

No obstante, el fucosterol tiene interacciones hidrofóbicas similares a la galantamina en el acoplamiento con la conformación 2 beg (figura 18 y 19) con el residuo Gly37 en la subunidad D. También fue evidente con 2mxu (figura 20 y 21) sus interacciones en Val12 e Ile32 de la subunidad A y con Ile32 y Gly33 (Subunidades B y C) de la misma molécula. Dado que el comportamiento de ambos inhibidores en estos análisis son semejantes, podríamos sugerir que estos tienen afinidad similar. Aunque el fucosterol y la galantamina provienen de diferentes fuentes, son de origen natural. La galantamina, por ejemplo, es un producto derivado de los bulbos y flores de especies vegetales como *Lycoris radiata* y *Galanthus nivalis* perteneciente a la familia *Amaryllidaceae*. Químicamente contiene una amina terciaria y un anillo tetracíclico fusionado que consiste en benzazepina, un benzofurano junto con tres estereocentros (Rao et al., 2013).

Por otro lado, Rao y colaboradores (2013) mencionan en sus análisis que el sitio de unión de galantamina dentro del dímero de péptido amiloide se identificó

mediante experimentos de acoplamiento y el complejo más estable se analizó por simulación de dinámica molecular. Sus estudios muestran que la galantamina interactúa con la región central del dímero amiloide (Ly16-Ala21) y la región C-terminal (Ile31-Val36). Sorprendentemente, se observó una deriva significativa en la región de giro de Asp23-Gly29 (átomo C α RMSD = 9.2 Å y 11.6 Å a 50 fs y 100 fs, respectivamente).

Además, los mismos autores sugieren que el modo de unión de galantamina interrumpe la interacción pi-pi entre anillos aromáticos de Phe19 (cadena A) y Phe19 (cadena B). El nitrógeno terciario de azepina estaba muy cerca de Leu34 (distancia <3.5 Å) para estabilizar la conformación del dímero. En resumen, los resultados de Rao y colaboradores (2013) indican que la unión de galantamina al dímero de péptido amiloide conduce a un cambio conformacional significativo en la región de giro (Asp23-Gly29) y altera las interacciones entre hebras beta (β) individuales; esto sugirió una inhibición de βA_{1-40} y se previene la formación de oligómeros neurotóxicos.

Por otro lado, en el presente estudio se realizó análisis *in vitro* con fucosterol y galantamina para corroborar la inhibición de la proteína βA_{1-42} . Se usó la técnica desarrollada con tioflavina T (ThT), que es comúnmente utilizada para monitorear la formación de fibrillas. Al unirse a las fibrillas amiloides al ThT da una fuerte señal de fluorescencia a aproximadamente 482 nm cuando se excita a 450 nm. El mecanismo de potenciación de la fluorescencia tras la unión al amiloide se ha atribuido a la inmovilización rotacional del enlace C-C central que conecta los anillos de benzotiazol y anilina. Es comúnmente aceptado que ThT se une a los canales de la cadena lateral a lo largo del eje de las fibrillas de amiloide y que el sitio de unión en la superficie de la fibrilla abarca cuatro cadenas β consecutivas (Xue et al, 2016; Picken y Herrera, 2012).

Así pues, al existir una inhibición de la oligomerización tiende a descender la señal de fluorescencia de ThT. Como se observa en la gráfica 3, las diferentes concentraciones de fucosterol (50 y 100 μM) tuvieron actividad inhibitoria, no obstante, sigue siendo la galantamina la que produce mayor inhibición. En los análisis reportados por Shanmuganathan y colaboradores (2015) del extracto

ACTPG de *P. gymnospora* en ensayo de fluorescencia con tioflavina-T, muestran que la incubación del péptido A β a 37 ° C durante 20 h la intensidad de fluorescencia fue menor (3.21 ± 1.19 UA); sin embargo, a las 48 h de incubación, la intensidad de la fluorescencia aumenta ligeramente (3.57 ± 0.52 UA), lo que indica el comienzo de la agregación.

Estos autores mencionan que tras el tratamiento de ACTPG (250 μ g/ mL) con A β ₂₅₋₃₅, se observó una disminución extensa en la intensidad de fluorescencia (1.68 ± 0.3 UA, 0.84 UA), lo que indica que el extracto evita la formación de fibrillas a partir de oligómeros en la Fase I. Además, ACTPG desagrega las fibrillas preformadas en la Fase II. Se observó un aumento prominente en la fluorescencia de 96 ha 9 días en A β ₂₅₋₃₅ y la intensidad de fluorescencia observada fue de 4.67 ± 0.28 AU, 6.06 ± 0.47 AU respectivamente. La disminución significativa en la intensidad de la fluorescencia en los grupos tratados con ACTPG (3.95 ± 0.51 AU, 2.00 ± 1.13 AU) y galantamina (3.62 ± 0.55 AU, 2.86 ± 0.94 AU) indica que el ACTPG y la galantamina pueden prevenir la fibrilación.

De igual manera kang y colaboradores (2011) reporta un extracto butanólico de *E. cava*, dónde analizaron fibrillas de A β ₁₋₄₂ incubadas a a 37 ° C. La fibrilización de A β se midió mediante el ensayo de absorbancia del rojo Congo y el ensayo de fluorescencia ThT. El extracto inhibió significativamente la formación de fibrillas de A β en una concentración de 50 μ g/ mL. En las muestras que se usó rojo Congo la reducción de fibrillas fue en 70% y mediante el ensayo ThT un 80%. Es evidente la diferencia que existe entre los resultados anteriores y los obtenidos en el presente estudio, más, sin embargo, es posible que al usar un extracto el efecto de sinergia entre la variabilidad de compuestos presentes sea el causante de tal efecto, y al tener un compuesto puro esto puede disminuir.

Para corroborar la efectividad del fucosterol ante la beta amiloide, se evaluó la morfología de los agregados mediante MFA. Con ello se logró determinar el tamaño y morfología de los agregados A β ₁₋₄₂ en los complejos con fucosterol y galantamina después de 24 h (Figura 26). Claramente se encontró una modificación morfológica de A β ₁₋₄₂ en presencia de fucosterol en comparación con la galantamina. La figura 27 A muestra la característica fibrillas de A β ₁₋₄₂, que son

aproximadamente de 30 nm en ancho y 20 nm de altura, sin embargo, favorece el predominio de monómeros $A\beta_{1-42}$ con un radio de 2 nm (Fig. 26 B, C); en la figura 26 D se observa a la galantamina con $A\beta_{1-42}$, dónde es clara la oligomerización aún. Por lo tanto, los datos sugieren que el fucosterol es mejor para evitar la oligomerización de $A\beta_{1-42}$. En otros análisis se han evaluado por microscopia electrónica de transmisión la formación de oligómeros del extracto butanólico de *E. cava*, la inhibición fue visible en pequeños agregados (100 y 200nm) mientras que las muestras sin extracto se observó grandes agregados globulares. Dicho extracto fue más efectivo en la inhibición de fibrillas o oligómeros solubles de gran tamaño (50–100 kDa) que la formación de oligómeros solubles de pequeño tamaño (8-20 kDa; Kang et al., 2011).

Para los estudios realizados con electroforesis, no se logró ningún resultado efectivo ya que sólo el marcador viajó por el gel (Figura 27). Este efecto puede deberse a varias causas ajenas a la potencialidad de los compuestos ya que tampoco la proteína beta amiloide amplificó. Lubran (1967) sugiere que algunas de las causas podrían ser mala homogeneización de poliacrilamida (más de una semana de antigüedad), que las muestras no fueron calentadas a 100° C antes de ser depositadas en el gel, la concentración de las muestras o el Buffer de tiene baja concentración de glicerol o sucrosa en el medio, entre otras.

8. Conclusiones y sugerencias.

Las algas pardas *S. horridum*, *Padina* sp. y el alga roja *Gelidium* sp. son géneros de macroalgas que pueden contener variedad de compuestos prometedores y aplicables como anti-cetilcolinesterasicos. Se sugiere seguir con análisis y fraccionamiento de extractos provenientes de estas.

Dados los resultados obtenidos en los análisis *in vitro* e *in silico* con AChE, beta amiloide y fucosterol, se sugiere que el esteroles es un inhibidor que tiene potencial para su uso contra el Alzheimer. Sin embargo, aún deben hacerse análisis mas robustos tanto *in vitro* (repetir electroforesis con beta amiloide), *in vivo* (farmacocinética y farmacodinámica) e *in silico* (QSAR, mecánica cuántica,

cristalografía de rayos X, etc) para completar los aspectos y requerimientos en un futuro uso farmacológico.

La hipótesis establecida en el presente estudio es rechazada en el sentido de que las algas marinas de Baja California Sur no fueron fuente de nuevos compuestos inhibidores de la acetilcolinesterasa y la proteína beta amiloide (βA_{1-42}), ya que el fucosterol es un compuesto conocido y además reportado con la actividad para ambos casos; no obstante se acepta el hecho de que dicho compuesto tiene mecanismos diferentes a los inhibidores conocidos.

9. Bibliografía.

- Adel, H., Shirodkar, D., Tilvi, S., Furtado, J. & Majik M. S. (2015). Isolation of Stigmast-5,24-dien-3-ol from marine brown algae *Sargassum tenerrimum* and its antipredatory effect. Royal Society of Chemistry Advances. Vol. 5. 51008-51011pp.
- Abdul, Q. A., Choi, R. J., Jungc, H. A., & Choia J. S. (2016). Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96, 1856-1866. doi: 10.1002/jsfa.7489.
- Ahmed, E., Nawaz, S. A., Malik, A., & Choudhary, M. I., (2006). Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 16, 573-580.
- Ahn B. R., Moon H. E., Kim R. H., Jung H. A. y Choi J. S. 2012. Neuroprotective Effect of Edible Brown Alga *Eisenia bicyclis* on Amyloid Beta Peptide-induced Toxicity in PC12 Cells. Arch Pharm Res. Vol. 35 (11): 1989-1998pp.
- Andrade, P. B., Barbosa, M., Matos, P. R., Lopes, G., Vinholes, J., Mougá, T., & Valentão, P. (2013). Valuable compounds in macroalgae extracts. Food Chemistry, 138, 1819-1828.
- Alpizar-Quesada, C.L. y Morales-Alpizar C. 2003. La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa. *Act. Med. Cost.* Vol. 45 (2):50-56pp.
- Alonso E., Vieira A. C, Rodriguez I., Alvariño R., Gegunde S., Fuwa H., Suga Y., Sasaki M., Alfonso A., Cifuentes J. M. y Botana L. M. 2017. Tetracyclic truncated analog of the Marine toxin gambierol modifies NMDA, tau and

- amyloid β expression in mice brains: implications in AD pathology. ACS Chemical Neuroscience. 1-29pp.
- Barbosa, M., Valentão. P., & Andrade, P. B. 2014. Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: implications for neurodegenerative diseases. *Marine Drugs*, 12, 4934-4972pp.
- Balachandran P., Parthasarathy V. & Kumar T.V. A. 2016. Isolation of compounds from *Sargassum wightii* by GCMS and the molecular docking against anti-inflammatory marker COX2. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*. Vol. 63: 1-12 p.
- Becerra, M., Boutefnouchet, S., Cordoba O., Vitorino, P. G., Brehu L., Lamour I., Laimay F., Efstathiou A., Smirlis D., Michel S., Kritsanida M., Lujan F.M., & Grougnet R. I.,(2015). Antileishmanial activity of fucosterol recovered from *Lessonia vadosa* Searles (Lessoniaceae) by SFE, PSE and CPC. *Phytochem. Lett.*, Vol. 11. 418-423 pp.
- Bello M., Martinez-Archundia M. & Correa-Basurto J. 2013. Automated docking for novel drug Discovery. *Expert Op. on Drug Disc.* 10 p.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., DiNola A. &Haak J. R., (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *Chemi. Physics*. Vol. 81, 3684pp
- Bencharit S. Morton C. L., Hyatt L. J. Kuhn P., Danks M. K. Potter P. M. & Redinbo M. R. 2003. Crystal Structure of Human Carboxylesterase 1 Complexed with the Alzheimer's Drug Tacrine: from Binding Promiscuity to Selective Inhibition. *Chem. & Biol*. Vol. 10: 341–349pp.
- Boulom, S., Robertson J., Hamid N., Maa Q. and Lu J., (2014). Seasonal changes in lipid, fatty acid, α -tocopherol and phytosterol contents of seaweed, *Undarin pinnatifida*, in the Marlborough sounds, New Zealand. *Food Chem.* Vol. 161. 261-269.
- Bouzidi, N., Viano Y., Ortalo-Magne A., Seridi H., Alliche Z., Daghbouche Y., Culioli G. and El-Hattab M., (2014). Sterols from the brown alga *Cystoseira foeniculacea*: degradation of fucosterol into saringosterol epimers. *Arabian Journal of Chemistry*, 5. doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.004

- Bonting, S. L. and Featherstone R. M., (1956). Ultramicro assay of the cholinesterases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 61: 89-98.
- Borhani W. D. & Shaw E. D. 2012. The future of molecular dynamics simulations in drug Discovery *Journal of Computer. Aided Molecular Design*. Vol. 26:15–26 p.
- Case, D .A., Cheatham T. E., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K. M., Onufriev A., Simmerling C., Wang B. and Woods R. J., (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Jour. Comp. Chem*. Vol. 16: 1668-1688pp.
- Castro A. y Martinez A. 2001. Peripheral and Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: Implications in treatment of Alzheimer's Disease. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol. 1. 267-272pp.
- Cálix-Peralto E., 1989. Intoxicación por Inhibidores de Acetilcolinesterasa Evaluación del Protocolo de Tratamiento 1986 -1988. *Rev. Med. Hond*. Vol. 57. 125-132pp.
- Castellanos-Castillo F.A. 2014. Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano. *Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química*. Bogotá, Colombia. TESIS. 92p.
- Chaplot S.L. 2006. Parallelization in classical molecular dynamics simulation and applications. *Computational Materials Science*. Vol. 37.146–151 pp.
- Chen, Z., Liu J., Fu Z., Ye C., Zhang R., Song Y., Zhang Y., Li H., Ying H. and Liu H., (2014). 24(S)-Saringosterol from edible marine seaweed *Sargassum fusiforme* is a novel selective LXR β agonist. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 62: 6130-6137pp.
- Chen Y,C. 2015. Beware of docking!. *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol. 3 (2): 78-92 p.
- Correa-Basurto, J., Bello M., Rosales-Hernandez M. C., Hernández-Rodríguez M., Nicolás-Vázquez I., Rojo-Domínguez A., Trujillo-Vergara J. G., Mirada R. and Flores-Sandoval C. A., (2014). QSAR, docking, dynamic simulation and quantum mechanics studies to explore the recognition properties of

- cholinesterase binding sites. *Chemico-biological interactions*. Vol. 209: 1-13pp.
- Choi, B.W.; Ryu, G.; Park, S.H.; Kim, E.S.; Shin, J.; Roh, S.S.; Shin, H.C.; Lee, B.H. 2007. Anticholinesterase activity of plastoquinones from *Sargassum sagamianum*: Lead compounds for Alzheimer's disease therapy. *Phytother. Res.* Vol. 21. 423–426 pp.
- Coyne A.G, Scott D.E, Abell C. 2010. Drugging challenging targets using Fragment based approaches. *Current Opinion in Chemical Biology*. Vol. 14:299–307p.
- Colvin M. T., Silvers R., Ni Z.Q., Can T. V., Sergeyev I., Rosay M., Donovan K. J., Michael B., Wall J., Linse S. y Griffin R. G. 2016. Atomic Resolution Structure of Monomorphic A β 42 Amyloid Fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 138. 9663–9674pp.
- Sook Yee Gana,* , Li Zhe Wongb, Jia Wun Wongc and Eng Lai Tan. 2018. Fucoesterol exerts protection against amyloid β -induced neurotoxicity, Reduces intracellular levels of amyloid β and enhances the mRNA expression of neuroglobin in amyloid β -induced SH-SY5Y cells.
- Gómez F M. J. y Cáceres G. J. L. 2010. Toxicidad por insecticidas organofosforados en fumigadores de Campaña contra el Dengue, estado Aragua, Venezuela, año 2008. *Bol. Mal. Salud Amb.* Vol. L. N° 1. 119-125pp.
- Heo, S.-J.; Ko, S.-C.; Kang, S.-M.; Kang, H.-S.; Kim, J.-P.; Kim, S.-H.; Lee, K.-W. Cho, M.-G.; Jeon, Y.-J. 2008. Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H₂O₂-induced cell damage. *Eur. Food Res. Technol.* Vol. 228.145–151pp.
- Darden, T., York D. and Pedersen L. J., (1993). Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *Chemical. Physics*, 98pp.
- Dennington, R., Keith T. and Millam J., (2009). GaussView, Version 5, *Semichem Inc.*, Shawnee Mission, KS.
- De la Mora- Lugo E. & Rudiño-Piñera E. 2008. Cristales, difracción y Desplazamientos atómicos: ¿es posible usar datos cristalográficos para

- extraer movimientos moleculares en proteínas?. *Mensaje Bioquímico*. Vol XXXII:135-148pp.
- Devi S. K. & Velmurugan D. 2015. Molecular modeling, quantitative structure activity relationship and pharmacophore studies on anti-viral, anti-malarial and anti-inflammatory bioactive compounds from marine sources. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. Vol 8(3): 36-43 p
- Dinamarca M. C, Arrázola M., Toledo E., Cerpa W. F., Hancke J., Inestrosa N. C. 2008. Release of acetylcholinesterase (AChE) from β -amyloid plaques assemblies improves the spatial memory impairments in APP-transgenic mice. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 175. 142–149pp..
- Dinamarca M. C., Sagal J. P., Quintanilla R. A., Godoy J. A., Arrázola M. S., Inestrosa N. C. 2010. Amyloid- β -Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes Induced by the A β peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. Vol. 5 (4). 15pp.
- Duan, Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M. C., Xiong Guoming Z. W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T., Caldwell J., Wang J. and Kollman P., (2003). A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *Journal of Computational Chemistry*. Vol. 24.
- Eteghad S. S., Sabermarouf B. , Mahnaz A. M., Farhoudi T. M. & Mahmoudi J. 2015. Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Medical Principles and Practice*. Vol.24: 1–10pp.
- Fallarero, A., Oinonenb P., Gupta S., Bloma P., Galkine A., Mohand C. G. and Vuorela P. M., (2008). Inhibition of acetylcholinesterase by coumarins: The case of coumarin 106. *Pharmacological Research*. 58: 215-221pp.
- Frisch, M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R. and Nakatsuji H., (2009). Gaussian 09, revision D. 01.
- Gao Y., Li C., Yina J., Shena J., Wanga H., Wua Y. y Jin H. 2012. Fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown algae, improves cognitive impairment

- induced by infusion of A β peptide in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*. Vol. 33. 304–311pp.
- Gan S. Y., Wong L. Z., Wong J. W., Tan E. L. 2018. Fucosterol exerts protection against amyloid β -induced neurotoxicity, reduces intracellular levels of amyloid β and enhances the mRNA expression of neuroglobin in amyloid β -induced SHSY5Y cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 30p.
- Gupta S., Fallarero A., Järvinen P., Karlsson D., Johnson M.S., Vuorela P. M. Mohan C. G. 2011. Discovery of dual binding site acetylcholinesterase Inhibitors Identified by pharmacophore modeling and sequential virtual screening techniques. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 21. 1105–1112 p.
- Gohlke, J., Griffith W. and Faustman E. M, (2004). The role of cell death during neocortical neurogenesis and synaptogenesis: Implications from a computational model for the rat and mouse. *Developmental Brain Research*, 151: 43-54pp.
- Harvey A. L., Clark R. L., Mackay S. P & Johnston B. F. 2010. Current strategies for drug discovery through natural products. *Expert Opinion on Drug Discovery*. Vol. 5(6):559-568 pp.
- Hernández-Rodríguez, M.; Correa-Basurto, J.; Benitez-Cardoza, C.; Resendiz-Albor, A.; Rosales-Hernández, M. 2013. *In silico* and *in vitro* studies to elucidate the role of Cu²⁺ and galanthamine as the limiting step in the amyloid beta (1–42) fibrillation process. *Pro Sci*. 22, 1320-1335.
- Hernández-Rodríguez, M.; Correa-Basurto, J.; Martínez-Ramos, F.; Padilla-Martínez, I.; Benítez-Cardoza, C.; Mera-Jiménez, E.; Rosales-Hernández, M. J. 2014. Design of Multi-Target Compounds as AChE, BACE1, and Amyloid- β 1-42 Oligomerization Inhibitors: *In Silico* and *In Vitro* Studies *Alzheimers Dis*. 41. 1073-1085pp.
- Herrera N. R. 2005. Amiloidosis. *Revista de la facultad de medicina*. Vol. 6 (1). 3-7pp.
- Honarparvar B., Govender T., Maguire G. E. M., Solim M. E. S., Kruger Hendrik G. 2014. Integrated Approach to Structure-Based Enzymatic Drug Design:

- Molecular Modeling, Spectroscopy, and Experimental Bioactivity. *Chemical Review*. Vol. 114. 493–537 p.
- Ikeda, K.; Kitamura, A.; Machida, H.; Watanabe, M.; Negishi, H.; Hiraoka, J.; Nakano, T. 2003. Effect of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on the development Of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* Vol. 30. 44–48 pp.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R. W., Klein M. L., (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*. 79: 926 pp.
- Jung, H. A., Islam M. N., Lee C. M., Oh S. H., Lee S., Jung J. H. and Choi J. S., (2013a). Kinetics and molecular docking studies of an anti-diabetic complication inhibitor fucosterol from edible brown algae *Eisenia bicyclis* and *Ecklonia stolonifera*. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 206: 55-62pp.
- Jung, H. A., Jin S. E., Ahn B.R., Lee C. M. and Choi J. S., (2013b). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 59. 206pp.
- Jung H. A., Ali M. Y., Choi R.J., Jeong H. O., Chung H. Y. y Choi J. S. 2016. Kinetics and molecular docking studies of fucosterol and fucoxanthin, BACE1 inhibitors from brown algae *Undaria pinnatifida* and *Ecklonia stolonifera*. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 89. 104-111pp.
- Kang I. J., Jeon Y. E., Yin X. F., Namb J. S., You S. G., Hong S. M., Jang B. G. y Kim M. J. 2011. Butanol extract of *Ecklonia cava* prevents production and aggregation of beta amyloid, and reduces beta-amyloid mediated neuronal death. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 49. 2252–2259pp.
- Kang S. M., Heo S. J., Kim K. N., Lee S H., Yang H, Kim A. D., Jeon Y. J. 2012. Molecular docking studies of a phlorotannin, dieckol isolated from *Ecklonia cava* with tyrosinase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol. 20: 311– 316 p.
- Kang I. J., Jang B. G., In S., Choi B., Kim M., Kim M. J. 2013. Phlorotannin-rich *Ecklonia cava* reduces the production of beta-amyloid by modulating alpha-

- and gamma-secretase expression and activity. *NeuroToxicology*. Vol. 34. 16–24pp.
- Khanavi, M., Sadati N. and Ostad S. N., (2012). Cytotoxicity of fucosterol containing fraction of marine algae against breast and colon carcinoma cell line. *Pharmacy Magazine*, 8: 60-64. doi: 10.4103/0973-1296.93327.
- Kannan, R.R.R.; Aderogba, M.A.; Ndhlala, A.R.; Stirk, W.A.; van Staden, J. 2013. Acetylcholinesterase inhibitory activity of phlorotannins isolated from the brown alga, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. *Food Res. Int.*, Vol. 54. 1250–1254 pp.
- Kollman, P. A., Massova I., Reyes C., Kuhn B., Huo S., Chong L., Lee M., Lee T., Duan Y., Wang W., Donini O., Cieplak P., Srinivasan J., Case A. D. and Cheatham T. E., (2000). Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of Chemical Research*. Vol. 33: 889-897pp.
- Kumar, S. S., Kumar Y., Khan M. S. Y., Anbu J. and De Clercq E., (2009). Antihistaminic, anticholinergic and antiviral activities of fucosterol from *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kutzing. *Pharmacologyonline*. Vol. 1: 1104-1112.
- Kumar, A., Nisha C. M., Silakari C., Sharma I., Anusha K., Gupta N., Nair P., Tripathi T. and Kumar A., (2016). Current and novel therapeutic molecules and targets in alzheimer's disease. *Journal of the Formosa Medical Association*. Vol. 115: 3-10 pp.
- Leuzinger A.L., Baker L. & Cauvin E. 1967. Acetylcholinesterase, II. Crystallization, Absorption spectra, Isotonic point. *Departments of Biochemistry and Neurology. College of Physicians and Surgeons, Columbia University*. E.U.A. 620-623pp.
- Li Y., Li Y., Je J., Kim SK. 2015. Dieckol as a novel anti-proliferative and anti-angiogenic agent and computational anti-angiogenic activity evaluation. *Environ Toxicol Pharmacol*. Vol. 39(1):259-270pp.
- Liu, J. S., Yuan-Long Z., Chao-Mei Y., You-Zuo Z., Yan-Yi H., Feng-Wu W. and Bao Feng Q., (1986). The structures of huperzine A and B, two new alkaloids

- Exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry*. 64. 837-839pp.
- Liu, D.-Q.; Mao, S.-C.; Zhang, H.-Y.; Yu, X.-Q.; Feng, M.-T.; Wang, B.; Feng, L. H.; Guo, Y.-W. 2013. Racemosins A and B, two novel bisindole alkaloids from the green alga *Caulerpa racemosa*. *Fitoterapia*. Vol. 91.15–20 pp.
- Lühns T., Ritter C., Adrian M., Riek-Loher D., Bohrmann B., Döbeli H., Schubert D. y Riek R. 2005. 3D structure of Alzheimer's amyloid- (1– 42) fibrils. *PNAS*. vol. 102 (48): 17342–17347 pp.
- Maestro. Maestro, Version 10.5. Schrödinger LLC. New York, NY, USA: 2018-1.
- Marston A., Kissling J. y K. Hostettmann. 2002. A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochemical Analysis*. Vol. 13. 51–54pp.
- Miceli L. A., Teixeira V. L., Castro H. C., Rodrigues C. R., Mello J. F. R., Albuquerque M. G., Cabral L. M., Brito M. A. y de Souza A. M. T. 2013. Molecular docking studies of marine diterpenes as Inhibitors of wild-type and mutants HIV-1 reverse transcriptase. *Marine Drugs*. Vol. 11. 4127-4143pp.
- Morris, G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J.,. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. Vol. 19.1639-1662.
- Mucchielli, A., and Saint-Lebe L..1976. The mechanism action of hydrogen peroxide on bacterial metabolism. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences* .Vol. 283: 435-438pp
- Mukherjee P. K., Kumar V., Malb M., Houghton P. J.2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. Vol. 14:289–300p.
- Myung, C.-S.; Shin, H.-C.; Bao, H.; Yeo, S.; Lee, B.; Kang, J. 2005. Improvement of memory by dieckol and phlorofucofuroeckol in ethanol-treated mice: Possible involvement of the inhibition of acetylcholinesterase. *Arch. Pharm. Res*. Vol. 28. 691-698 pp.
- Ogara T., Takahashi T., Yasui H., Uwai K. y Tokuraku K. 2015. Evaluation of the effects of amyloid b aggregation from seaweed extracts by a microliter

- scale high-throughput screening system with a quantum dot nanoprobe. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 120 (1). 45-50pp.
- Onufriev, A. D. and Bashford D. A., (2004). Case, Exploring protein native States and largescale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins*. Vol. 55: 383-394pp.
- Ou-Yang S. S., Lu J.Y., Kong X.G., Liang Z., Luo C., Jiang H. 2012.Computational Drug Discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*. Vol. 33: 1131–1140 p.
- Pangestuti R. & Kim S. K. 2011.Neuroprotective Effects of Marine Algae. *Mar. Drugs*. Vol. 9: 803-818p.
- Peters, J., Martinez N., Trovaslet M., Scannapieco K. M, Koza M. M., Masson P. and Nachon F., (2016). Dynamics of human acetylcholinesterase bound to non-covalent and covalent inhibitors shedding light on changes to the water network structure. *Physical Chemistry Chemical Physics*. Vol. 18: 12992-13001pp.
- Picken M.M., Herrera G.A. 2012. Thioflavin T Stain: An Easier and More Sensitive Method for Amyloid Detection. Chapter 14 in: Picken MD, PhD, FASN M., Dogan, M.D., Ph.D. A., Herrera, M.D.G. (eds) *Amyloid and Related Disorders*. *Current Clinical Pathology*. Humana Press. 187-189 pp.
- PyMOL. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0. Schrödinger LLC. New York, NY, USA. 2017-1.
- Plimpton S. 1995. Computational limits of classical molecular dynamics simulations. *Computational Materials Science*. Vol. 4: 361-364 p.
- Preamnath D., Asir R.V.A., Jebamalar J.A., Vennila J.J. & Gomez P.2012.*In silico* docking and interaction analysis of bioactive marine compound (sulfated fucose) against the human mutant p53 protein involved in carcinogénesis. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. Vol.3 (9). 8 p.
- Prasansuklab A. y Tencomnao T. 2013. Amyloidosis in Alzheimer’s Disease: The Toxicity of Amyloid Beta (A β), Mechanisms of Its accumulation and implications of medicinal plants for therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-10pp.

- Rao P. P. N., Mohamed T. y Osman W. 2013. Investigating the binding interactions of galantamine with b-amyloid peptide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 23. 239–243pp.
- Rajamanikandan S., Sindhu T., Durgapriya D., Anitha J.R., Akila S. & Gopalakrishnan V.K. 2011. Molecular docking and qsar studies on bioactive compounds isolated from marine organisms into the muc1 oncoprotein. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 3 (2): 168-172 p.
- Rouleau J., Iorga B. I., Guillou C. 2011. New potent human acetylcholinesterase inhibitors in the tetracyclic triterpene series with inhibitory potency on amyloid b aggregation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 46. 2193-2205pp.
- René R. y Estela J. 2000. Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con inhibidores de la acetilcolinesterasa. *Alzheimer. Realidades e Investigación en demencia*. No. 17: 4-11pp.
- Rhee I. K., Van de Meent M., Ingkaninan K. y Verpoorte R. 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amaryllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography*. Vol. 915. 217–223pp
- Sánchez-Chávez G. y Salceda R. 2008. Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesteasa. *Revista de educación bioquímica, UNAM*. Vol 27 (2): 44 51p.
- Saeidniaa, S., Permeheb P., Goharia A. R. and Mashinchian-Moradib A., 2012. *Gracilariopsis persica* from Persian Gulf contains bioactive sterols. *Journal of Pharmaceutical Research*, 11: 845-849.
- Shanmuganathan B. Malar D. S., Sathya S., Devi P. K. 2015. Antiaggregation Potential of *Padina gymnospora* against the Toxic Alzheimer's Beta-Amyloid Peptide 25–35 and Cholinesterase Inhibitory Property of Its Bioactive Compounds. *Plos One*. 1-14pp.
- Singh, K. S., Majik M. S. and Tilvi S., (2014). *Vibrational Spectroscopy for Structural Characterization of Bioactive in: T. Rocha-Santos and A. C. Duarte (eds)*

- Comprehensive Analytical Chemistry. Vol. 65. 115-148pp.
- Sussman, J. L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L. and Silman I., (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. Vol. 253. 872-879pp.
- Syad A. N., Shunmugiah K. P. & Kasi P. D. 2012. Assessment of Anticholinesterase Activity of *Gelidiella acerosa* : Implications for Its Therapeutic Potential against Alzheimer's Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 8 p.
- Suganthy N., Pandian K. S., Devi P. K. 2010. Neuroprotective effect of seaweeds inhabiting South Indian coastal area (Hare Island, Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve): Cholinesterase inhibitory effect of *Hypnea valentiae* and *Ulva reticulata*. *Neuroscience Letters*. Vol. 468:216-219 p.
- Trigui M., Gasmi L., Zouari I., Tounsi S. 2013. Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *Journal Applied Phycology*. Vol. 25:319-328p.
- Tomaselli S., Esposito V, Vangone P., Van Nuland N. A. J., Bonvin A. M. J. J., Guerrini R., Tancredi T., Temussi P. A., Picone D. 2006. The α -to Conformational Transition of Alzheimer's Ab-(1-42) Peptide in Aqueous Media is Reversible: A Step by Step Conformational Analysis Suggests the Location of β Conformation Seeding. *Chem Bio Chem*. Vol. 7. 257-267pp.
- Van Gunsteren, W. F. and Berendsen H. J. C., (1977). Algorithms for Macromolecular dynamics and constraint dynamics. *Molecular Physics*. Vol. 34. 1311-1327pp.
- Wang, J., Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A., Case D. A., 2004. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*. Vol. 25.1157-1174pp.
- Wälti M. A., Ravottia F., Araib H., Glabeb C.G., Walld J. S., Böckmanne A., Günterta P., Meiera B. H. y Rieka R. 2016. Atomic-resolution structure of a Disease Relevant A β (1-42) amyloid fibril. *PNAS Early Edition*. 1-9pp.
- Xiao Y., Ma B., McElheny D., Parthasarathy S., Long F., Hoshi M., Nussino

- R. y Ishii Y. 2015. A β (1–42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nature structural & molecular biology*. Vol.22 (6). 499-506pp.
- Xue C., Lin T. Y., Chang D. y and Guo Z. 2016. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal society open science*. 1-12pp.
- Yoon, N. Y., H. Y. Chung, Kim H. R. and Choi J. S., (2008). Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Science*. Vol. 74: 200-207.