



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Evaluación del efecto inhibitorio del ácido escamónico, extraído de *Ipomoea tyrianthina*, sobre la enzima JAK2 y sus implicaciones en la enfermedad de Alzheimer”

T E S I S

Que presenta

BIÓL. TALÍA FERNANDA SÁNCHEZ BARBOSA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Dra. Victoria Campos Peña

Ciudad de México

Agosto, 2021

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARCO ANTONIO MERAZ RÍOS

INVESTIGADOR TITULAR.

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR. CINVESTAV-IPN.

CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. VICTORIA CAMPOS PEÑA

INVESTIGADORA EN CIENCIAS MÉDICAS.

INSTITUTO DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA.

ASESORES

DRA. MARÍA CARMEN SÁNCHEZ TORRES

INVESTIGADORA TITULAR. DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA
MOLECULAR, CINVESTAV-IPN.

DR. MICHAEL SCHNOOR

INVESTIGADOR TITULAR. DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA
MOLECULAR. CINVESTAV-IPN

Contenido

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Características de la Enfermedad de Alzheimer	7
1.2 Patogénesis.....	9
1.3 Inflamación.....	11
1.4 Vía JAK-STAT.....	12
1.4.1 Regulación	15
1.4.2 Asociación de la vía JAK-STAT, con la Enfermedad de Alzheimer.....	16
1.4.3 Inhibidores de la vía JAK-STAT.....	21
1.5 Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	26
1.6 Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer con plantas medicinales.....	27
1.7 El género <i>Ipomoea</i>	28
1.7.1 <i>Ipomoea batatas</i>	29
1.7.2 <i>Ipomoea stolonifera</i>	30
1.7.3 <i>Ipomoea stans</i>	30
1.7.4 <i>Ipomoea thyriantina</i>	32
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	34
2.1 Ácido escamónico como regulador de la neuroinflamación	34
2.2 La inhibición de la vía JAK-STAT3 disminuye la neuroinflamación inducida por el amiloide β	37
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	41
4. HIPÓTESIS	43
5. OBJETIVOS	43
5.1 Objetivo general	43
5.2 Objetivos particulares	43
6. MÉTODO	44
6.1 Construcción del ligando.....	44
6.2 Preparación de la proteína.....	44
6.3 Acoplamiento molecular.....	45
6.4 Validación de los resultados del acoplamiento molecular.....	45
6.5 Cálculo de I.C.50.	45

6.6 Características fisicoquímicas y biológicas del ácido escamónico.	46
6.7 Optimización de la molécula de ácido escamónico.....	46
7. RESULTADOS.....	46
7.1 Acoplamiento molecular	47
7.2 Validación de los resultados del acoplamiento molecular.....	52
7.3 Tipo de inhibidor.....	55
7.4 Predicción de I.C.50 del ácido escamónico.....	56
7.5 Selectividad.....	58
7.6 Características fisicoquímicas y biológicas.....	61
7.7 Actividad biológica	62
7.8 Modificación del andamio del ácido escamónico.....	63
7.9 Unión del ácido escamónico al péptido amiloide β 1-42.....	66
8. DISCUSIÓN	68
9. CONCLUSIONES	78
10. BIBLIOGRAFÍA	79

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Victoria Campos por no haberme dejado sola en el periodo de incertidumbre que significó la pandemia y ayudarme a buscar todas las posibles alternativas al proyecto original.

Al Dr. Marco Meraz, por su apoyo y pertinentes observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Rodrigo Razo, por compartirme su conocimiento y guiarme durante la realización del proyecto.

Al Dr. Ismael León, por el interés que demostró en el proyecto.

A Marcos, Rosalba y Alicia, por apoyarme incondicionalmente y alimentar mi alma con su amor y consejos.

A Jorge, por acompañarme todo este tiempo y haber aguantado los peores embates de mal humor causado por mi cansancio.

A Jackson Pollock, el perro, por acompañarme en las desveladas y esperarme en las ausencias.

A Diana y Vane, porque a pesar del cansancio, el hambre y la frustración, las risas nunca faltaron.

A Claudia y Karen por haberme animado a seguir tantas veces y por hacerme sentir tan querida.

A Emili, por acordarse de mí y hacerme reír con sus memes.

Al CONACYT por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios de maestría en el departamento de Biomedicina Molecular en el CINVESTAV.

RESUMEN

El ácido escamónico es un compuesto extraído de las raíces de la planta *Ipomoea tyrianthina*, en la medicina tradicional se usa como purgante y para el tratamiento de algunas enfermedades como la hipertensión o la depresión. Sus propiedades como antiinflamatorio, sedante, vaso relajante, promotor de la liberación de ácido gama aminobutírico (GABA) y regulador de la neuroinflamación ya han sido comprobadas experimentalmente. En el presente trabajo se desarrolló un modelo *in silico*, basado en técnicas de acoplamiento molecular, para proponer que el ácido escamónico puede ser un inhibidor tipo I de la cinasa JAK2. Este compuesto puede unirse a la enzima en tres sitios diferentes: el sitio catalítico, la bolsa de la hélice α C (la cual contiene residuos específicos de JAK2) y la bolsa de las hélices α E, α G y α K. Se comprobó que su selectividad no es muy alta, ya que también puede unirse al sitio catalítico de JAK1. Sin embargo, se desarrolló un modelo matemático (basado en los resultados del acoplamiento molecular) con el cual se infirió que su I.C.₅₀ es de 7.99 nM. Aunque no es una molécula tóxica, las características fisicoquímicas del ácido escamónico indican que su biodisponibilidad es baja. No obstante, tiene como blancos biológicos posibles a cinasas de receptores acoplados a proteína G, la enzima β secretasa y el factor de transcripción STAT3; estas dos últimas moléculas se han asociado con la enfermedad de Alzheimer. Es posible que una modificación en el número de azúcares presentes en la molécula, pueda hacer que su biodisponibilidad aumente, sin que se vea afectada su actividad biológica.

ABSTRACT

Scammonic acid is a compound extracted from the roots of the herbaceous plant *Ipomoea tyrianthina*, in Mexican traditional medicine it is used as a purgative and in the treatment of diseases like hypertension or depression. Its properties as anti-inflammatory, sedative, vasorelaxant, promoter of release of amino butiric acid (GABA) and regulator of neuroinflammation have been experimentally proved. In the present study, an *in silico* model, based on molecular docking techniques, was generated to propose that scammonic acid can be a type I inhibitor of kinase JAK2. This compound can bind the enzyme in three distinct pockets: the catalytic site, the α helix C pocket (which has JAK2 specific residues) and the α helix E, G and K pocket. It was proved that the selectivity of scammonic acid is not high, as it can bind active site of JAK1. It was inferred through a mathematical model (based on molecular

docking results), that its I.C.₅₀ was 7.99 nM. Even though the molecule is not toxic, its physicochemical characteristics indicate low bioavailability. Its predicted biological targets are kinases of protein G coupled receptors, the enzyme β secretase and the transcription factor STAT3; these last two molecules have been implicated in the development of Alzheimer's disease. It is suggested that a modification in the number of sugars present in the molecule, can make it more bioavailable without affecting its biological activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características de la Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el desorden neurológico con mayor prevalencia en el mundo, es la sexta causa de muerte a nivel mundial y se estima que para 2050, 131.5 millones de personas padecerán la enfermedad. Se caracteriza por un deterioro cognitivo, cuyo riesgo aumenta significativamente con la edad. Según la Organización Mundial de la Salud (2019), en el mundo hay 50 millones de personas que padecen alguna forma de demencia, de las cuales del 60 al 70% son casos de Alzheimer.^{1,2,3}

La EA afecta al 5% de los individuos mayores de 65 años y al 20% de los mayores de 80. En América Latina, su tasa de prevalencia se duplica cada 5.9 años. En Europa y América su incidencia más alta se encuentra entre personas de 80 a 89 años, en Asia está entre los 75 y 84 años y en África entre los 65 y 74 años. El costo anual total de la enfermedad en 2015 fue de 828 billones de dólares y se cree que para el año 2030 podría alcanzar un trillón de dólares.⁴

Las características más notables de esta enfermedad son: la acumulación de péptidos de Amiloide- β ($A\beta$) en la periferia de las neuronas, la formación de marañas u ovillos neurofibrilares (MNF) en el interior de las neuronas formados por fragmentos de la proteína tau hiperfosforilada (figura 1). Los hilos del neurópilo, las neuritas distróficas, la astrogliosis y la activación de la microglia, son otras de las características presentes en esta patología. Es una enfermedad que se ha asociado con déficit de acetilcolina y estrés oxidativo, causado por la exacerbación en la

transmisión de glutamato. A nivel macroscópico, el cerebro de una persona con EA sufre de atrofia generalizada en el hipocampo y la corteza cerebral.²

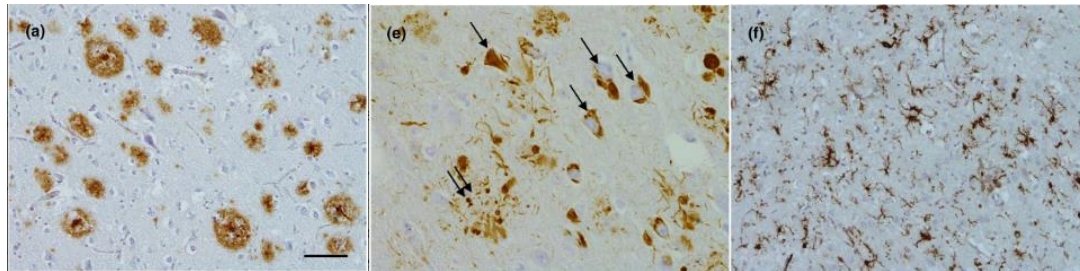


Figura 1. Izquierda: inmunohistoquímica que muestra la formación de placas neuríticas en la corteza frontal. Centro: inmunohistoquímica que muestra ovillos neurofibrilares (flechas) y placas neuríticas (doble flecha). Derecha: inmunohistoquímica que muestra a la microglia reactiva.⁵

Aun cuando se ha estudiado desde hace más de un siglo, su patogénesis no es clara y desafortunadamente, no existe un tratamiento efectivo en contra de la enfermedad. Sin embargo, se conocen varios marcadores relacionados con el desarrollo de la patología que podrían permitir, en un futuro, desarrollar estrategias curativas.

La gran mayoría de los casos de EA se presentan de forma esporádica, pero también existen casos de EA de tipo familiar, los cuales son ocasionados por mutaciones en los genes APP (que codifica a la Proteína precursora del amiloide), PSEN1 (codifica a la Presenilina 1) y PSEN2 (codifica a la Presenilina 2).^{2, 5}

El factor de riesgo más importante para desarrollar la enfermedad de tipo esporádico, es la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen APOE. Los individuos heterocigotos de $\epsilon 4$ tienen una tasa de riesgo tres veces mayor, comparado con los individuos no portadores; mientras que los homocigotos alcanzan una tasa doce veces mayor.^{2, 3, 5}

Además, existen algunos otros factores genéticos que podrían representar un riesgo para la aparición de la EA, entre ellos se encuentran algunos genes implicados en la inflamación, el metabolismo del colesterol y las vías de reciclamiento endosomal. En particular, la inflamación y la activación de la microglia, en respuesta a la acumulación del péptido amiloide y los agregados neurofibrilares, son fundamentales para explicar la patogénesis de la EA.

1.2 Patogénesis

La hipótesis de la cascada amiloide es una de las teorías propuestas que trata de explicar el surgimiento de la Enfermedad de Alzheimer, a partir de la acumulación progresiva del péptido A β en el cerebro. La escisión secuencial de la proteína transmembranal APP por las enzimas β y γ -secretasa, conduce a la formación de péptidos de amiloide de diferentes tamaños. Cuando los monómeros del péptido (A β 1-42) se agregan forman oligómeros, protofibras y fibras, mismas que al acumularse dan lugar a la formación de placas neuríticas (PN) insolubles, las cuales, se consideran una de las características más notables de la EA (figura 2).^{2, 5, 6}

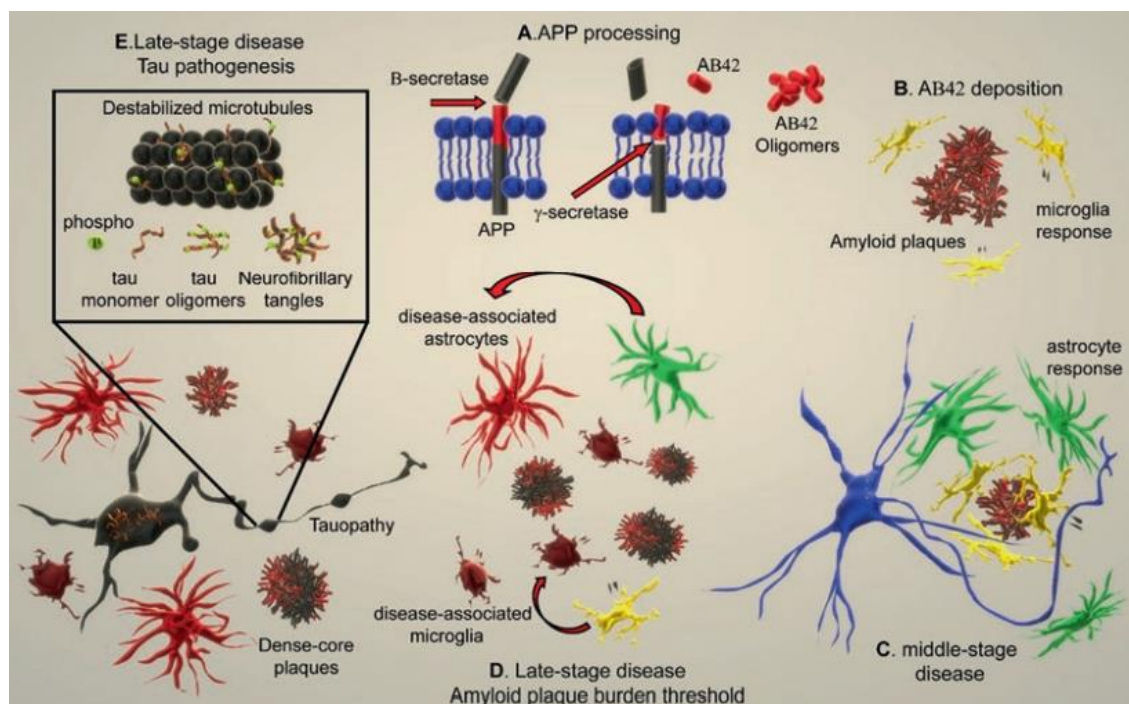


Figura 2. Hipótesis de la cascada amiloide. **A)** el péptido amiloide se genera por la escisión de la APP por las enzimas β y γ -secretasa; **B, C)** cuando los oligómeros del péptido se agregan, forman placas amiloides insolubles, capaces de activar a la microglía y de reclutar astrocitos. La respuesta de la glía parece ser protectora, ya que forma una barrera para reducir el daño en las neuronas cercanas; **D)** conforme la enfermedad progresa, la deposición de la placa alcanza un umbral generando placas de núcleo denso que producen distrofia neuronal e influyen en la patogénesis de tau. En etapas tardías de la EA, la microglía facilita la patogénesis de tau y promueve una respuesta inflamatoria neurotóxica. Además, los astrocitos exacerbaban la neurodegeneración al secretar factores neurotóxicos; **E)** la patología de tau se extiende a diferentes áreas del cerebro.⁷

Aunque esta hipótesis ha permitido conseguir grandes avances en el estudio de la EA, algunos autores consideran que debe replantearse con los datos obtenidos

en la actualidad. Por ejemplo, se debe considerar la evidencia experimental que ha demostrado que el A β provoca un desbalance entre las señales excitatorias e inhibitorias del cerebro, para explicar el déficit cognitivo de los pacientes.

Por otro lado, la función más estudiada de la proteína tau, es la de ensamblaje y estabilización de microtúbulos axonales y dendríticos, por lo que juega un papel muy importante en el mantenimiento de las proyecciones neuronales, en la sinapsis, así como en el transporte de vesículas y organelos. Cuando tau está hiperfosforilada, puede formar agregados que afectan la plasticidad sináptica a corto y largo plazo. En modelos de animales transgénicos de tau (como los que expresan tau humana con mutaciones que desarrollan Alzheimer en humanos), se ha observado una disminución en la potenciación a largo plazo (LTP) dependiente de la edad. También se ha observado que existe una disminución en la LTP en cortes de hipocampo de ratón tratados con oligómeros de tau extraídos de cerebros de pacientes con EA. Además de su estado de fosforilación, la formación de agregados de tau es promovida por su capacidad de ser escindida por diversas proteasas (tales como las caspasas 2, 3, 6; la calpaína 1 o ADAM 10, entre otras). El mismo A β es capaz de aumentar la agregación de tau en cerebros de ratones⁸. Se ha propuesto que la maquinaria de chaperonas (DnaJA2, Hsp60, clusterina, Hsp104 y Hsc70) pudiera estar involucrada en este proceso. En condiciones normales estas proteínas inhiben la agregación de tau; sin embargo, en condiciones patológicas, Hsp90, da estabilidad a los agregados. Una vez que se han formado los depósitos de tau y los microtúbulos se han vuelto inestables, el transporte axonal se vuelve deficiente, la membrana degenera y entonces procede el daño neuronal.^{2,6}

Aunque se sabe que tau y el Amiloide- β son marcadores patológicos que definen el desarrollo de la EA, e incluso se ha sugerido que la patología de tau precede a la formación de placas neuríticas, no se sabe con claridad el mecanismo que los vincula. Se ha sugerido que el sistema inmune innato, juega un papel muy importante en esta relación, ya que la microglia activada co-localiza tanto con las placas amiloides como con los ovillos neurofibrilares. También se sabe que algunos genes de riesgo para desarrollar la EA esporádica, como son CR1, CD33 y TREM2, están involucrados con vías de señalización del sistema inmune.^{2,8}

1.3 In inflamación.

A pesar de que la hipótesis de la cascada amiloide es la más aceptada para explicar la patogénesis de la EA, se sabe que hay algunos aspectos que no pueden ser explicados a partir de ella. Por ejemplo, en cerebros de personas sanas pueden encontrarse depósitos de A β , así como MNFs o bien, que la progresión de la enfermedad no se detiene aun cuando se reducen los niveles del péptido amiloide. Por esta razón, se ha sugerido que la inflamación es otro componente que podría jugar un papel importante en el daño neuronal observado, tal y como ocurre en otras enfermedades degenerativas, como la diabetes, la aterosclerosis, la artritis reumatoide, la Enfermedad de Parkinson, de Huntington o la esclerosis múltiple (figura 3).⁶

En la última década, la evidencia científica del vínculo entre la neurodegeneración y la inflamación le da sustento a lo anterior. Por ejemplo, se han encontrado células de la microglia alrededor de las placas amiloides, los ovillos neurofibrilares, así como depósitos de A β en los linfocitos T, microglia activada y astrocitos reactivos.^{5,6,9}

Diversos estudios relacionados con los niveles de citocinas en individuos con EA y controles muestran resultados contradictorios. Algunos estudios muestran niveles comparables de IL-10, IL-12, IL-6, IL-8 e IL-1 β ; mientras que otros sostienen que los niveles de IL-6, IL-8, TNF α y GM-CSF son mayores en pacientes con EA.

Además, se ha demostrado en modelos murinos que condiciones inflamatorias promueven el depósito del péptido amiloide. Esto se debe a que las citocinas inflamatorias favorecen la sobre-expresión de la β secretasa, que como se mencionó antes, es una molécula clave en la formación del péptido A β . Aunado a esto, el A β puede activar las vías de NF-KB y de las MAP cinasas, desencadenando la expresión de genes proinflamatorios.⁶

Otro de los daños más notorios observados en cerebros de personas con EA es la astrocitosis, provocada por dos factores: la activación de los astrocitos por las

citocinas inflamatorias y por la acumulación de A β en el cerebro. En esta condición, los astrocitos pueden aumentar la neurodegeneración al liberar óxido nítrico.⁶

Por su parte, la hiperfosforilación de tau también es facilitada por la neuroinflamación, a través de la IL-6, la IL-1 y el óxido nítrico. Además, las neuronas muertas liberan agregados de tau que también pueden activar a la microglia.⁶

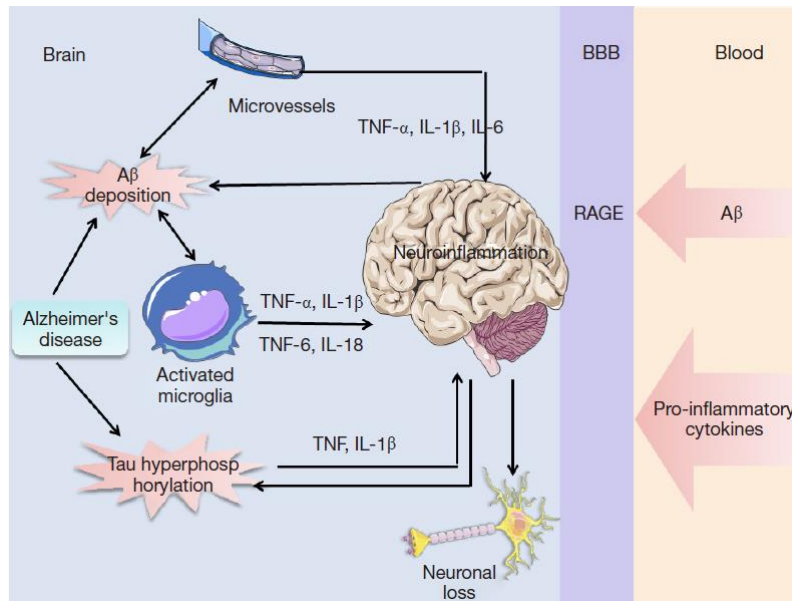


Figura 3. Papel de las citocinas proinflamatorias en el cerebro con EA. Se genera un círculo vicioso que comienza al acumularse el A β en el cerebro, lo cual promueve la activación de la microglia y la consecuente producción de citocinas proinflamatorias, mismas que inducen el procesamiento de la proteína APP y la acumulación de tau en el cerebro. Los pequeños vasos cerebrales de un paciente con EA también liberan citocinas proinflamatorias, incluso antes de formarse los depósitos de A β . Las citocinas proinflamatorias y el A β producidos en la periferia, pueden atravesar la barrera hematoencefálica en un proceso mediado por los receptores para compuestos de glicosilación avanzada (RAGE).¹⁰

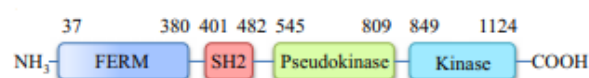
1.4 Vía JAK-STAT

Estudios recientes sugieren que diversas vías de señalización están desreguladas en la EA, lo cual conduce a la fosforilación aberrante de algunas proteínas celulares y a la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, la vía JNK y p38 están asociadas con muerte neuronal y la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3), está implicada en la neurotoxicidad inducida por el péptido Amiloide- β ¹¹. Una de las vías que recientemente se han encontrado asociadas con la patofisiología de la EA es la de

JAK-STAT; sin embargo, la información disponible aún no es suficiente para elucidar el mecanismo que explique dicha relación.

La vía de las cinasas Janus y los transductores de señal y activadores de la transcripción (JAK/STAT) son moléculas que juegan un papel muy importante en la señalización de citocinas, hormonas y factores de crecimiento, necesarios para la supervivencia, la diferenciación y la proliferación celular. Estas moléculas están implicadas en la patogénesis de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la artritis reumatoide, la psoriasis y la enfermedad inflamatoria intestinal. El blanco principal de las JAK activadas son los factores de transcripción STAT, una familia compuesta por siete miembros.^{12,13}

Las cinasas JAK pertenecen a la familia de las tirosina cinasas solubles, no integradas a receptor, y está formada por cuatro miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Mientras JAK1, JAK2 y TYK2 se expresan en todas las células en mamíferos, JAK3 se expresa en células hematopoyéticas. Como las citocinas hematopoyéticas y factores de crecimiento usan alguna de las JAK para la transducción de señal, estas cinasas están involucradas de manera crítica en el crecimiento, supervivencia, desarrollo y diferenciación de células del sistema inmune. Su estructura básica consiste en cuatro dominios estructurales compuestos a su vez de siete regiones homólogas (JH1-JH7). Los dominios JH1 y JH2 son casi idénticos; el primero es el dominio catalítico y JH2 es el dominio de la pseudocinasa, el cual tiene una función regulatoria pero no catalítica, ya que, en ausencia de ligando, suprime la actividad de JH1. JH3 y JH4 muestran cierta homología y conforman al dominio SH2, el cual está involucrado en estabilizar la conformación estructural de la enzima. Por su parte, JH5, JH6 y JH7 conforman el dominio FERM; el cual es crítico para la asociación de JAK a su receptor (figura 4).^{12,13,14}



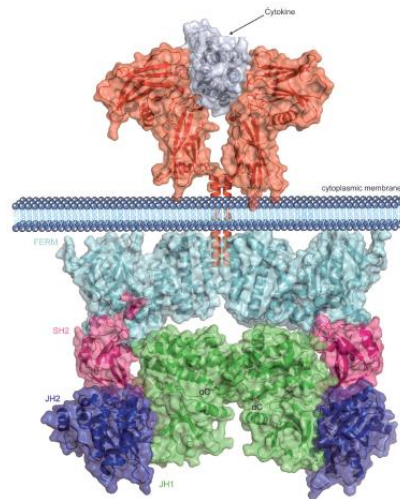


Figura 4. Arriba se muestra una representación de los dominios estructurales de la cinasa JAK2 compuesta, del N terminal al C terminal, por los dominios FERM, SH2, JH2 y JH1. Abajo se muestra un modelo del complejo señalizador EpoR-JAK2: por encima de la membrana plasmática se observa el dominio extracelular del receptor EpoR unido a Epo, por debajo de la membrana se muestran en diagrama de listón los dominios FERM, SH2, JH1 y JH2 de JAK2.¹⁵

La forma canónica de activación de esta vía inicia cuando las citocinas de tipo I o II se unen a su receptor, provocando su dimerización, esto a su vez favorece el acercamiento de las JAK en la cola citoplasmática del receptor. Las cinasas JAK se auto fosforilan (en el caso de JAK2 en Y1007 y Y1008) así como al receptor, lo cual promueve el reclutamiento de los STAT. Posteriormente, las JAK fosforilan a los STAT, lo cual provoca su liberación del receptor, su dimerización y su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo se unen a secuencias promotoras del DNA y activan la transcripción de genes relacionados con inflamación, apoptosis, diferenciación y proliferación (figura 5). Cuando no hay ligando unido al receptor, las JAK se mantienen asociadas con el receptor en su estado inactivo¹⁶.

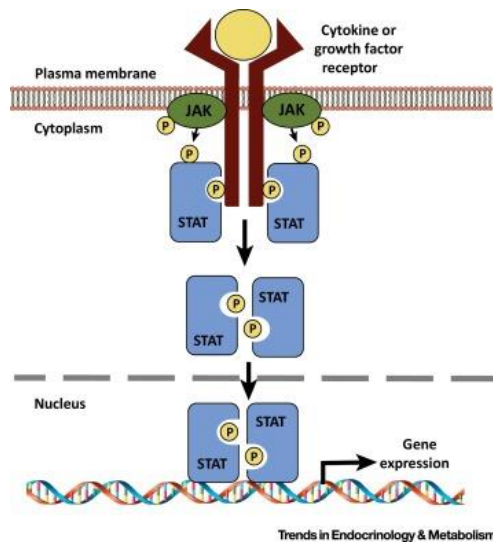


Figura 5. Forma de activación canónica de la vía JAK-STAT. Después de que el ligando se une a su receptor, las cinasas JAK se auto fosforilan (en el caso de JAK2 en Y1007 y Y1008) así como al receptor, lo cual promueve el reclutamiento de los STAT. Posteriormente, las JAK fosforilan a los STAT, lo cual provoca su liberación del receptor, su dimerización y su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo se unen a secuencias promotoras del DNA y activan la transcripción de genes.¹⁷

1.4.1 Regulación.

La regulación de la vía es estricta, sobre todo en dos condiciones: cuando no hay un ligando unido a los receptores y posterior a la activación. En el primer caso, la actividad debe mantenerse en niveles basales, por lo tanto, la actividad de fosfotransferasa es baja. En el segundo caso, después de la activación de la vía, los procesos de señalización deben detenerse mediante procesos de retroalimentación negativa.¹⁶

De forma colectiva, estos dos niveles de regulación son mediados por mecanismos en *cis* y en *trans*. En el primer grupo se encuentran las interacciones alostéricas que ocurren entre varios dominios de las JAK; por ejemplo, la auto inhibición que el dominio JH2 ejerce sobre JH1 y que provoca la supresión de los niveles basales de la actividad de la cinasa. La unión del ligando al receptor provoca un cambio conformacional en el complejo receptor-JAK, que libera la auto inhibición y permite la activación de las cinasas. Otro ejemplo es la interacción entre el dominio FERM y el dominio JH1, el cual, en el caso de JAK2 regula negativamente a la forma silvestre. También forman parte de los mecanismos regulatorios en *cis* la fosforilación o desfosforilación de los residuos de tirosina distribuidos a largo de las JAK (en el

caso de JAK2 son 49 sitios diferentes). Por su parte, los mecanismos en *trans* incluyen los procesos de retroalimentación negativa posteriores a la activación de las JAK, por ejemplo, la expresión de proteínas supresoras de señalización de citocinas (SOCS) que ocurre en respuesta de la activación de las JAK; estas proteínas se unen a las cinasas activas por medio de su dominio SH2 y las inhiben. Además, la unión de SOCS facilita la degradación proteosomal de las JAK. Otros reguladores en *trans* incluyen a las fosfatasas como SHP1 y SHP2, las cuales desfosforilan a las tirosinas necesarias para la activación de las JAK.^{16,18}

1.4.2 Asociación de la vía JAK-STAT con la Enfermedad de Alzheimer.

Algunas de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento suelen acompañarse de procesos inflamatorios crónicos en diferentes tejidos. Se sabe por ejemplo, que en la regeneración de múltiples tejidos, la vía JAK/STAT tiene un papel muy importante. Shen *et al.* (2016) reportaron que en una cohorte de individuos ancianos los niveles basales de STATs activados, primordialmente en linfocitos T, se encontraban elevados. Por su parte, Xu y col. (2015) demostraron, que la activación excesiva de la vía JAK-STAT en tejido adiposo envejecido, induce un fenotipo de senescencia en el que la producción de citocinas proinflamatorias se encuentra aumentada. También se ha reportado en la literatura, que el tratamiento farmacológico con inhibidores de JAK, puede usarse para tratar algunas enfermedades y condiciones asociadas con el envejecimiento; tales como enfermedades cardiovasculares, disminución en la regeneración del músculo esquelético, Enfermedad de Parkinson o de Alzheimer. En éstas últimas, la acumulación de α -sinucleína y Amiloide- β promueve la activación de células de la microglía por medio de la vía JAK-STAT, todo ello resulta en un fenotipo proinflamatorio y finalmente en neurodegeneración. Se ha demostrado en modelos *in vivo* e *in vitro* que, el tratamiento con inhibidores de JAK previene la degeneración de neuronas dopaminérgicas y atenúa los cambios inducidos por IFN- γ .²¹

En los últimos años ha habido gran interés por conocer cuál es el mecanismo que involucra a la vía JAK-STAT con la neurodegeneración y neuroinflamación, características de la EA. Utilizando estudios de asociación de genoma completo

(GWAS), análisis de vías metabólicas, bases de datos con información clínica y epidemiológica de más de 6 millones de pacientes, datos de expresión de mRNA obtenidos de la sangre y tejido cerebral de 511 pacientes, datos *in vitro* obtenidos del cultivo de neuronas de ratones expuestas al péptido Amiloide- β e información *in vivo* de ratones inyectados intra-cerebro-ventricularmente con oligómeros de Amiloide- β , Nevado-Holgado *et al.* (2019), confirmaron que algunos genes involucrados en la vía de señalización JAK-STAT (STAT2, STAT6, JAK1, JAK2, TYK2, PIAS1 y PIAS4) se encuentran alterados en diferentes etapas de la EA. Wan *et al.* (2010), Ben Haim *et al.* (2015), Reichenbach *et al.* (2018) y Toral-Ríos *et al.* (2020) entre otros, señalan que una de las vías de señalización reguladoras en ambos procesos es la de JAK/STAT3.

Ben Haim *et al.* (2015) demostraron en dos modelos de ratones transgénicos, que simulan a la EA, que la reactividad de los astrocitos debido a la presencia del péptido Amiloide- β está asociada con la activación de la vía JAK-STAT3.

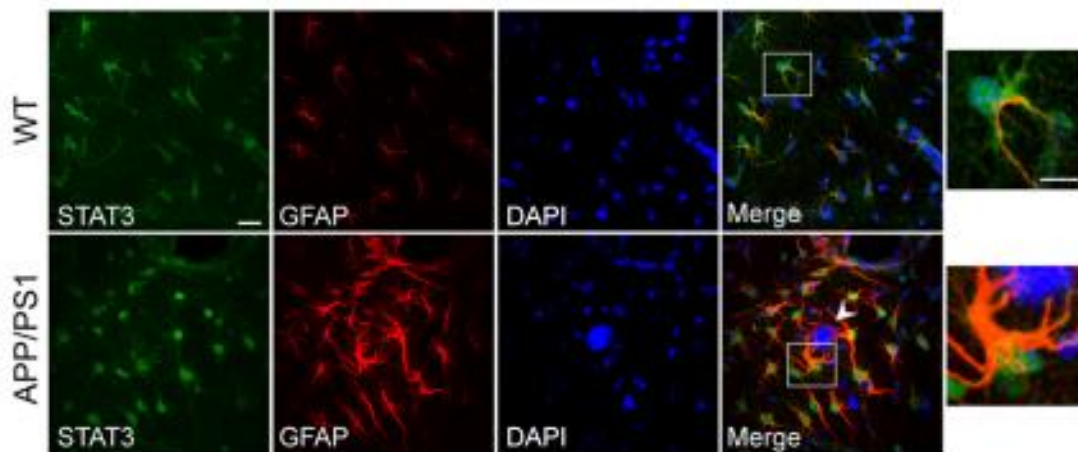


Figura 6. La vía JAK/STAT3 está activa en astrocitos reactivos en ratones transgénicos APP/PS1DE9. Las imágenes corresponden al hipocampo de ratones de 8 meses de edad que muestran una doble tinción para STAT3 (verde) y marcadores de reactividad astrocítica (GFAP: rojo). La cabeza de flecha señala las placas amiloides alrededor de las cuales se observan los astrocitos reactivos.

Además, comprobaron que al sobre-expresar la proteína SOCS3 por medio de un sistema lentiviral, dirigido hacia astrocitos, no sólo se inhibe la vía JAK/STAT3, sino además disminuye la expresión del marcador de activación de la proteína ácida

fibrilar glial (GFAP), tanto a nivel de proteína como de mRNA y que la morfología de dichas células regresa a un estado quiescente.

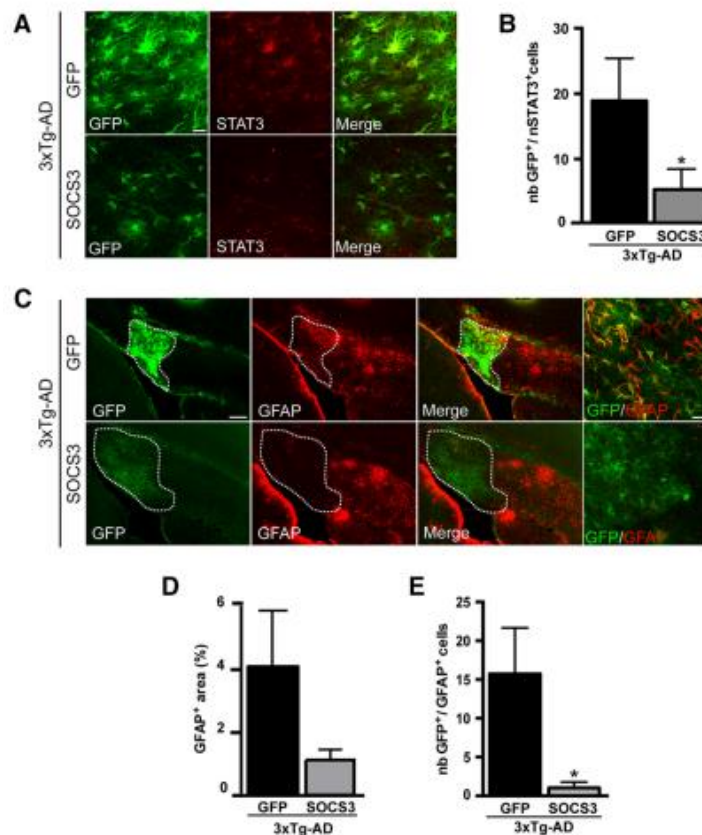


Figura 7 **A.** Doble tinción para GFP (verde) y STAT3 (rojo) en ratones transgénicos 3xTg-AD de 8 meses de edad cuyos astrocitos del subículo sobre-expresan la proteína GFP (control) o la proteína SOCS3+GFP **B.** Cuantificación del número de astrocitos GFP⁺ que co-expresan STAT3 en el núcleo **C.** Doble tinción para GFP (verde) y GFAP (rojo) en astrocitos del subículo de ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína GFP (control) o la proteína SOCS3+GFP **D.** Cuantificación del área GFAP⁺ en los ratones control o que co-expresan SOCS3 y GFP.

Reichenbach *et al.* (2018), utilizaron ratones transgénicos que simulan la EA para desarrollar un *Knockout* condicional en el que se eliminó a STAT3 en astrocitos. Ellos observaron que en los ratones control (transgénicos, pero que expresaban STAT3-WT), el 46% de los astrocitos GFAP⁺ en corteza eran también positivos a p-STAT3; mientras que en hipocampo esta proporción alcanzaba un 41%. Por su parte, en los ratones *Knock-out*, la activación de los astrocitos tanto en corteza como en hipocampo disminuyó un 80% con respecto de la proporción de los ratones control. Además, reportaron que en los ratones *Knock-out*, los niveles de péptido Amiloide-β soluble 1-42 y 1-40 se encuentran reducidos y las placas amiloideas son 50% más

pequeñas que en los ratones control. Aunque los cambios morfológicos observados en astrocitos no fueron notables, las células de la microglia en zonas cercanas a las placas mostraron mayor número de ramificaciones y procesos más largos que aquéllas que se encontraron en regiones alejadas. Además, fueron capaces de internalizar una mayor cantidad de Amiloide- β y sus niveles de neprilisina y CD36 se encontraron elevados en comparación con los controles (figura 8). Estos autores afirman que la delección de STAT3 promueve un cambio de fenotipo en astrocitos, del tipo A1 (neurotóxico) al tipo A2 (protector), ya que la expresión de marcadores como Amigo2, C3d y Tm4sf1 así lo sugiere. Además, la expresión de TNF- α e IL-1 β disminuye. Finalmente, demostraron que en los ratones *Knock-out*, el número de neuritas distróficas presentes alrededor de las placas neuríticas es menor si se compara con ratones transgénicos control.

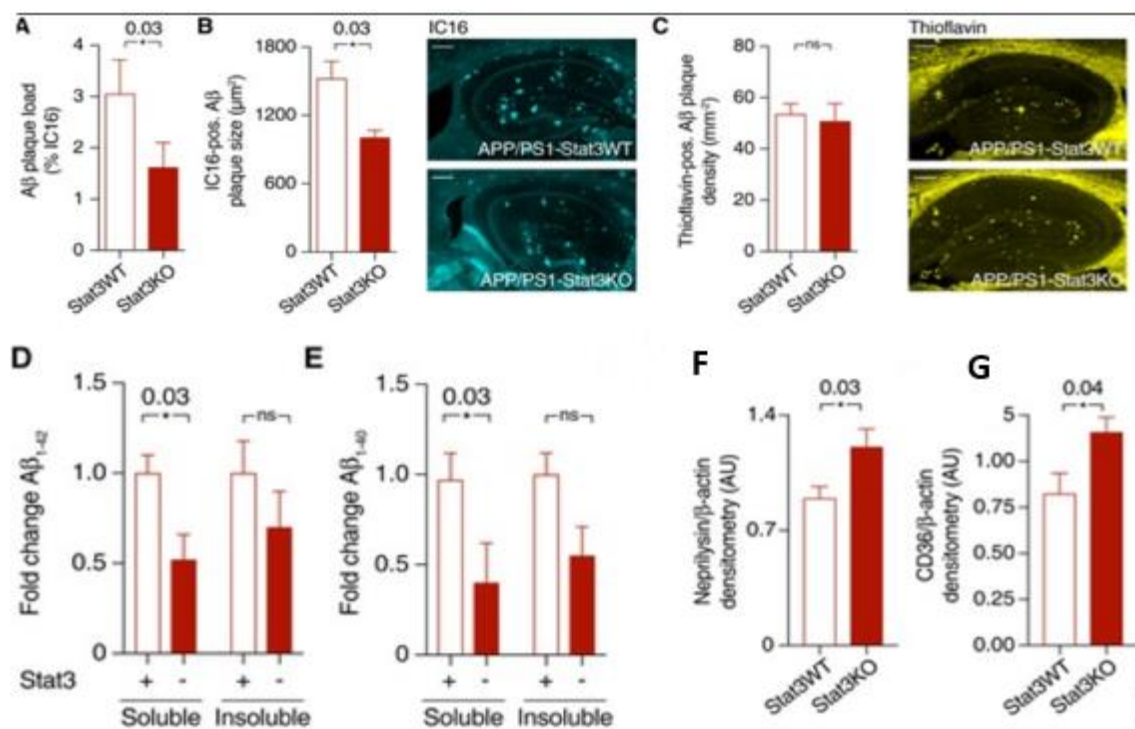


Figura 8. **A y B.** Carga del péptido Amiloide- β determinada tanto por la carga de la placa amiloide, como por el tamaño de la placa usando un anticuerpo anti-A β en ratones transgénicos APP/PS1-Stat3KO versus ratones APP/PS1-Stat3WT (escala 300 μm) **C.** Densidad de la placa, determinado por tinción con tioflavina (amarillo) en ratones transgénicos APP/PS1-Stat3KO versus ratones APP/PS1-Stat3WT (escala 250 μm) **D y E.** ELISA después de la obtención de homogenados de cerebro completo revelan que el Amiloide- β soluble 1-42 y 1-40 se encuentra reducido en ratones transgénicos APP/PS1-Stat3KO versus ratones APP/PS1-Stat3WT **F y G.** Cuantificación de los niveles de neprilisina y CD36 (enzimas que degradan el Amiloide- β) en ratones transgénicos APP/PS1-Stat3KO versus ratones APP/PS1-Stat3WT.

Wan *et al.* (2010) demostraron que el péptido Amiloide- β , promueve la fosforilación de STAT3 en las neuronas corticales y del hipocampo de ratones transgénicos (APP/PS1). Además de ello, se ha visto que en cultivos tratados con Amiloide- β , se induce un incremento en genes blanco STAT3 como iNOS o TRAIL. También demostraron que la regulación en la activación de STAT3, comienza antes de la formación de placas amiloideas; ya que puede observarse en ratones de cuatro meses de edad, en los cuales la acumulación del amiloide aún no ha comenzado. Igualmente comprobaron que la muerte neuronal inducida por el Amiloide- β , es dependiente de la expresión de STAT3, ya que al inhibir su expresión mediante el uso de siRNA, shRNA o un inhibidor farmacológico, la viabilidad celular se comporta casi a niveles de los controles. Por otro lado, la inhibición de STAT3 impide la escisión y activación de la caspasa 3 (figura 9), generando un efecto protector. Adicionalmente, por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación, comprobaron que la activación de TYK2 es requerida para la activación de STAT3. En esta investigación se corroboró que los procesos observados en los modelos murinos coinciden en los pacientes con la EA, ya que en tejidos cerebrales *post mortem* se encontró que el 70% de las células que mostraban elevados niveles de STAT3 fosforilado, eran neuronas NeuN⁺ y sólo el 7% eran astrocitos GFAP⁺.

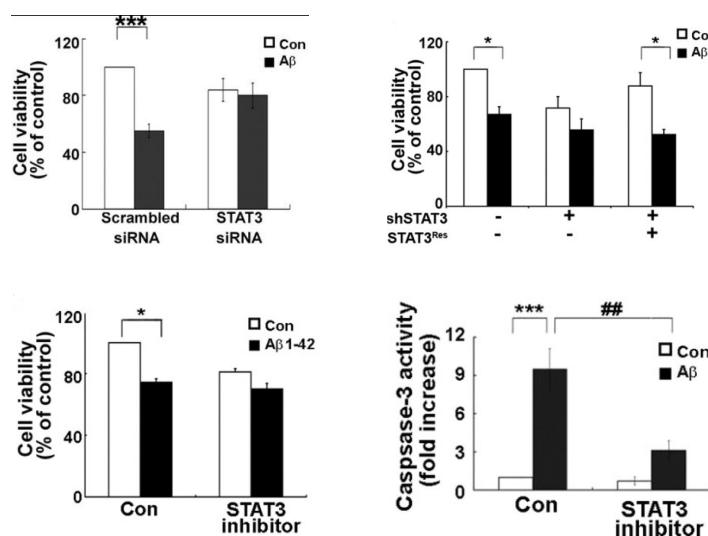


Figura 9. Viabilidad en células PC12 transfectadas con **A** un siRNA o con **B** un shRNA dirigido a STAT3 solo o junto con un shRNA resistente a STAT3. **C** Viabilidad de neuronas corticales pretratadas con un inhibidor de STAT3 30 minutos antes del tratamiento con el péptido Amiloide- β . **D** Cuantificación de la actividad de caspasa 3 de neuronas corticales pretratadas con inhibidor de STAT3 previo al tratamiento con el péptido Amiloide- β .

1.4.3 Inhibidores de la vía JAK-STAT.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, puede decirse que la vía JAK-STAT es de suma relevancia para la homeostasis del sistema inmune y puede ser un blanco terapéutico importante para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Dado que una de las características más importantes de la EA es la neuroinflamación inducida por el péptido Amiloide- β , este proyecto de investigación se enfocará en la inhibición de JAK2 como posible blanco terapéutico.

El potencial de la inhibición de JAK2 como estrategia terapéutica fue reconocida en la década de los 90s y casi 20 años después, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó al ruxolitinib y al tofacitinib para el tratamiento de desórdenes mieloproliferativos y artritis reumatoide respectivamente. Los inhibidores de JAK, también llamados Jakinhibs, bloquean competitivamente la unión del ATP al dominio JH1, a través de interacciones no covalentes. La similitud estructural de este sitio de unión con otros dominios activos de otras tirosina cinasas representa un reto para el desarrollo de inhibidores específicos para JAK2. Además, dada la alta conservación del dominio JH1 entre las diferentes JAK, desarrollar un inhibidor que bloquee selectivamente una de las JAK es un reto aún más complejo. Sin embargo, aún con todas estas complicaciones se han podido desarrollar múltiples Jakinhibs con una especificidad razonable; incluso los pan-Jakinhibs (que tienen actividad para múltiples JAK) son eficaces y con un perfil aceptable de efectos secundarios.¹²

Para JAK2, se han descrito dos tipos de inhibidores: los de tipo I y los de tipo II. Los primeros tienen como blanco el sitio de unión del ATP de la conformación activa de la enzima. Ruxolitinib fue el primer inhibidor desarrollado para JAK2 y JAK1 que se usó como terapia para neoplasias mieloides proliferativas. Otros inhibidores de tipo I que se han desarrollado para JAK2 son: Fedratinib, Lestaurtinib, Momelotinib, Pacritinib, Gandotinib, BMS-911543 y XL019. Muchos de ellos mimetizan la forma de

unión del ATP al sitio activo: la fenilalanina del motivo DFG establece contactos hidrofóbicos con la hélice α C y el loop catalítico, a esto se le conoce como conformación DFG-in (figura 10). Al ocupar el sitio de unión del ATP, estos inhibidores impiden la transferencia de fosfato desde el ATP a la Y1007.¹⁵

Por su parte, los inhibidores de tipo II reconocen la conformación no fosforilada de la cinasa, se unen al sitio de unión del ATP y a una bolsa extra que se forma únicamente en la conformación inactiva de la enzima (DFG-out). Esta bolsa DFG-out, se crea porque la cadena lateral de la fenilalanina no se alinea con la espina hidrofóbica que se encuentra en la conformación activa (figura 10). Al aprovechar las bolsas que se forman cerca del sitio de unión del ATP, este tipo de inhibidores logran aumentar su especificidad y selectividad; ya que este tipo de bolsas extra, están menos conservadas en las cinasas que la bolsa de unión al ATP. Hasta 2017, sólo se habían descrito dos inhibidores tipo II de JAK2, NVP-BBT94 y NVP-CHZ868; en ambos casos, se estabiliza la conformación inactiva de JAK2, con lo cual se logra una inhibición fuerte de la enzima.¹⁵

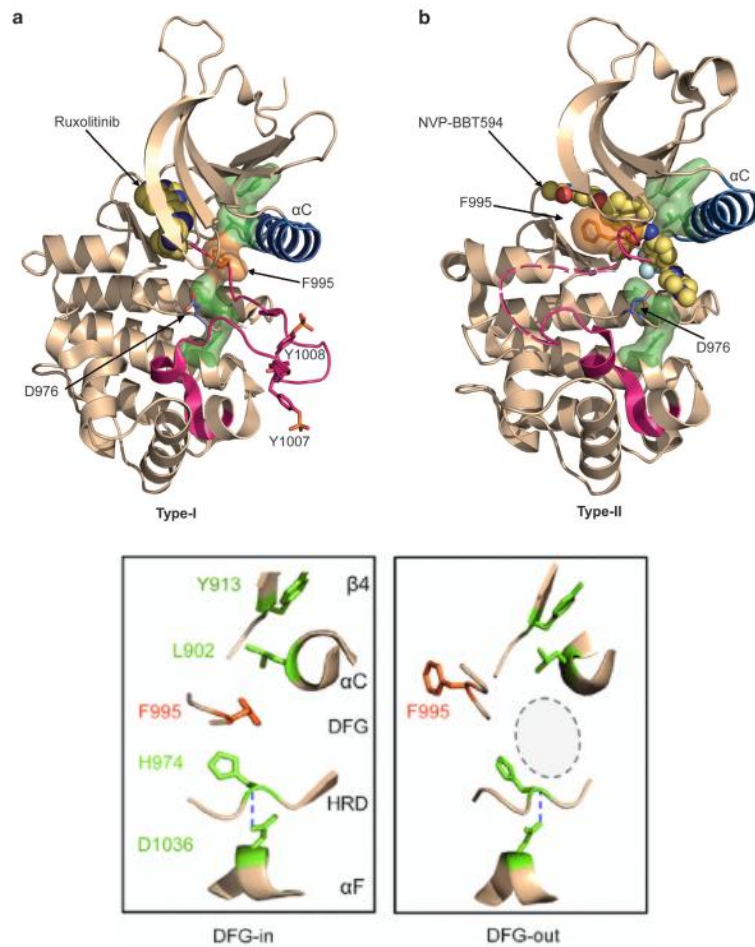


Figura 10 **A.** Modo de unión de inhibidor tipo I: Ruxolitinib se muestra en esferas en el sitio de unión del ATP de JAK2. La hélice α C se muestra en azul y el loop de activación en rosa adopta una conformación abierta. El residuo D976 del loop catalítico se observa en azul claro y se orienta hacia sitio activo. F995 en naranja adopta una posición alineada con la espina regulatoria hidrofóbica (coloreada en verde). **B.** Modo de unión de un inhibidor tipo II: NVP-BBT594 se muestra en esferas unido a JAK2 en su conformación inactiva. Se observa en rosa el loop de activación en conformación cerrada o inactiva. D976 no se orienta hacia e sitio activo, mientras que F995 se transloca de su sitio original, desalineándose de la espina regulatoria. **C.** La espina regulatoria hidrofóbica está compuesta por cuatro residuos hidrofóbicos localizados en las cadenas β 4, α C, motivo DFG y motivo HRD. Estos residuos sólo se alinean en la conformación activa de la cinasa, ya que la fosforilación del loop de activación (panel izquierdo) les brinda estabilidad. F995 del motivo DFG ocupa su pocket y se alinea con la espina regulatoria en el estado activo (DFG-in). En la conformación inactiva (panel derecho), la alineación se rompe y F995 se mueve de su posición original, dejando su pocket desocupado (óvalo gris).¹⁵

Dado que los inhibidores de JAK bloquean la señalización río abajo de las citocinas, los efectos adversos reportados tienen que ver con su mecanismo de acción e incluyen efectos en la hematopoyesis, respuesta inmune innata y adaptativa, así como crecimiento.

Uno de los efectos más comúnmente registrados entre los pacientes tratados con algún Jakinhib son las infecciones secundarias, por ejemplo, nasofaringitis, bronquitis, gastroenteritis, tuberculosis, paniculitis, choque séptico y osteomielitis. Otro efecto adverso común son las citopenias, ya que muchos factores de crecimiento hematopoyético como la eritropoyetina o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos señalizan a través de JAK2. Se han observado neutropenia, anemia, leucopenia, linfopenia y trombocitopenia leves a moderadas. Otro efecto adverso de particular preocupación al suprimir por un tiempo prolongado la vía JAK-STAT es el desarrollo de neoplasias; esto se debe a que tanto los interferones tipo I como los de tipo II tienen un papel fundamental en el proceso de inmuno-edición, el cual es crítico para la respuesta inmune antitumoral.¹²

En 2018 Li y col., identificaron las interacciones más importantes que forman 30 inhibidores de JAK2 depositados en la base de datos BindingDB. El criterio de inclusión aplicado fue que los compuestos debían tener un IC₅₀ menor a 1µM y que fueran estructuralmente diversos de acuerdo con un método de disimilitud máxima. Se hicieron ensayos de acoplamiento molecular de los inhibidores seleccionados en el sitio de unión de JAK2 y, según los resultados obtenidos, se obtuvieron las interacciones más importantes. Se consideró que existía una interacción farmacológica relevante si al menos el 50% de los inhibidores interactuaba con el mismo residuo. De esta forma, se encontraron dos interacciones hidrofílicas y cuatro hidrofóbicas como las más importantes. Casi el 90% de los inhibidores forman un enlace de hidrógeno con la bisagra (Leu932), seguida de cerca por el Asp994 del motivo DFG. Las cuatro interacciones hidrofóbicas más importantes se forman con Leu983, Ala880, Val863 y Leu855. Estos residuos forman una bolsa hidrofóbica que puede ser utilizada por compuestos heterocíclicos para estabilizar a los ligandos en el sitio de unión; también se sabe que al unirse el ATP estos residuos se localizan cerca de la adenina y la ribosa del ATP.

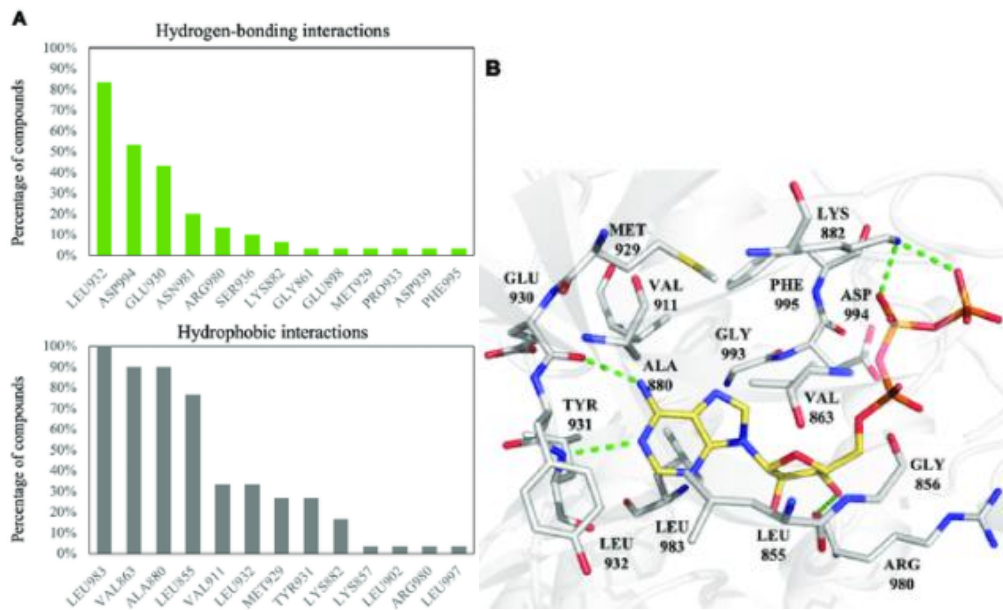


Figura 11. Análisis de las interacciones farmacológicas entre JAK2 y sus inhibidores. **A.** Enlaces de hidrógeno (verde) e interacciones hidrofóbicas (gris) más relevantes. **B.** Pose de unión del ATP (amarillo) en el sitio catalítico de JAK2. Las líneas punteadas verdes denotan enlaces de hidrógeno.²⁶

Tomando en cuenta estas características, el grupo de Li, *et al.*, realizó un screening virtual con los compuestos presentes en la base de datos del National Cancer Institute, a partir del cual se determinó que los mejores inhibidores tienen 3 sitios de interacción con la molécula de JAK2: en el sitio 1 se forma un enlace de hidrógeno con la bisagra, que es estabilizado por las interacciones hidrofóbicas formadas con Tyr931, Leu932 y Leu983; el sitio 2, se forma al interactuar el inhibidor con el Asp994 del motivo DFG por medio de un enlace de hidrógeno; mientras que el sitio 3, es aquel en donde interactúa el inhibidor con el Glu898. Parece que un enlace de hidrógeno en cada sitio, sobre todo con la bisagra, es crucial para una inhibición efectiva de JAK2, ya que los inhibidores que no tienen interacciones en alguno de los sitios mencionados, reducen sustancialmente su potencia.²⁶

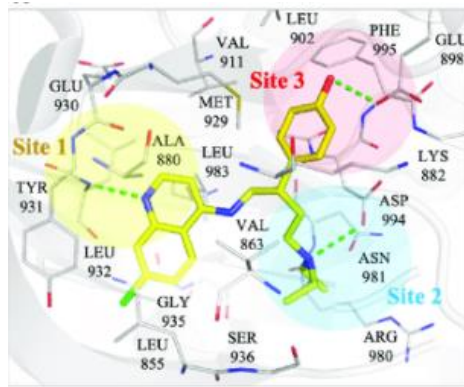


Figura 12. Interacciones de un inhibidor (amarillo) en el sitio de unión de JAK2 (gris). Las líneas punteadas verdes indican enlaces de hidrogeno, los círculos amarillo, azul y rosa corresponden a los sitios de interacción 1, 2 y 3 respectivamente.²⁶

1.5 Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

A pesar de los múltiples esfuerzos que se han aplicado para lograr un tratamiento eficaz para la EA, en la actualidad la FDA sólo ha aprobado tres diferentes tipos de fármacos con dicho objetivo: 1) inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEIs), 2) antagonistas de N-metil-D-aspartico (NMDA y, 3) inhibidores de glucógeno sintasa cinasa (GSK3 β). Sin embargo, desafortunadamente, ninguno de estos fármacos ha podido revertir la enfermedad.

Dado el carácter multifactorial de la EA, otras terapias han sido propuestas para atacar el problema desde diferentes perspectivas. Por ejemplo, el uso de antioxidantes como el resveratrol, apocinina y miricetina, ayudan a reducir la cantidad de radicales libres que dañan la mitocondria.^{5, 27}

Entre las terapias alternativas que se han estudiado, las que más fuerza han tenido son las enfocadas a la inflamación. Se han hecho múltiples estudios epidemiológicos que han señalado que el tratamiento crónico con antiinflamatorios no esteroideos puede ayudar a reducir o retrasar la EA. Sin embargo, hasta la fecha, el mecanismo por medio del cual lo logran no es claro.⁶

En ratones transgénicos utilizados como modelos de EA, el uso de ibuprofeno disminuye: la activación de la microglía, la tau hiperfosforilada, así como A β en el hipocampo. También se ha intentado bloquear el receptor γ , activado por

proliferadores de peroxisomas (PPAR- γ), mediante el uso de un antagonista como pioglitazona y se ha logrado disminuir la activación de la microglia, así como la transcripción de la β secretasa.⁶

El abordaje antiinflamatorio a partir del uso de inhibidores de TNF- α no ha tenido el éxito esperado, únicamente la talidomida ha sido capaz de disminuir la activación de la microglia, pero no se han visto efectos en la formación de los depósitos de A β .⁶

1.6 Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer con plantas medicinales.

Dado el carácter multifactorial de la EA, el desarrollo de fármacos que pudieran utilizarse como tratamiento deben de tener un amplio espectro de actividad y dirigirse a blancos distintos. Desde la primera década del 2000, el interés por los principios activos de algunos extractos herbales ha crecido, principalmente porque cumplen con las características mencionadas, por ejemplo, una sola especie, puede tener efectos antioxidantes, inhibir la AChE y reducir la producción de citocinas proinflamatorias.²⁸

Alrededor del mundo, hay aproximadamente 35,000 plantas usadas con propósitos medicinales ya que contienen más de 4,000 estructuras flavonoides, terpenos y fitoquímicos, como los alcaloides. Estas sustancias tienen propiedades antipsicóticas, antifatiga, antidepresiva, ansiolíticas, hipnóticas, antioxidantes, antiinflamatorias, antilipogénicas, entre otras. Las sustancias con efecto antidepresivo, antiinflamatorio, antipsicótico y antioxidante pueden resultar beneficiosos para los pacientes con EA. Sin embargo, el principal problema que enfrentan estas alternativas, es la preparación de tratamientos basados en dichas plantas ya que contienen diferentes grados de bioactividad y esta variabilidad las hace poco reproducibles. Los efectos de estos preparados se ven afectados considerablemente por el ambiente en el cual ha crecido la planta, la forma de recolección y almacenamiento, el proceso de extracción del principio activo, etc.²⁹

Las tres características que debe reunir una droga para que sea candidata a tratamiento para la EA son: que sea de alta biodisponibilidad, que cruce la barrera hematoencefálica, y que no tenga efectos adversos. Algunos de los tratamientos

herbales que se han estudiado, no sólo reúnen dichas características, sino además tienen una cuarta más: actúan de forma sinérgica.²⁹

Los estudios que se han enfocado en demostrar las propiedades de estas plantas son variados y podrían dividirse en: efectos anti-A β , antioxidante o anti-apoptosis, inhibidores de AChE y NMDA y antiinflamatorios.²⁹

Con respecto a las especies del género *Ipomoea*, los estudios realizados a la fecha son limitados; sin embargo, algunos de ellos han demostrado sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, liberadoras de ácido gama amino butírico (GABA) y neuroprotectoras, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* de distintas enfermedades, como obesidad, cáncer, epilepsia y EA.

1.7 El género *Ipomoea*.

El género *Ipomoea* es un grupo de plantas tropicales y templadas distribuidas principalmente en Sur y Centroamérica, así como en los trópicos de África; pertenece a la familia Convolvulaceae y tiene aproximadamente 600 especies. Toda la familia está compuesta por plantas herbáceas o arbustos con hojas en forma de corazón y flores en forma de campana (figura 13).³⁰



Figura 13. *Ipomoea stans*

Una de las características más notables de esta familia, es que sus células secretan resinas glicosídicas en los tejidos foliares y en las raíces. Aunque se sabe que son ellas las responsables de la acción purgante de las especies utilizadas en la medicina tradicional, su estructura en muchos casos no ha sido elucidada.³¹

Las resinas que han logrado caracterizarse son derivadas de ácidos grasos de 14 o 16 carbonos y son anfipáticas. Su componente hidrofílico está constituido de heteropolisacáridos de no más de cuatro monosacáridos diferentes; las unidades presentes son D-glucosa y epímeros de pentosas (L-rhamnosa, D-fucosa, D-quinovosa y D-xilosa). Su componente hidrofóbico puede formarse de ácidos alifáticos de cadena corta y ácidos grasos saturados de longitud variable. La composición química tan variable de las resinas obedece al hecho de que tienen múltiples posibilidades de formar anillos de ácidos glucosídicos. Hasta el año 2010 se conocían 53 ácidos glucosídicos diferentes.³¹

En el presente proyecto de investigación se trabajará con el ácido escamónico A, obtenido de la raíz de *Ipomoea tyrianthina*, cuya fracción lipofílica está compuesta de las tyriantinas I-VIII y de los ácidos butírico, (2S)-metilbutírico, tíglico y nílico; mientras que la fracción polar se compone de escamonina VI, tyriantina IX y ácidos tyriantínicos I y II.³¹

El género *Ipomoea* consta de 306 especies que han sido utilizadas desde tiempos inmemoriales con diferentes propósitos: nutricional, medicinal, ritual y en la agricultura. A continuación, se muestran algunos estudios que han demostrado la actividad antiinflamatoria y neuroprotectora de algunas especies.

1.7.1 *Ipomoea batatas*

Ipomoea batatas es probablemente la especie más estudiada dentro del género, y se ha reportado que tiene propiedades antiinflamatorias, antimicótica y bactericidas.³²

Li *et al.* (2018) utilizaron un modelo murino de obesidad inducida por una dieta alta en grasa, corroboraron que al suministrar *I. batatas* en el alimento, provocaba que los niveles de IL-6, IL-1 β y TNF- α disminuyeran y los de IL-10 aumentaran. Asimismo, demostraron que en los cerebros de los ratones tratados con esta planta, se reduce la expresión de los reguladores de inflamación COX-2 e iNOS y que tanto las actividades cognitivas como la memoria de estos animales son mejoradas. Como mecanismo de acción del extracto de la planta, se sugiere la inhibición de la fosforilación de ERK, JNK, p38, así como la traslocación de NF- κ B al núcleo.

1.7.2 *Ipomoea stolonifera*

Ipomoea stolonifera ha sido usada en la medicina tradicional china durante muchos años para tratar enfermedades como la artritis reumatoide. Cai *et al.* (2014), demostraron la actividad antiinflamatoria de su extracto en cuatro modelos *in vivo*, en los cuales inhibió la formación de edemas, promovió la reducción de los niveles de la enzima mieloperoxidasa y la producción de NO, PGE₂, TNF α , IL-1 β e IL-6 en macrófagos RAW264.7 activados con LPS.

1.7.3 *Ipomoea stans*

La principal propiedad que se ha demostrado para *Ipomoea stans* es su capacidad anticonvulsiva y neuroprotectora. Aguirre (2014) y León Rivera *et al.*, (2014b), evaluaron el extracto metanólico de la raíz de *I. stans*, en un modelo animal de epilepsia inducida por ácido kaínico. Se demostró que la administración simultánea del ácido kaínico y el ácido escamónico (C₄₀H₇₂O₂₀) extraído de la planta (figura 14), retrasa la aparición de la actividad convulsiva hasta 8 minutos; mientras que la administración previa del extracto evita la aparición de movimientos tónico-clónicos generalizados en el 100% de los animales (es decir, la actividad epileptiforme no se propaga a la totalidad del cerebro). Este último efecto puede ser comparado con algunos fármacos que son utilizados en el tratamiento de la epilepsia como el Diazepam o el fenobarbital. En ambos esquemas de aplicación (co-tratamiento y tratamiento previo), el extracto disminuye la severidad del daño en las neuronas de la región CA3 del hipocampo y aumenta la viabilidad celular.

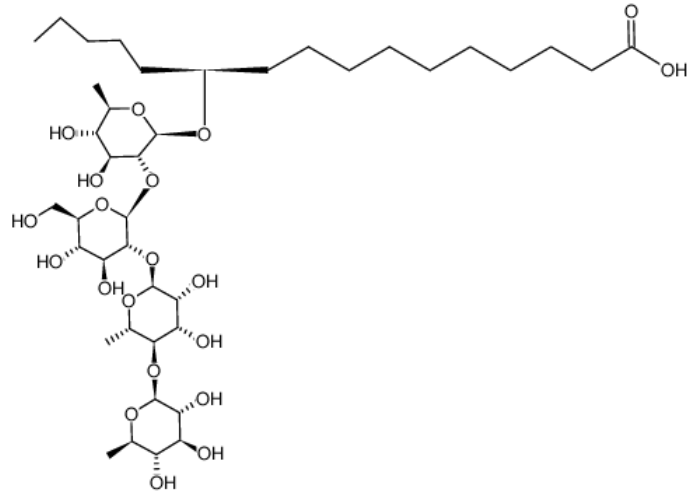


Figura 14. Formula 2D del ácido escamónico.

La activación de los astrocitos presentes en la región CA3 (denotada por su proliferación y engrosamiento de filamentos intermedios) disminuye significativamente en presencia del extracto (figura 15).

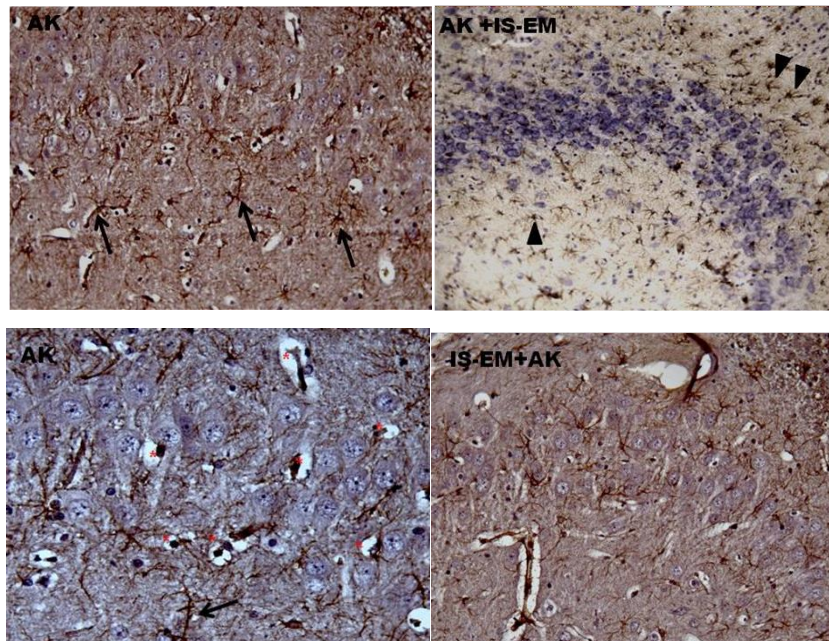


Figura 15. Inmunohistoquímica GFAP de la región CA3 del hipocampo. AK+IS-EM: co-tratamiento ácido kaínico y extracto de *I. stans*, IS-EM+AK: pretratamiento con *I. stans*. Las flechas muestran activación de astrocitos.

Finalmente, se demostró que la expresión de IL-1 β también disminuye en el pretratamiento con *I. stans*, si se le compara con los animales a los que sólo se les aplicó ácido kaínico.

1.7.4 *Ipomoea thyriantina*.

Ipomoea thyriantina (figura 16) tiene una distribución en el centro y oriente de México en zonas de matorral xerófilo, bosque de pino-encino y pastizal. Se trata de una planta perenne de tipo rastrera, su raíz es tuberosa y puede llegar a medir hasta 40cm, su tallo mide alrededor de 3mm de diámetro, sus hojas son cordiformes con ápices acuminados y sus flores son de color rosa y púrpura, se disponen en forma axial y pueden medir hasta 8.5cm de longitud; tiene frutos con cuatro semillas de color oscuro de 5mm de longitud. Es conocida comúnmente como “raíz escamonea”, “manto de la virgen” o “quiebraplato”. En la medicina tradicional mexicana, la raíz es utilizada como purgante, sedante, antidepresivo, abortivo, hipotensor, antimicrobiano y para el tratamiento de enfermedades como epilepsia, meningitis, hidrocefalia y trastornos renales.³⁴



Figura 16. *Ipomoea thyriantina*

Los componentes más importantes que han sido extraídos de la raíz de la planta son el ácido escamónico y la escamonina 1. En el año 2009 y 2014 León *et al.* utilizando un modelo de epilepsia que consiste en la inyección de pentilentetrazol (PTZ), reportaron que las tyriantinas A, B, C, D y E (heterodímeros tipo éster del ácido escamónico) tienen efecto sedante, vaso relajante y promueven la liberación de GABA en la corteza cerebral de las ratas. Los resultados mostraron que aquellos animales tratados con una dosis intraperitoneal de 80 mg/kg de tyriantinas C, D y E, tiene un efecto protector contra la mortalidad inducida por PTZ en un 31.2, 28.3 y 26.9% respectivamente.

También se observó que la administración intraperitoneal en dosis de 20, 40 y 80 mg/kg incrementa la latencia y duración del sueño inducido por pentobarbital sódico, lo cual sugiere que el extracto de la planta tiene actividad sedante sobre el sistema nervioso central.

Para comprobar la liberación de GABA, se hicieron cortes del cerebro de los animales experimentales y se incubaron con las tyriantinas (20µg/mL). Se observó que tanto la tyriantina A como la B, inducen una liberación de GABA a partir de los 30s, misma que se mantiene hasta los 180s en el caso del primer compuesto. Además, la tyriantina A libera ácido glutámico hasta 100 pmol/mg a partir de los 180s, mientras que la tyriantina B libera glutamato a partir de los 180 pmol/mg (figura 17). Adicionalmente, en el mismo estudio se comprobó que todas las tyriantinas tienen un efecto vasodilatador sobre el endotelio de la aorta parecido al que tiene el carbachol.

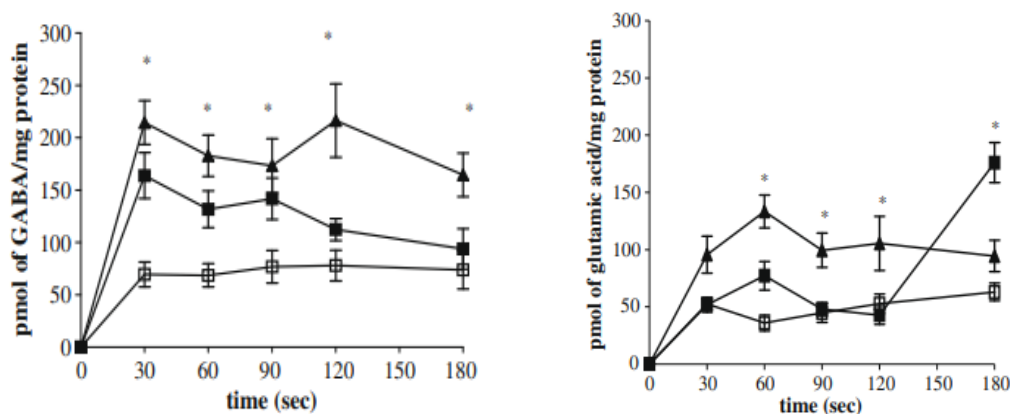


Figura 17. Liberación de GABA y ácido glutámico promovidas por tyriantina A (triángulo) y tyriantina B (cuadro negro). El grupo control no fue incubado con tyriantinas (cuadro blanco).

Por su parte, Jaimes (2019) utilizando el mismo modelo de epilepsia con PTZ, demostró que la escamonina 1 (en dosis de 40 y 80 mg/kg) impide la activación de la microglia y reduce los niveles de IL-1 β , IL-6, TNF- α en cerebro de ratón. También observó que las células de los animales que recibieron un co-tratamiento de PTZ-escamonina 1, conservan sus núcleos bien definidos y presentan una reducción en edema intersticial, en comparación con las células de los animales que sólo recibieron PTZ (figura 18).

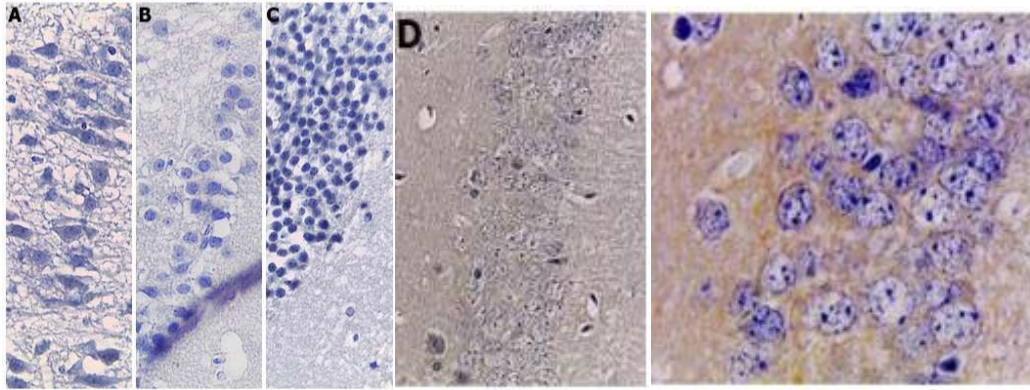


Figura 18. Daño causado por la inyección intraperitoneal de PTZ en el hipocampo. **A.** Región CA3 (reactividad a anti IL-1 β) **B.** Región CA1 (reactividad a anti TNF- α) **C.** Giro dentado (reactividad a anti IL-6) **D.** Región CA1 con co-tratamiento escamónica1-PTZ (reactividad a anti IL-1 β).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1 Ácido escamónico como regulador de la neuroinflamación

Los resultados anteriores sugieren que el ácido escamónico tiene un papel importante en la regulación del proceso inflamatorio en modelos animales de epilepsia. Usando un modelo de neurotoxicidad inducida por la inyección intrahipocámpal de oligómeros de Amiloide- β , Becerril (2016) comprobó que el ácido escamónico disminuye la gliosis y la activación de astrocitos de una manera dosis dependiente (10, 15 y 20 mg/kg).

La administración de oligómeros de Amiloide- β , provoca daño en las distintas áreas del hipocampo, incluyendo el giro dentado, donde se observan vacuolizaciones y picnosis. En la región CA3 hay una disminución de la densidad neuronal, picnosis y pérdida de la morfología neuronal. Sin embargo, cuando los animales son tratados intraperitonealmente con ácido escamónico, 30 minutos antes de la inyección del péptido amiloide, se observa una disminución del daño celular (figura 19).

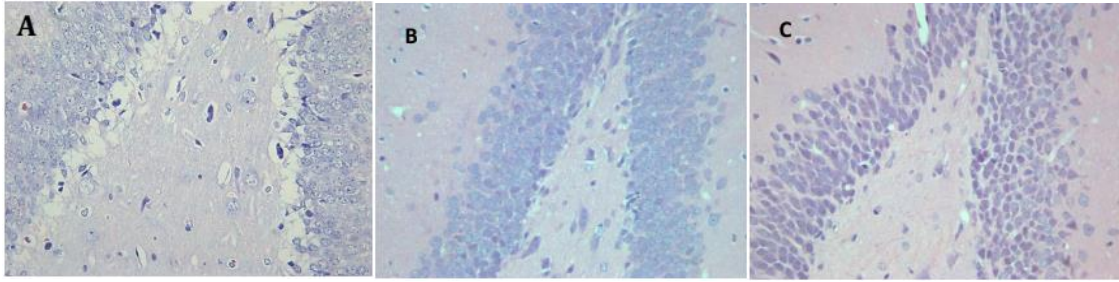


Figura 19. Tinción hematoxilina-eosina. Giro dentado de ratas tratadas con: A. 100 μ M de A β B. 15 mg/kg de ácido escamónico 30 minutos antes de la cirugía C. 20 mg/kg de ácido escamónico 30 minutos antes de la cirugía.

La integridad de las poblaciones neuronales en ese modelo fue evaluada mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-NeuN. Los resultados obtenidos indican que los animales tratados con el ácido escamónico de *I. tyrianthina* tienen poblaciones neuronales más íntegras que aquellos que no recibieron el tratamiento. Estos resultados sugieren un posible papel neuroprotector, el cual es más evidente a la dosis de 20 mg/kg (figura 20).

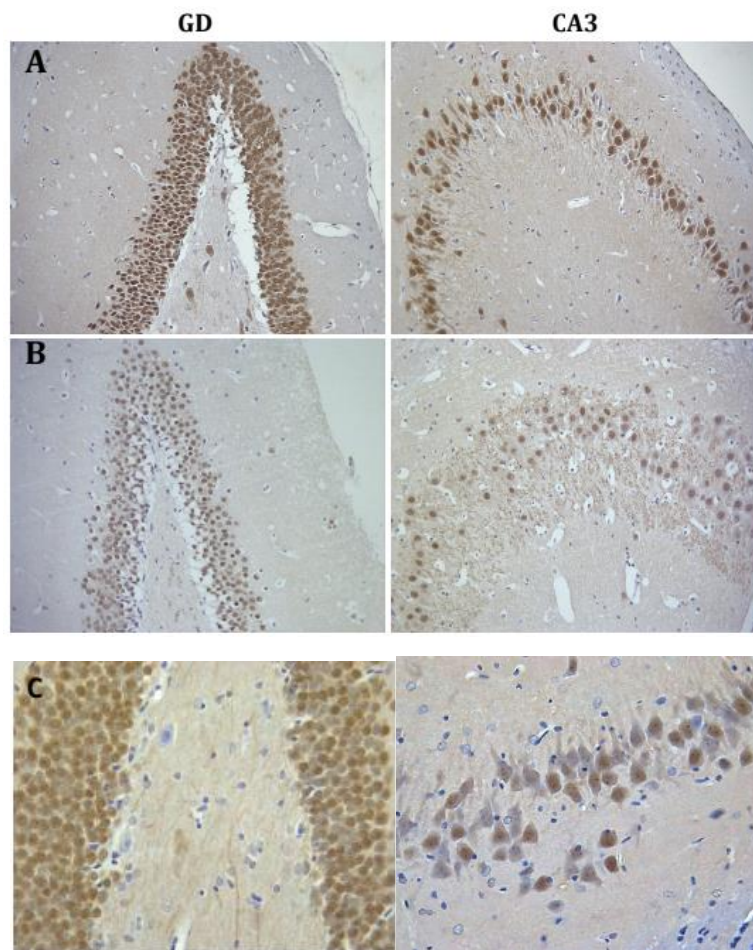


Figura 20. Expresión de NeuN. **A.** Niveles basales **B.** Expresión tras la inyección de Amiloide- β **C.** Expresión del grupo experimental tratado con dosis de 20 mg/Kg de ácido escamónico 30 minutos antes de la inyección de Amiloide- β .

Al evaluar de manera más clara el proceso de astrogliosis y gliosis, mediante microscopía confocal, se pudo observar que la microinyección de oligómeros de Amiloide- β , promueve la activación de astrocitos y microglia, evidenciada por la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la proteína Iba1 (ionized calcium binding adaptator molecule 1). Sin embargo, la administración de ácido escamónico, previo a la cirugía, disminuye de manera significativa este efecto. También se pudo apreciar que la morfología de los astrocitos presentes en tejido de ratas tratadas con ácido escamónico es similar a la de los astrocitos quiescentes (figura 21).

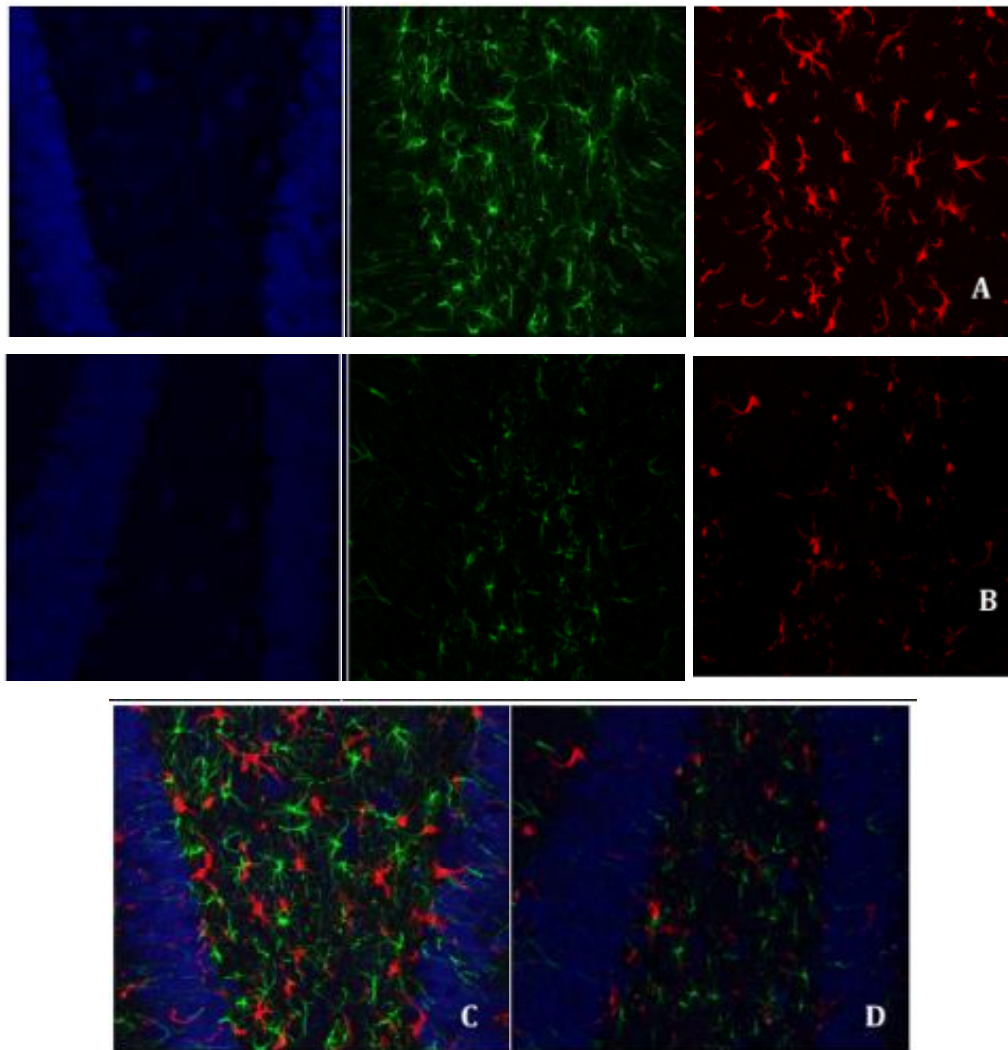


Figura 21. Microscopía confocal de giro dentado de cerebro de rata. Azul: anti-NeuN, verde: anti-GFAP, rojo: anti-Iba1. **A.** animales no tratados con ácido escamónico **B.** animales pretratados con 20 mg/kg de ácido escamónico previo a la aplicación de A β 1-42 **C** y **D.** Sobreposición de los canales.

2.2 La inhibición de la vía JAK-STAT3 disminuye la neuroinflamación inducida por el amiloide β

En 2020 Toral-Ríos y colaboradores, utilizaron un modelo de inyección intrahipocámpal de oligómeros de péptido Amiloide- β 1-42 y evaluaron cómo este estímulo, modifica la expresión de STAT3 en el cerebro de ratas. Ellos midieron la expresión de STAT3 total, por medio de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, encontrando que en el grupo de ratas tratadas con Amiloide- β , presentaba células de la microglia STAT3⁺ en hipocampo y la corteza cerebral, desde las 18 horas posteriores a la cirugía y esta inmuno-reactividad permanecía hasta 30 días después. Estas células mostraron una morfología hipertrófica, citoplasmas hinchados e

inmuno-reactividad en el núcleo; estas características no se observaron en los animales control (figura 22).

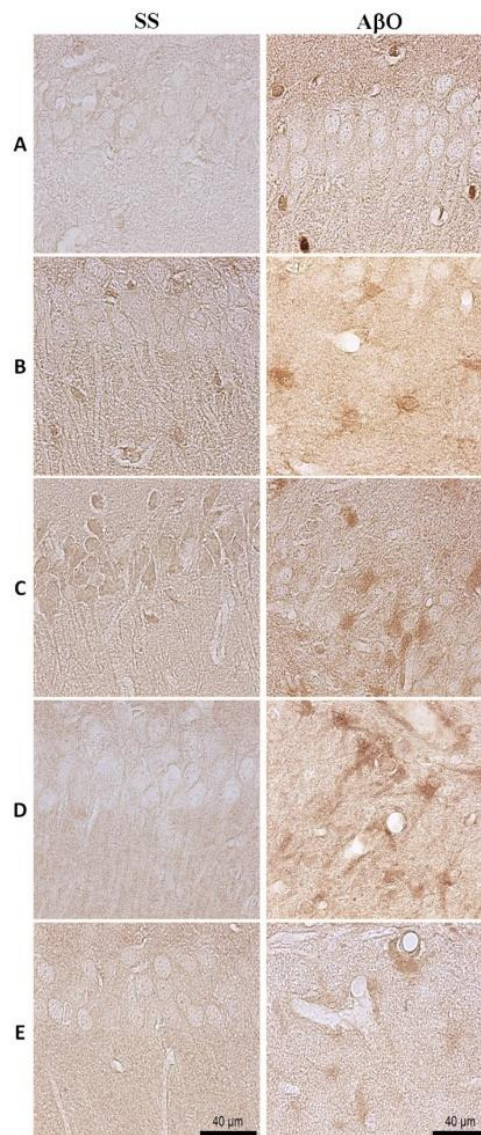


Figura 22. Expresión de STAT3 en el hipocampo de ratas inyectadas intrahipocampalmente con el péptido Amiloide- β **A.** A las 18 horas, **B.** A las 72 horas, **C.** A los 7 días, **D.** A los 15 días y **E.** A los 30 días después de la microinyección (escala= 40 μ m).

Para identificar la localización de STAT3, realizaron inmunofluorescencia a las 72 horas y 7 días después de la microinyección y encontraron que la mayoría de las células STAT3⁺ eran astrocitos con inmuno-reactividad en el núcleo. No obstante, en el día 7 se detectó la presencia de algunas neuronas de la región CA1 del hipocampo con inmuno-reactividad en núcleo (figura 23)

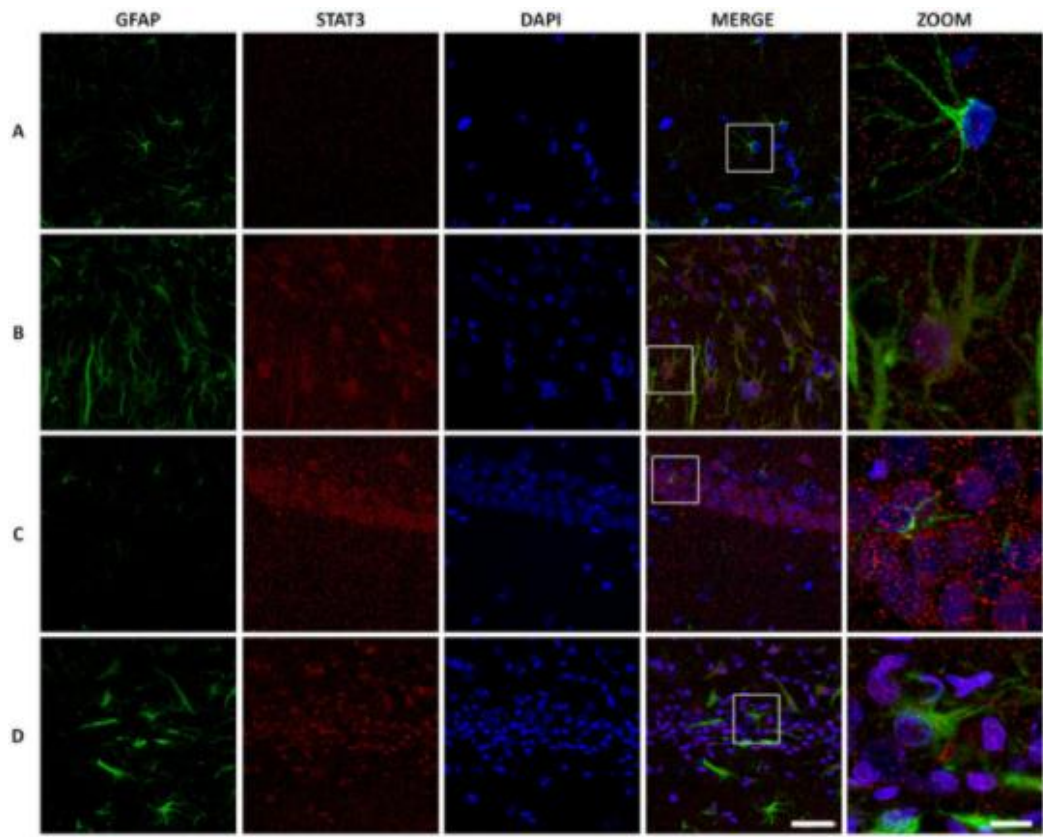


Figura 23. Expresión de STAT3 en astrocitos **A.** A las 72 horas de microinyección de péptido Amiloide- β **B.** A las 72 horas de microinyección de solución salina (control) **C.** A los 7 días de microinyección de péptido Amiloide- β **D.** A las 72 horas de microinyección de solución salina (control)

Posteriormente, realizaron un ensayo de inhibición con AG490 (un inhibidor de JAK2), en cultivos de neuronas y astrocitos previamente expuestos al péptido Amiloide- β y reportaron que, en comparación con los cultivos tratados únicamente con el amiloide, con la aplicación de una dosis de 25 μ M del inhibidor, la reactividad de los astrocitos disminuía y el número de neuronas maduras aumentaba. No obstante, al aumentar la dosis a 50 μ M de AG490, si bien se lograba una disminución en la expresión de STAT3, también disminuía el número de neuronas maduras (figura 24).

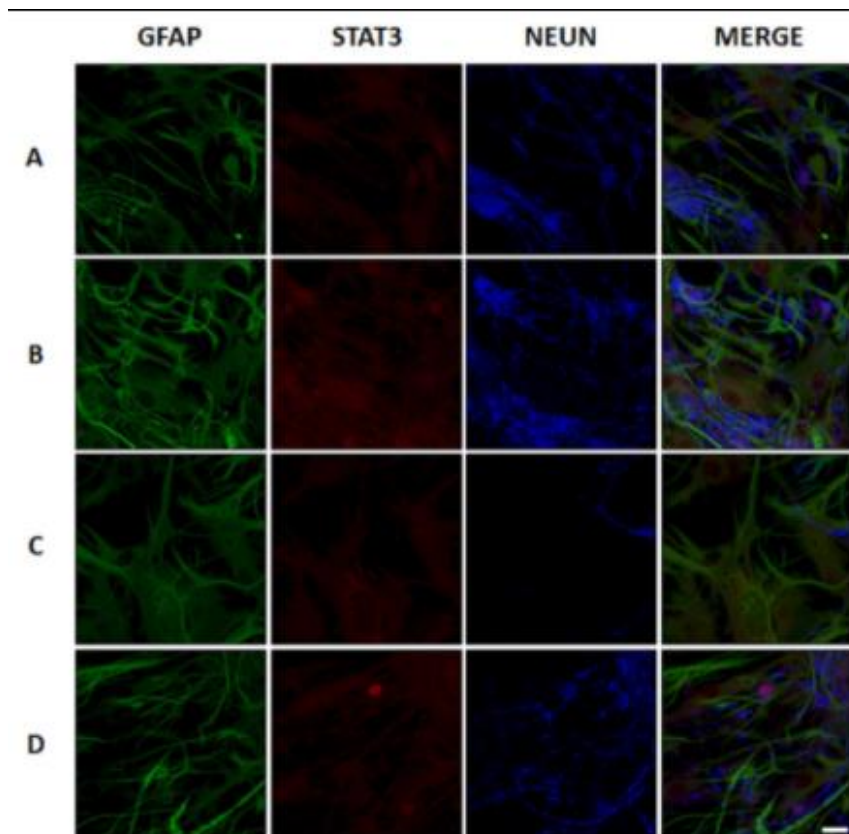


Figura 24. Ensayo de inhibición con AG490 en cultivo primario de hipocampo después de la exposición durante 72 horas a **A.** vehículo, **B.** AG490 25 μ M, **C.** Oligómeros de Amiloide- β 20 μ M y **D.** AG490+Oligómeros de amiloide. Expresión total de STAT3 (rojo), astrocitos con GFAP (verde) y neuronas con NeuN (azul) (escala= 40 μ m)

El mismo ensayo de inhibición fue conducido con Stattic, un inhibidor de STAT3, y los resultados reportados son similares al anterior. La presencia de astrocitos no reactivos y el número de neuronas maduras que se logran observar al aplicar una dosis de 5 μ M es similar a la del grupo control. También se encontró que cuando el inhibidor se aplicaba previo al Amiloide- β , la expresión de STAT3 se disminuía aún más y se prevenía la muerte neuronal (figura 25).

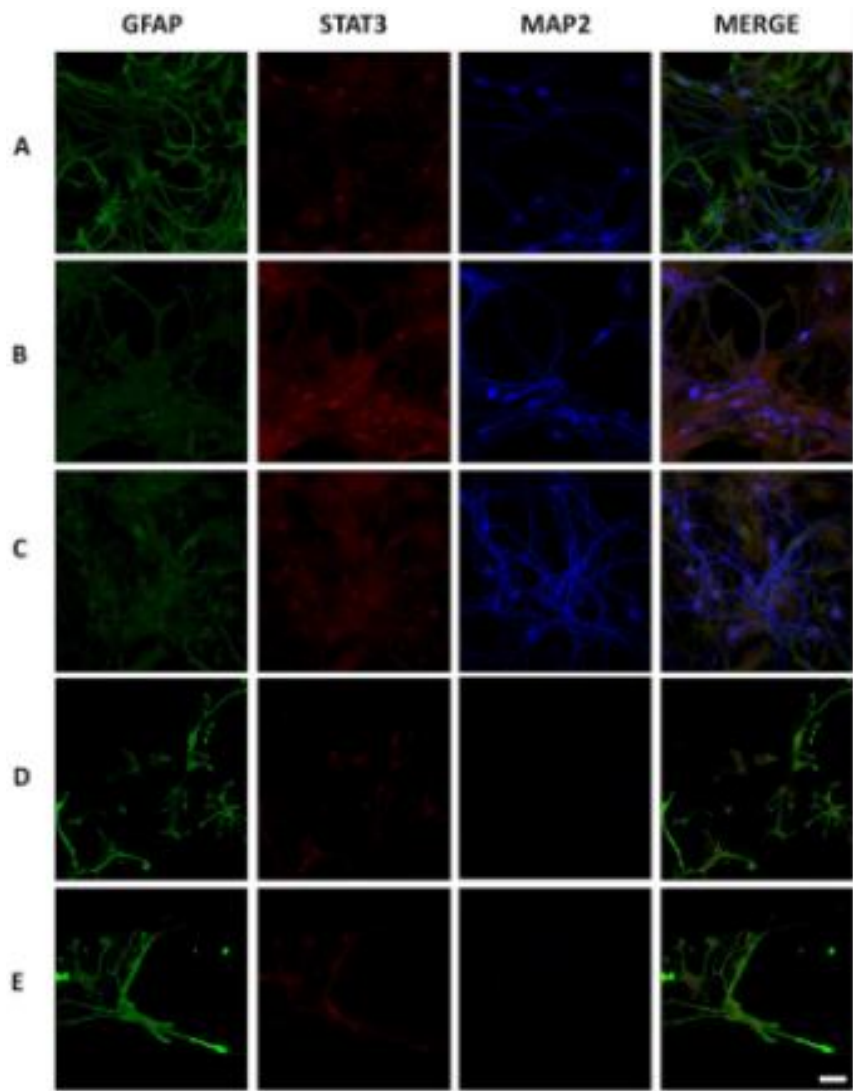


Figura 25. Efecto de Stattic en cultivo primario de hipocampo. **A.** Vehículo, **B.** Oligómeros de Amiloide- β , **C.** 5 μ M de Stattic, **D.** 10 μ M de Stattic y **E.** 20 μ M de Stattic. Expresión de GFAP (verde), STAT3 (rojo) y MAP2 (azul).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

La Enfermedad de Alzheimer, es la sexta causa de muerte en el mundo, es un desorden neurológico que afecta al 70% de las personas que padecen una demencia. Se caracteriza por una pérdida de la memoria y de múltiples funciones cognitivas. El principal factor de riesgo es la edad, y considerando el aumento en la esperanza de vida en la población, se ha convertido en un problema de salud grave.

Las causas que originan la enfermedad aún no son claras y se sabe que puede verse influenciada por factores genéticos y ambientales. El tratamiento farmacológico convencional aceptado por instituciones como la FDA no es curativo, ya que

únicamente retrasa su progreso. En general, está basado en moléculas que funcionan como inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas de N-metil-D-aspartato e inhibidores de glucógeno sintasa cinasa.

Otro tipo de terapéutica está enfocada al desarrollo de vacunas dirigidas a la eliminación de péptidos ya sea de Amiloide- β o tau. Por ejemplo, bapineuzumab, gantenerumab, crenezumab, solanezumab, ponezumab y aducanumab; estos anticuerpos tienen la capacidad de reconocer diferentes conformaciones del péptido A β . Respecto a la proteína tau, se ha realizado la administración de anticuerpos monoclonales como el PHF1, aunque los resultados obtenidos no revelaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de tau totales. Otro anticuerpo empleado es el llamado TOMA (Tau Oligomeric Monoclonal Antigen), el cual mostró una reducción en los niveles de oligómeros de tau, y actualmente se encuentra en fases de estudios clínicos. Aunque muchas de estas vacunas aún están siendo analizadas, algunas otras no han logrado avanzar en las pruebas clínicas por los efectos adversos que provocan, o por no demostrar diferencia con respecto de sus controles.

En la actualidad, muchas investigaciones se han enfocado en el estudio de los principios activos que se encuentran en las plantas como fuente de posible tratamiento para muchas enfermedades; esto obedece principalmente, a que los compuestos presentes en ellas tienen varios blancos farmacológicos y son capaces de mejorar el progreso de la enfermedad desde distintas perspectivas.^{28, 29} Particularmente, los compuestos que tengan como blanco a las enzimas cinasas han cobrado relevancia, ya que éstas tienen un papel fundamental en enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, como la EA, infecciones microbianas o inflamación.

En el caso de la cinasa JAK2 su relevancia pato-fisiológica es ejemplificada por la cantidad de pequeñas moléculas y terapias biológicas que la tienen como blanco y que se encuentran en etapas avanzadas de pruebas clínicas.

Es por ello que, recientemente en nuestro grupo de trabajo se evaluó la capacidad del péptido Amiloide- β como activador de la vía de señalización JAK2-STAT3 y su posible relación con la neurodegeneración observada en la EA. Se demostró que, al inhibir dicha vía, el daño neuronal y la proliferación de células de la microglia disminuyen. Adicionalmente, también se comprobó la eficacia del ácido

escamónico para reducir la neuroinflamación utilizando un modelo de inyección intracraneal del péptido Amiloide- β .

En este proyecto se pretende evaluar en un modelo *in silico* la capacidad de unión e inhibición del ácido escamónico sobre la cinasa JAK2. Es importante mencionar que la planta de la cual se obtendrá el ácido escamónico (así como otras del mismo género), ya han mostrado su eficacia neuroprotectora e inhibidora de la activación de la microglia. Sin embargo, los mecanismos de su acción y su actividad antiinflamatoria no han sido estudiados de forma específica.

4. HIPÓTESIS

El ácido escamónico puede interactuar directamente con sitios específicos de la enzima JAK2 e inhibir su función.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar por medio de un modelo *in silico* la interacción del ácido escamónico con el sitio catalítico de la enzima JAK2 y determinar la capacidad de inhibición de su actividad enzimática.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar las interacciones que forma el ácido escamónico en el sitio catalítico de JAK2.
2. Identificar por medio de acoplamiento molecular qué tipo de inhibidor de JAK2 es el ácido escamónico.
3. Evaluar la selectividad del ácido escamónico para la inhibición de los distintos miembros de la familia de las JAK.
4. Calcular el IC₅₀ del ácido escamónico a partir de un modelo matemático basado en el modelo *in silico*.
5. Predecir las características fisicoquímicas y biológicas del ácido escamónico.

6. MÉTODO

6.1 Construcción del ligando.

Para diseñar la molécula del ácido escamónico se empleó el programa Avogadro³⁸; para ello se agregaron los átomos de hidrógeno de acuerdo con el estado de protonación de la molécula a pH fisiológico (7.4). Posteriormente, se hizo la optimización de su geometría y la minimización de su energía utilizando el campo de fuerza MMFF94s y se realizó una búsqueda de sus conformeros mediante el algoritmo genético.

6.2 Preparación de la proteína.

Se descargaron de Protein Data Bank (PDB)³⁹ los cristales con los siguientes códigos: 3JY9 del dominio catalítico de JAK2 en su forma activa, 3UGC del dominio catalítico de JAK2 en su forma inactiva, 6VGL de ruxolitinib unido al dominio JH1 de JAK2, 6VGE de fedratinib unido al sitio catalítico de JAK2, 3FUP de tofacitinib unido al dominio catalítico de JAK2, 4JI9 de TG101209 unido al dominio JH1 de JAK2, 4EI4 del dominio de la cinasa de JAK1, 5LWM del dominio JH1 de JAK3, 5F20 del dominio catalítico de TYK2. Posteriormente, a todos los cristales se les agregaron los átomos de hidrógeno polares y se eliminaron las moléculas de agua, con el programa Discovery Studio⁴⁰.

Previo a realizar el acoplamiento molecular, se confirmó que todos los cristales tuvieran las características necesarias para dicho proceso, mediante las herramientas EDIA y Structure Profiler del servidor Proteins plus⁴¹. EDIA, emite un puntaje de acuerdo con la forma en la que el cristal se ajusta a la densidad electrónica de los átomos que lo componen, un puntaje de 0.8 o superior indica un buen ajuste. Por su parte, Structure Profiler aplica diferentes criterios, como la longitud y ángulo de torsión de los enlaces, ocupación del sitio activo, resolución del cristal o el índice de difracción, para analizar la calidad tanto del ligando co-cristalizado como del sitio activo de la proteína.

6.3 Acoplamiento molecular.

Una vez hechos los análisis de los cristales, se realizó el acoplamiento molecular utilizando el programa AutoDock Vina acoplado al software de screening virtual PyRx⁴². En este programa se agregaron las cargas de Gasteiger y de Kollman al ligando y a la proteína, respectivamente. Se mantuvo la proteína fija y el ligando flexible. Como primer acercamiento, se hizo un docking ciego para ubicar todos los posibles sitios de unión del ácido escamónico con las distintas JAK y posteriormente, se hizo un docking dirigido hacia el sitio activo de cada enzima. Los diferentes acoplamientos moleculares, se realizaron con todos los conformeros del ácido escamónico y se eligieron las mejores poses de acuerdo con los residuos de las proteínas con los que interactuaban, su complementariedad con el sitio de unión, su exposición al solvente, la profundidad con la que se colocaban en el sitio y la energía de unión calculada por el programa.

6.4 Validación de los resultados del acoplamiento molecular.

Dado que la molécula del ácido escamónico no se encuentra co-cristalizada con ninguna proteína, se hicieron dos tipos de validación de los resultados obtenidos por el docking molecular. El primero consistió en corroborar que el ligando se uniera al mismo sitio al que se unen inhibidores ya reportados en la literatura como el ruxolitinib, fedratinib, tofacitinib y TG101209 y que formaran interacciones con los mismos residuos. El segundo tipo de validación consistió en hacer el acoplamiento molecular utilizando la herramienta JAMDA del servidor Proteins Plus.

Todos los mapas de interacciones generados, tanto en PyRx como en JAMDA, fueron visualizados con el programa Discovery Studio.

6.5 Cálculo de I.C.50.

El docking molecular se realizó con el cristal 3JY9 de JAK2, utilizando como ligando a los inhibidores baricitinib, fedratinib, AZD1480, BMS-911543, CEP-33779, NVP-BSK805, TG101209, XL019, ruxolitinib, ilginatinib, NVB-BVB808, gandotinib. Utilizando las energías de interacción resultantes y los valores respectivos de I.C.50

reportados en la literatura, se construyó un modelo matemático para poder inferir el I.C.50 del ácido escamónico.

6.6 Características fisicoquímicas y biológicas del ácido escamónico

Para conocer las propiedades fisicoquímicas y actividad biológica propuestas para el ácido escamónico, se recurrió a los servidores Computational Chemistry Laboratory⁴³, SwissADMET⁴⁴, SwissTarget⁴⁵, Pass Online⁴⁶ y Osiris Datawarrior⁴⁷. La mayoría de ellos utilizan descriptores moleculares para estimar parámetros como logP, logS, toxicidad o blancos biológicos.

6.7 Optimización de la molécula de ácido escamónico.

Con el objetivo de mejorar las características fisicoquímicas del ácido escamónico, se construyeron nuevas moléculas partiendo del andamio lipídico de la original. Se utilizó el programa Avogadro para construir moléculas más hidrofóbicas que tuvieran cero, uno, dos o tres azúcares unidos al esqueleto lipídico. Con ellas se hizo docking molecular y se calcularon las propiedades fisicoquímicas y biológicas, tal y como se detalló anteriormente.

6. RESULTADOS

Se realizó la búsqueda de confórmeros por medio del algoritmo genético, y se pudieron identificar cinco moléculas con energías de -1646.31 KJ/mol (1), -1720.28 KJ/mol (2) -1853.11 KJ/mol (3), -1895.86 KJ/mol (4) y -2405.01 KJ/mol (5) (figura 26).

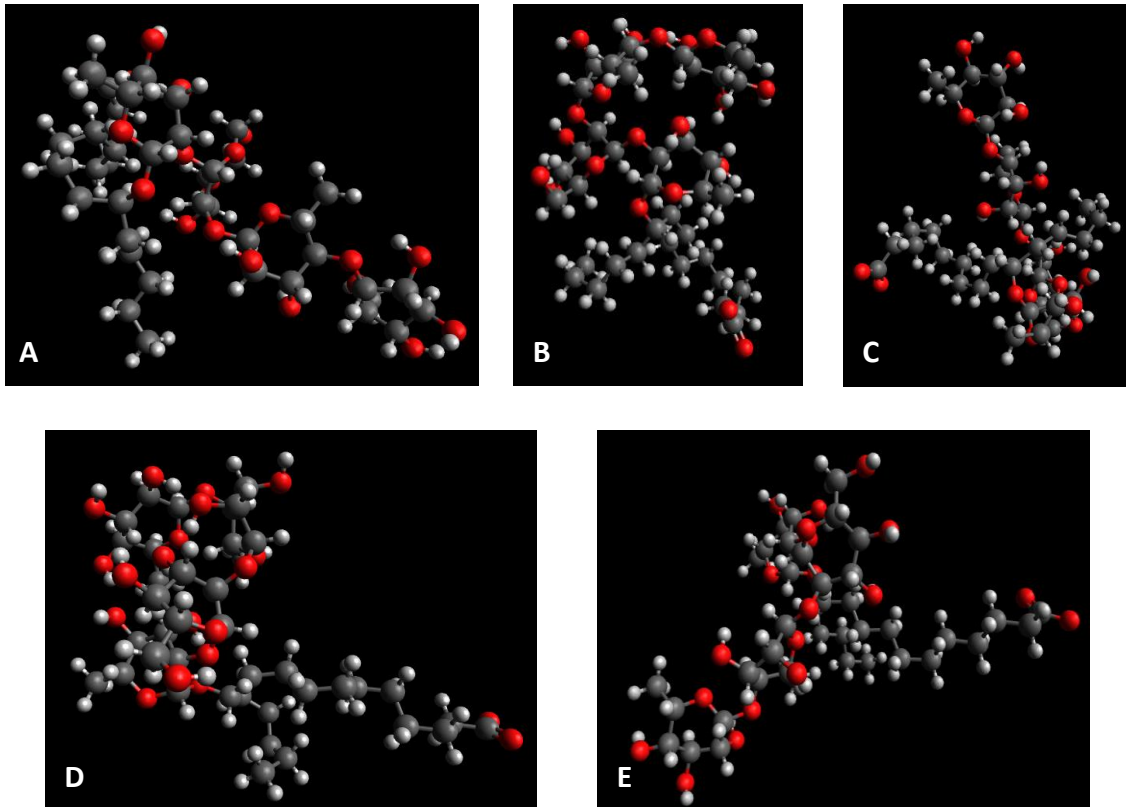


Figura 26. Representaciones geométricas de los cinco conformeros del ácido escamónico. **A.** -1646.31 KJ/mol, **B.** -1720.28 KJ/mol, **C.** -2405.01 KJ/mol, **D.** -1895.86 KJ/mol y **E.** -1853.11 KJ/mol

Debido a que desconocíamos cuál de los conformeros encontrados del ácido escamónico correspondía a la forma activa que podría unirse a la enzima JAK2, se decidió trabajar con las cinco estructuras.

7.1 Acoplamiento molecular

Se realizaron acoplamientos moleculares ciegos, para identificar las posibles regiones en el sitio catalítico de JAK2 a las cuales podría unirse el ácido escamónico. Se lograron identificar tres posibles bolsas: la bolsa donde se une el ATP, la bolsa cercana a la hélice α C y una bolsa que se ubica por encima de las hélices α E, α G y α K. En la figura 27 se observan las tres formas de unión, el color amarillo y verde corresponden a las dos posiciones que puede adoptar el conformero 3 para unirse a la enzima y el morado muestra al conformero 5.

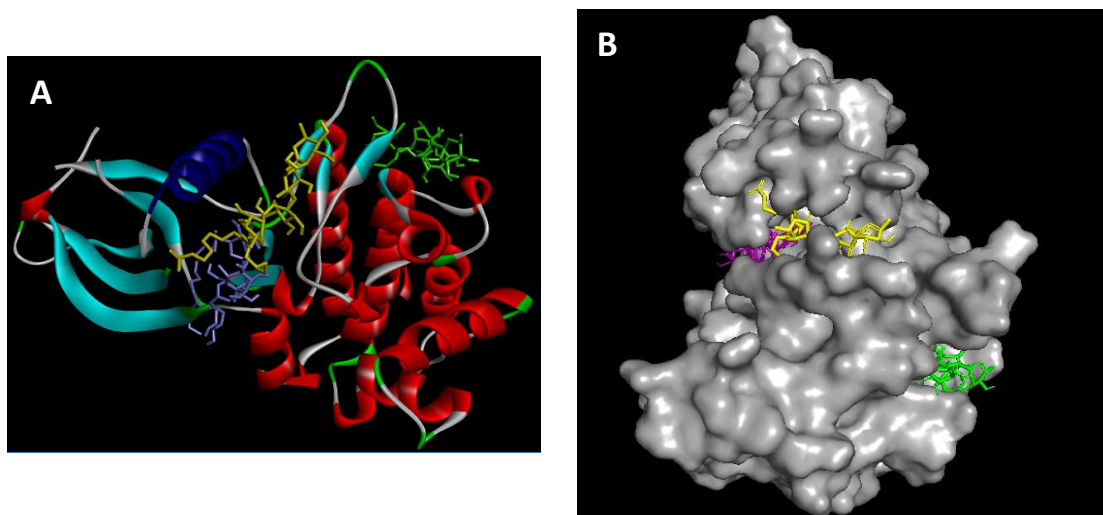


Figura 27. La figura muestra los sitios posibles en los que el ácido escamónico podría unirse al dominio catalítico de JAK2. En la bolsa de unión del ATP (amarillo, energía de unión de -6.6 kcal/mol), en la bolsa de la hélice αC (morado, energía de unión de -7.0 kcal/mol) y en la bolsa de las hélices αE , αG y αK (verde, -6.0 kcal/mol). En (A) se muestra la representación de listones de JAK2, en donde la hélice αC se observa en color azul. En (B) se muestra la representación de la superficie de JAK2.

Posteriormente y con ayuda de la herramienta DogSite Scorer, del servidor Proteins plus, se ubicaron las bolsas donde puede unirse el ácido escamónico, las cuales se muestran en la figura 28. En morado se muestra la bolsa de unión al ATP, en amarillo la de la hélice αC y en rosa la que se ubica por encima de las hélices αE , αG y αK . Las características de cada bolsa se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Características generales de cada bolsa a la que puede unirse el ácido escamónico en el dominio JH1 de JAK2.

Bolsa	Volumen (\AA^3)	Profundidad (\AA)	Drug Score	Radio de hidrofobicidad
ATP	610.62	18.96	0.81	0.44
Hélice αC	768.51	23.78	0.85	0.47
Hélices αE , αG y αK	368.32	13.07	0.62	0.60

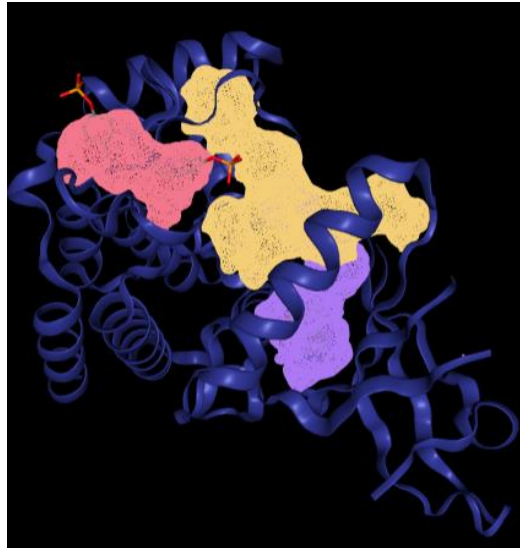


Figura 28. Bolsas del dominio JH1 en las que puede unirse el ácido escamónico.

Al unirse a la bolsa del ATP, el ligando interactúa con residuos del sitio catalítico; por ejemplo, con el gatekeeper (Met929) forma un enlace alquil, con la bisagra (Glu930, Leu932 y Tyr931) forma tanto interacciones hidrofóbicas como enlaces alquil; con el motivo DFG (Asp994, Phe995 y Gly996) forma interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno. También es muy importante hacer notar que forma un puente de hidrógeno con el Asp976 —el cual, es un residuo que ayuda a estabilizarlo en el sitio activo— e interacciona de forma hidrofóbica con Lys882 —que es uno de los residuos con los que también interactúa el ATP— (figura 29).

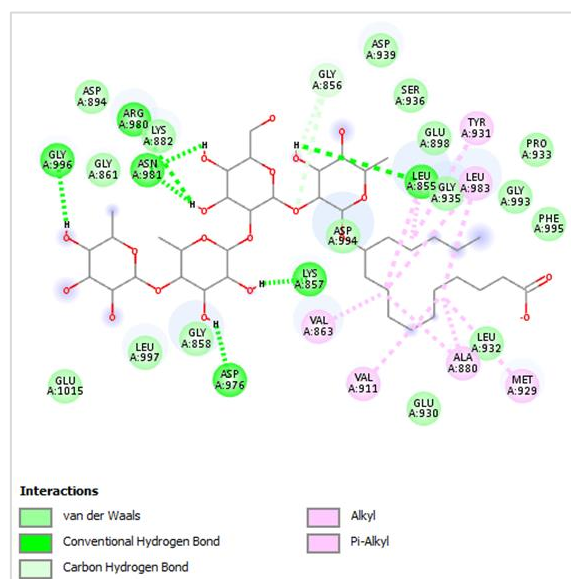


Figura 29. Interacciones del ácido escamónico (confórmero 5) con residuos del sitio activo de JAK2

Las interacciones que forma el ácido escamónico cuando se encuentra unido en la bolsa de la hélice α C pueden observarse en la figura 30. Es notable la presencia de ocho enlaces de hidrógeno con los residuos Arg975, Lys999, Asp894, Ptr1008, Lys1011, Gly861, Gln885 e His886 (figura 30).

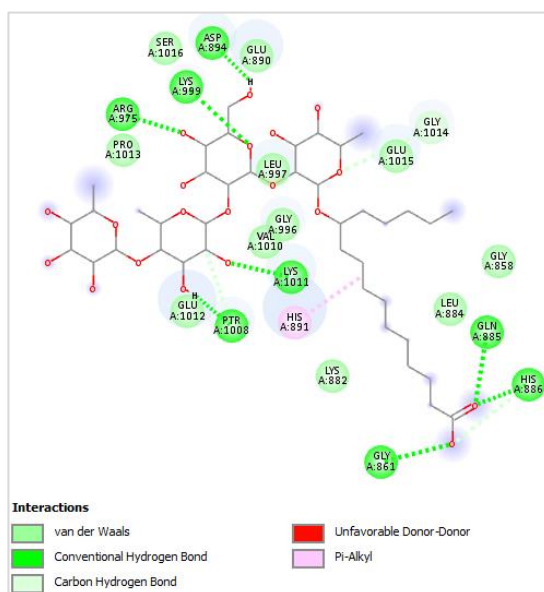


Figura 30. Interacciones que el confórmero 3 forma con los residuos de la bolsa de la hélice α C

Por su parte, las interacciones que forma el ácido escamónico en la bolsa de las hélices α E, α G y α K son tanto enlaces de hidrógeno como enlaces alkil e interacciones hidrofóbicas (figura 31).

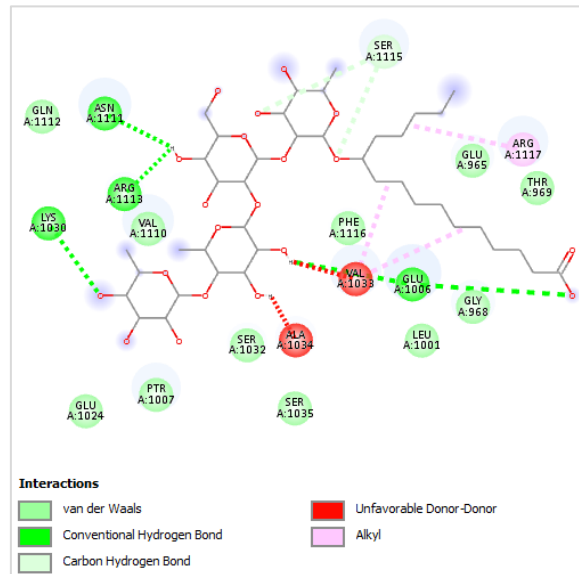


Figura 31. Modo de unión del conformero 4 con residuos de la bolsa de las hélices αE , αG y αK .

Como es de esperarse, el ácido escamónico se une en bolsas que son relativamente hidrofóbicas, orientando su esqueleto lipídico al fondo de las mismas y los azúcares a la región más expuesta de la molécula al solvente (figura 32).

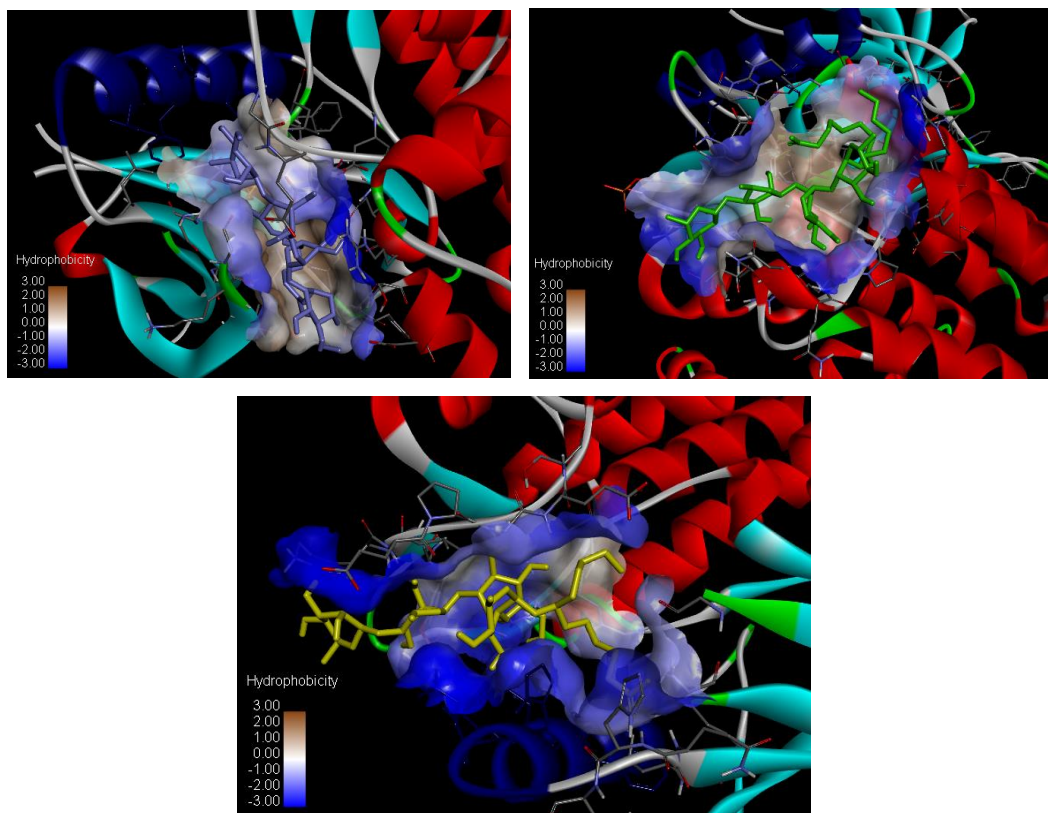


Figura 32. El ácido escamónico unido al sitio activo de JAK2, se orienta con el esqueleto lipídico en la profundidad de las bolsas y los azúcares expuestos hacia el solvente. Amarillo y verde (conformero 3), morado (conformero 5)

7.2 Validación de los resultados del acoplamiento molecular.

Debido a que el ácido escamónico no se ha co-cristalizado con ninguna proteína y tampoco se ha depositado en alguna base de datos y por lo tanto, no se tiene la información estructural necesaria, no es posible realizar un redocking o un docking inverso para validar los resultados. Sin embargo, se llevaron a cabo dos tipos de validaciones: la primera consistió en hacer el acoplamiento molecular con la herramienta JAMDA del servidor Proteins plus, utilizando los mismos ligandos y el mismo cristal de JAK2. En la segunda se corroboró que el ácido escamónico se uniera al mismo sitio catalítico y que formara interacciones similares a las reportadas para algunos inhibidores que ya han sido co-cristalizados con el dominio JH1 de la enzima. Para hacer este último proceso, se realizó una búsqueda en PDB y se eligieron cuatro cristales de JAK2 que tenían unidos a los inhibidores ruxolitinib, fedratinib, tofacitinib y TG101209. Se realizó el docking molecular de los conformeros del ácido escamónico en cada cristal y, para su visualización, se superpuso el ligando co-cristalizado con el ácido escamónico.

La validación con JAMDA dio resultados muy similares a los obtenidos anteriormente (figura 33).

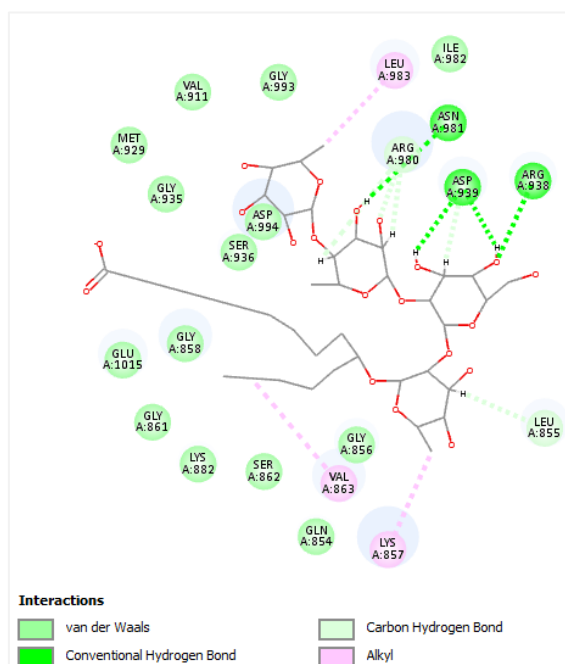
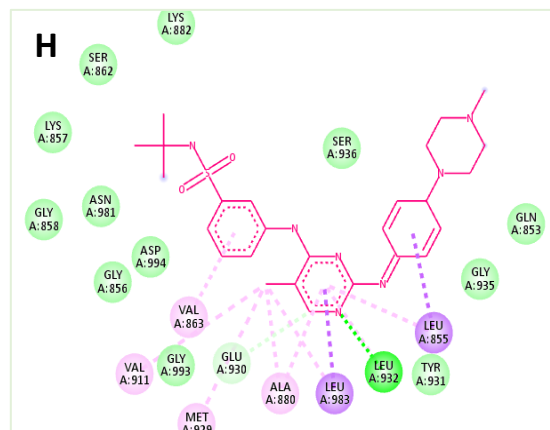
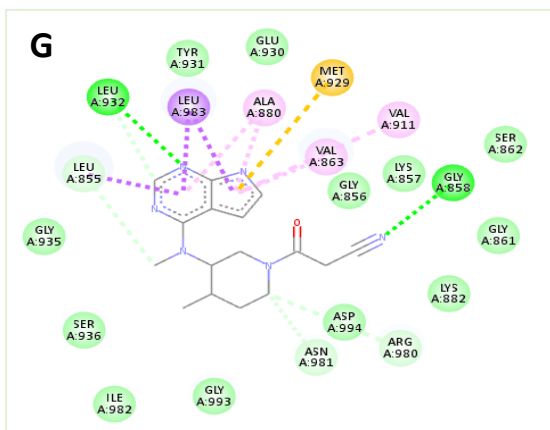
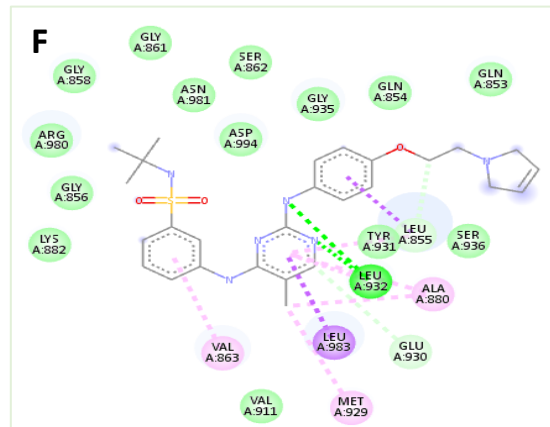
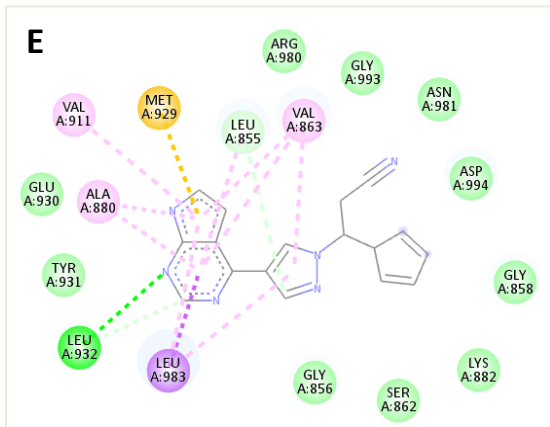
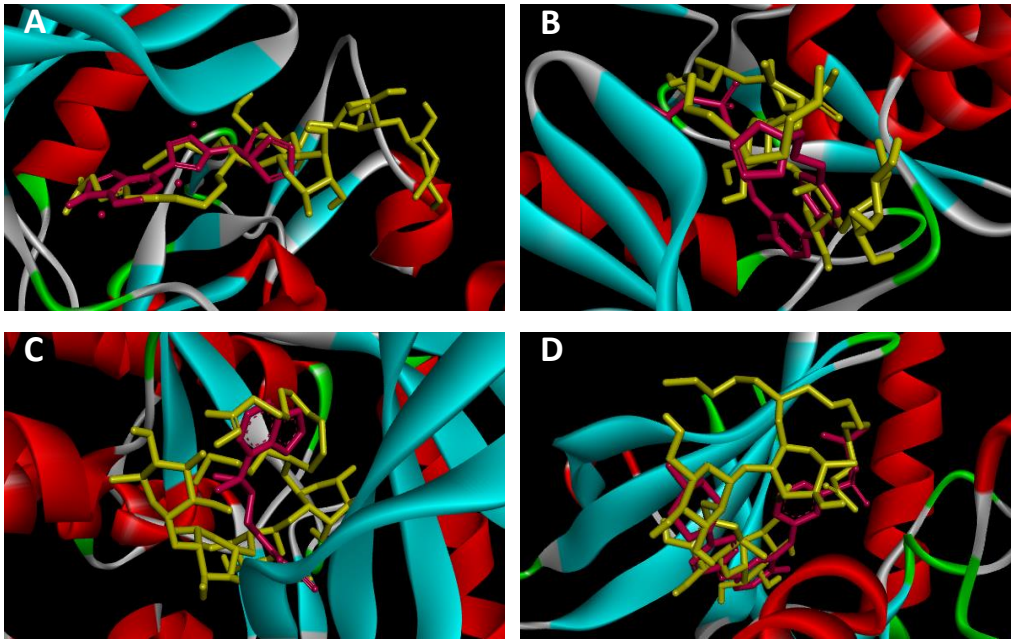


Figura 33. Resultados del docking molecular realizado en JAMDA. Se observan las mismas interacciones que las que se observan en PyRx

Por su parte, la validación con los inhibidores, ya reportados en la literatura, corrobora que el ácido escamónico puede unirse al sitio catalítico de JAK2 de forma similar a la del ruxolitinib, fedratinib, tofacitinib y TG101209, incluso conservando algunas de las interacciones más importantes (figura 34).



- Interactions**
- van der Waals
 - Conventional Hydrogen Bond
 - Carbon Hydrogen Bond
 - Pi-Sigma
 - Alkyl
 - Pi-Alkyl

Figura 34. Superposición del confórmero 2 del ácido escamónico (amarillo) y diferentes inhibidores (rosa) en sitio activo de JAK2. **A.** Ruxolitinib, **B.** Fedratinib, **C.** Tofacitinib, **D.** TG101209, **E.** Interacciones de ruxolitinib-JAK2, **F.** Interacciones Fedratinib-JAK2, **G.** Interacciones Tofacitinib-JAK2, **H.** Interacciones TG101209-JAK2.

7.3 Tipo de inhibidor.

Posteriormente, para determinar si el ácido escamónico podría actuar como un inhibidor tipo I o II, se realizó un docking molecular con el cristal del dominio JH1 de JAK2 en su forma inactiva. Para visualizar la alineación de la Phe995 con los residuos restantes que forman la espina hidrofóbica regulatoria se utilizó el programa PyMol.

Como puede verse en la figura 35, el ácido escamónico es capaz de unirse tanto a la configuración activa de JAK2 como a la inactiva. En el panel de la izquierda, se muestra el cristal de la cinasa en su forma activa, con la Phe995 alineada con la Leu902, Tyr913 e His974; por su parte en el panel derecho, no se observa la formación de la espina hidrofóbica, ya que la posición abierta del loop de activación obliga a la Phe995 a orientarse en sentido contrario a los residuos restantes. Aunque el sitio de unión y las interacciones que forma el ácido escamónico en ambas configuraciones son similares, la afinidad con la que se une a la forma inactiva es menor (-3.32 kcal/mol) a aquella con la que se une a la forma activa (-7.0 kcal/mol).

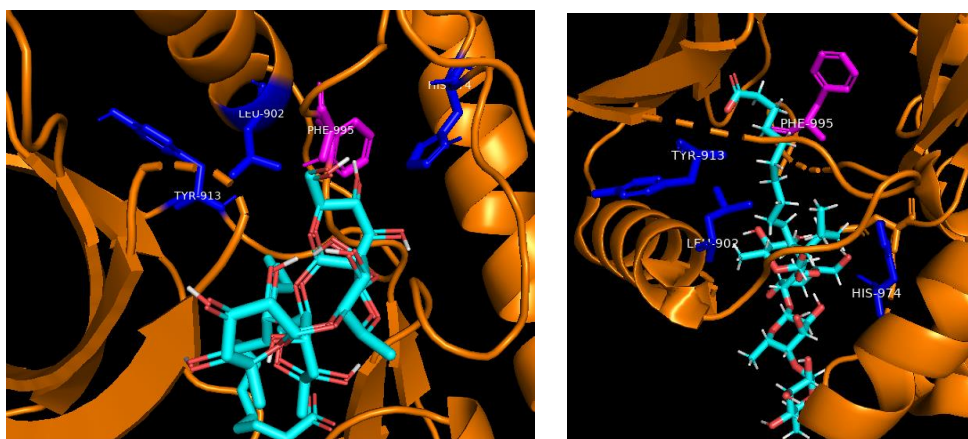


Figura 35. El confórmero 2 del ácido escamónico es capaz de unirse al sitio activo de JAK2 tanto es su forma activa (panel izquierdo) como inactiva (panel derecho).

Cuando se comparan las interacciones que forma el ácido escamónico y el inhibidor co-cristalizado, se puede observar que muchos de los residuos son similares; sin embargo, es evidente que en el caso del ácido escamónico, se forman

interacciones no favorables que podrían explicar la baja energía de unión resultante en el acoplamiento molecular (figura 36).

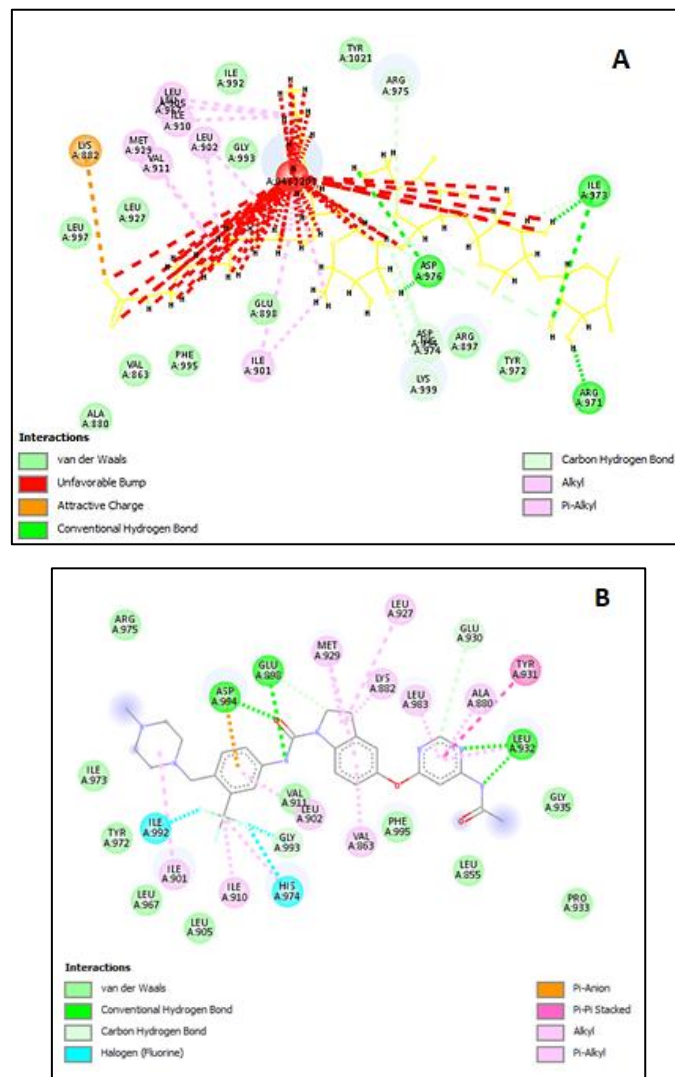


Figura 36. Interacciones que se forman entre JAK2 en su estado inactivo y **A.** el ácido escamónico y **B.** el ligando co-cristalizado (código PDB 3UGC). Las líneas rojas punteadas son interacciones no favorables.

7.4 Predicción de I.C.50 del ácido escamónico.

Para predecir el I.C.50 del ácido escamónico, fue necesario realizar acoplamientos moleculares con otros inhibidores de JAK2 de los cuales ya se hubieran reportado datos experimentales de I.C.50 (tabla 2). Para ello, se utilizaron a los inhibidores baricitinib, fedratinib, AZD1480, BMS-911543, CEP-33779, NVP-BSK805, TG101209, XL019, ruxolitinib, ilginatinib, NVB-BVB808 y gandotinib para hacer un docking molecular en el sitio activo de JAK2. A partir de los resultados de sus energías de

activación y su I.C.50, se generó un modelo matemático ($R^2=0.637$) que ayudó a inferir el I.C.50 del ácido escamónico (figura 37). La ecuación generada por el modelo es la siguiente:

$$\text{I.C.50} = (\text{E.inter} + 9.3135) / 0.2892$$

A partir de esta ecuación y tomando en cuenta la energía de interacción del confórmero 5 (-7.0 kcal/mol), el I.C.50 calculado para el ácido escamónico fue de 7.99nM.

Tabla 2. I.C.50 y energía de activación de inhibidores de JAK2 utilizados para generar modelo matemático.

Inhibidor	I.C.50 reportado (nM)	Energía de interacción (Kcal/mol)
Baricitinib	6.6	-7.2
Fedratinib	3	-8.5
AZD1480	3	-7.5
BMS-911543	1.1	-8
CEP-33779	1.8	-9.2
NVP-BSK805	0.48	-9.7
TG101209	6	-8.7
XL019	2.3	-8.6
Ruxolitinib	4.5	-7.4
Ilginatnib	0.72	-8.5
NVB-BVB808	0.35	-10.4
Gandotinib	2.52	-8.7

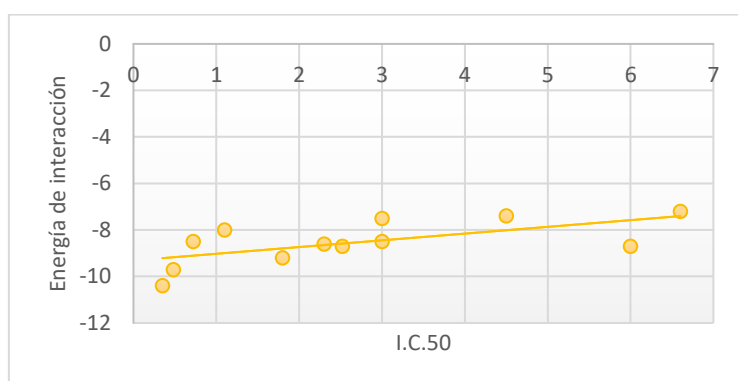


Figura 37. I.C.50 y energías de interacción de los inhibidores de JAK2.

7.5 Selectividad.

Para conocer la selectividad del ácido escamónico sobre otros miembros de la familia de las JAK, se hizo acoplamiento molecular con los cristales de los sitios activos de JAK1 (4EI4), JAK3 (5LWM) y TYK2 (5F20).

En el caso de JAK1, el confórmero 2 del ácido escamónico, es capaz de unirse en la misma bolsa que el inhibidor co-cristalizado FM-381 (figura 38), con una energía de unión calculada de -8.3 Kcal/mol. A excepción de la Leu959 y Phe958, tanto el inhibidor como el ácido escamónico forman las mismas interacciones (figura 39).

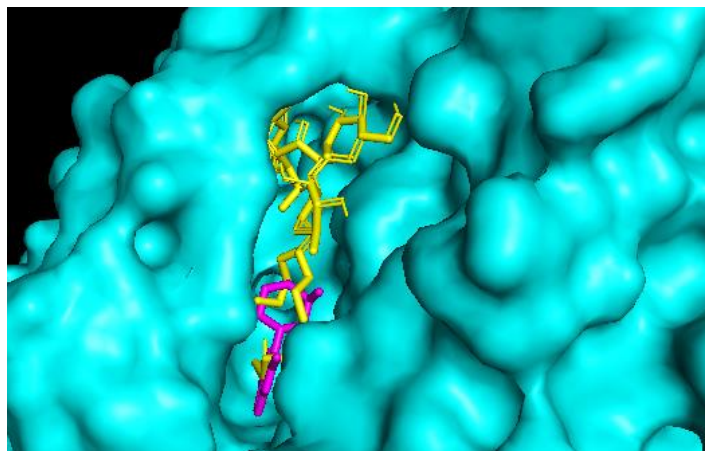


Figura 38. El ácido escamónico (amarillo) es capaz de unirse a la misma bolsa a la que se une el inhibidor co-cristalizado (magenta) de JAK1.

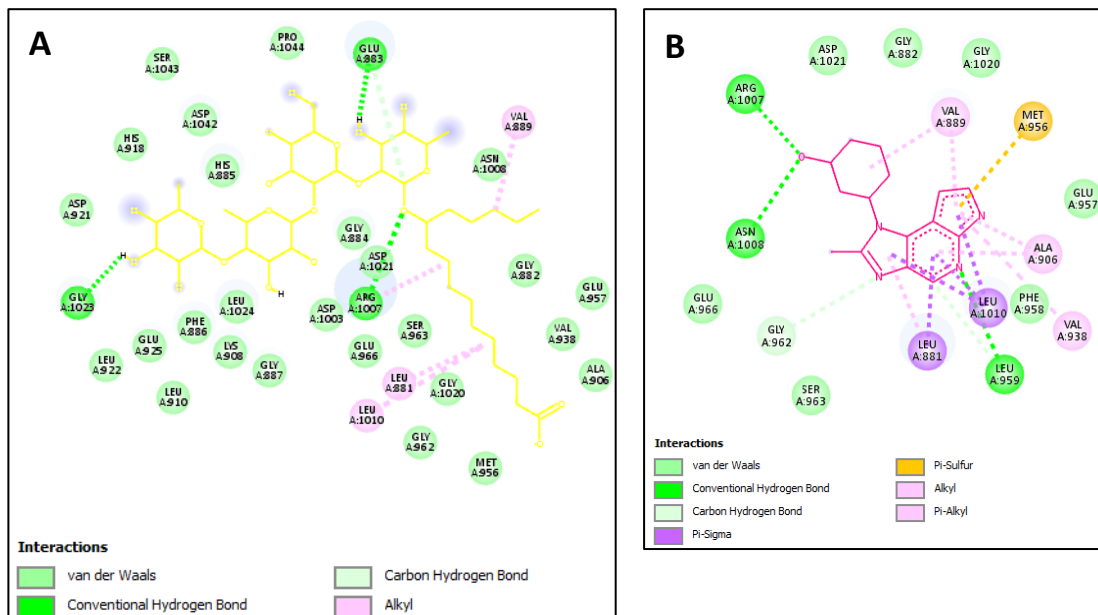


Figura 39. El ácido escamónico (A) forma las mismas interacciones que el inhibidor de JAK1 (B) en el sitio activo.

En el caso de JAK3, a pesar de que el conformero 2 del ácido escamónico se une en el mismo sitio que su inhibidor co-cristalizado (figura 40), un análisis de la energía de unión (-1.0 Kcal/mol) y de las interacciones que forma, hacen evidente la posibilidad de que la unión no sea muy fuerte. Es decir, aunque conserva las mismas interacciones que el ligando co-cristalizado (exceptuando a la Arg911), muchas de ellas son desfavorables (figura 41). Todos los demás conformeros del ácido escamónico se unen al sitio catalítico de JAK3 con una energía de unión positiva.

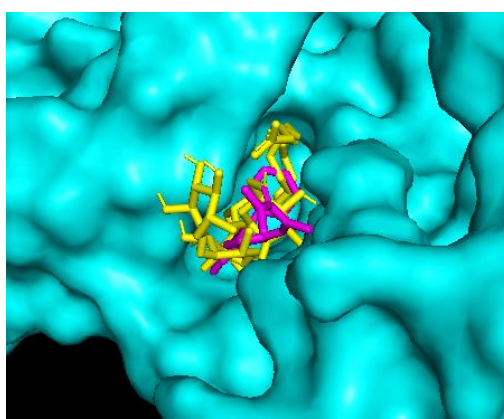


Figura 40. El conformero 2 del ácido escamónico puede unirse al mismo sitio que el inhibidor co-cristalizado de JAK3.

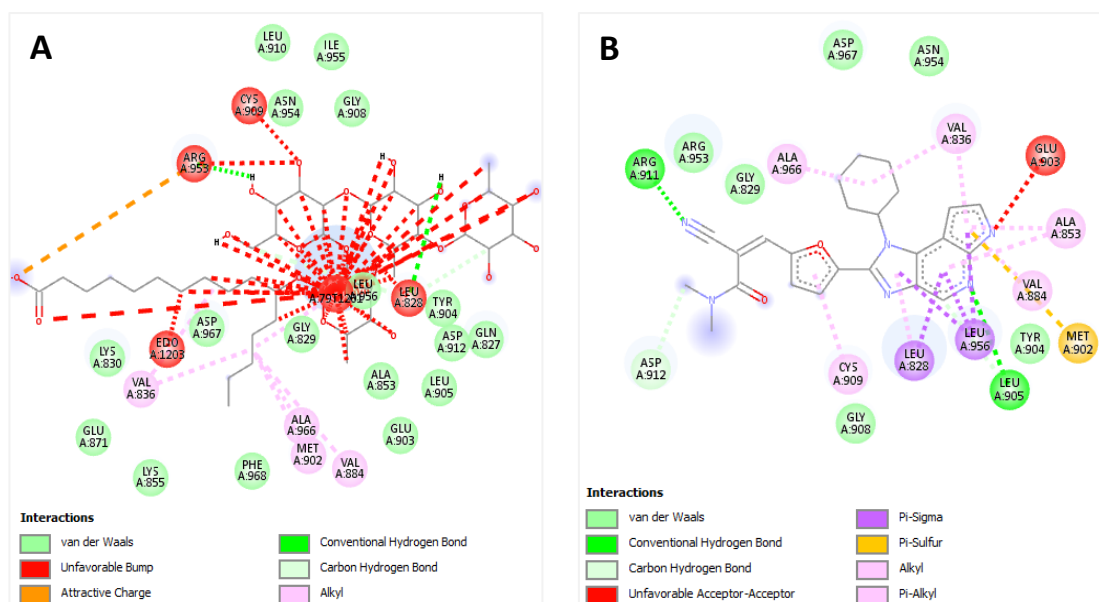


Figura 41. El ácido escamónico (A) forma interacciones muy similares a las del inhibidor co-cristalizado de JAK3 (B), pero muchas de ellas son desfavorables (líneas punteadas rojas).

Al realizar el acoplamiento molecular con TYK2, se encontró un caso similar al de JAK3, el conformero 2 del ácido escamónico puede unirse al mismo sitio que el ligando co-cristalizado y formar las mismas interacciones (figuras 42 y 43). No obstante, muchas de ellas no son estables, así mismo la energía de unión es positiva (18.3 kcal/mol), lo cual evidencia un proceso energéticamente desfavorable. Cabe señalar que en el caso de TYK2, todos los conformeros tuvieron una energía de unión positiva.

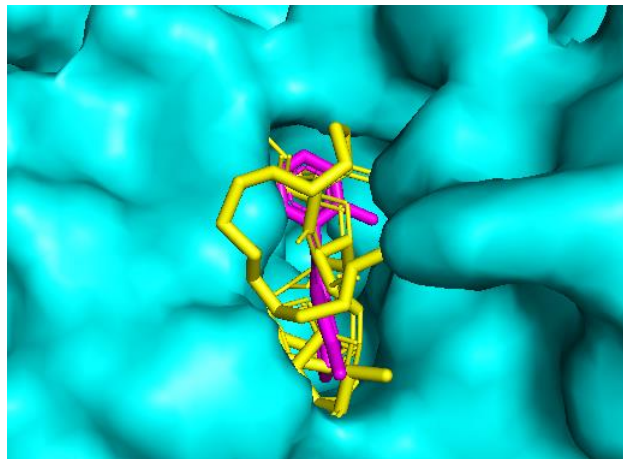


Figura 42. El ácido escamónico es capaz de unirse al mismo sitio que el ligando co-cristalizado de TYK2.

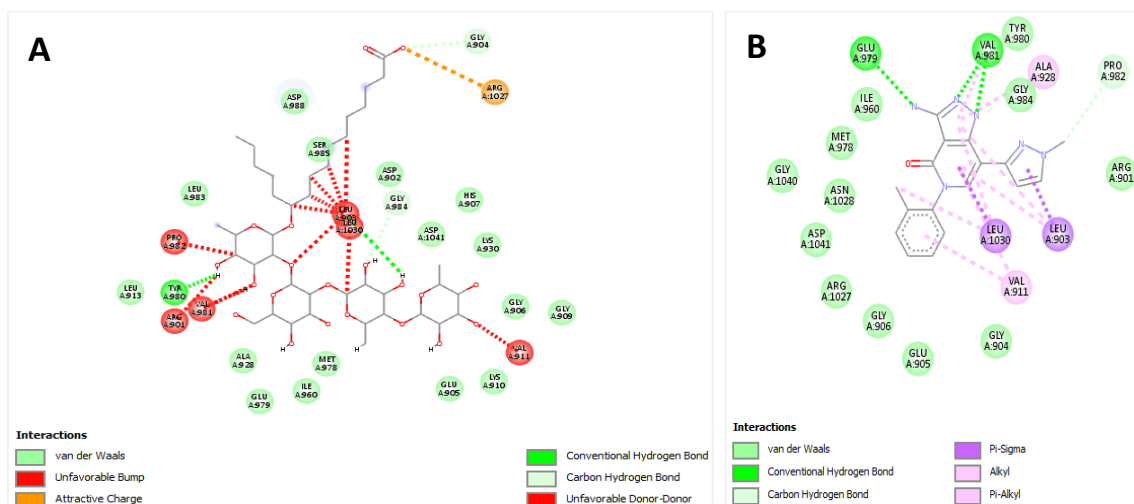


Figura 43. Las interacciones que forma el ácido escamónico con los residuos del sitio activo de TYK2(A), son similares a las del ligando co-cristalizado (B). No obstante, muchas de ellas son desfavorables en lo estructural (líneas rojas punteadas).

7.6 Características fisicoquímicas y biológicas.

Para conocer algunas propiedades de la molécula del ácido escamónico, se usaron algunos servidores que utilizan descriptores moleculares como la estructura tridimensional, tipos de enlaces, cargas, peso molecular etc. para hacer predicciones que regularmente resultan cercanas a la realidad.

Como primer acercamiento, se hizo una predicción con el servidor SwissADME, el cual calcula descriptores fisicoquímicos y predice propiedades farmacocinéticas y ADME de algunas moléculas. Este servidor estimó que el ácido escamónico es una molécula soluble ($\log S = -3.95$), con baja probabilidad de ser absorbida vía gastrointestinal, que no es inhibidor de citocromo, que puede ser sustrato de la glicoproteína P, que tiene un bajo puntaje de biodisponibilidad (0.11), debido a que incumple con tres de las reglas de Lipinski; ya que su peso molecular es de 872.99 g/mol, tiene 20 aceptores de enlace de hidrógeno y 11 donadores de enlace de hidrógeno.

Con el fin de conocer si el ácido escamónico pudiera resultar tóxico, se utilizó el programa Osiris Datawarrior, el cual asigna la probabilidad de toxicidad de una molécula, de acuerdo con su similitud con compuestos de una biblioteca de compuestos tóxicos probados experimentalmente. Con base en la estructura bidimensional del ácido escamónico, este programa predice que no tiene capacidad mutagénica, tumorigénica, irritante, ni tiene efectos en la reproducción de los animales.

Una de las características más importantes en el desarrollo de fármacos es el coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$), que es una medida del carácter hidrofóbico de las moléculas y que puede usarse para estimar su distribución en el cuerpo. De acuerdo con la herramienta ALOGPS 2.1, del servidor Virtual Computational Chemistry Laboratory, el $\log P$ del ácido escamónico es de 0.52, un valor similar a la estimación de Osiris Datawarrior (0.47).

Otro de los parámetros estimados por Osiris Datawarrior es el parecido de las moléculas a otros fármacos disponibles en el mercado, para el caso del ácido escamónico el puntaje asignado es -18.79, que indica que no es parecido a los fármacos que resguarda en su biblioteca. Este programa también asigna un puntaje (drug-score) para conocer si una molécula es candidata para convertirse en un fármaco, dicho puntaje combina los valores de $\log P$, $\log S$, peso molecular, parecido

con otros fármacos y riesgos toxicológicos; para el ácido escamónico el drug-score es 0.21, categorizándolo como un no candidato.

7.7 Actividad biológica

Otra de las herramientas del servidor del Swiss Institute of Bioinformatics, es SwissTarget que, de acuerdo con una base de datos de 370 mil compuestos, calcula a las macromoléculas blanco más probables para una molécula de interés. Con base en sus descriptores moleculares y su estructura 2D y 3D, estima que el ácido escamónico tiene una probabilidad de 86.7% de tener efecto sobre la familia A de receptores acoplados a proteína G, un 6.7% de actuar sobre receptores nucleares y 6.7% sobre citocromo P450 (figura 44). Es importante hacer mención que dentro de los 25 blancos calculados se encuentran la β secretasa (que juega un papel clave en el procesamiento de la proteína APP en la Enfermedad de Alzheimer) y STAT3 (uno de los factores de transcripción blanco de JAK2).

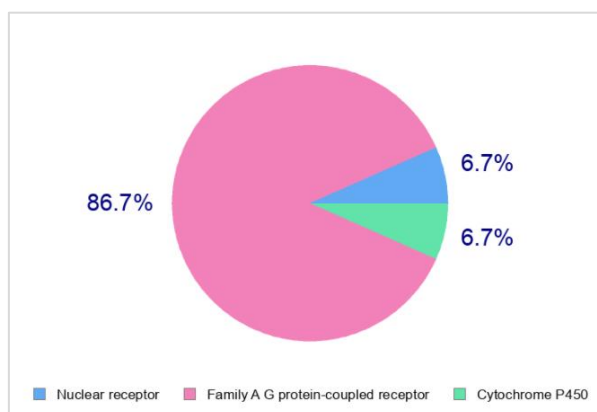


Figura 44. Probabilidad estimada de que el ácido escamónico actúe sobre diferentes blancos biológicos según SwissTarget.

Los resultados obtenidos en SwissTarget fueron similares a los que se obtuvieron en Pass Online, el cual es un servidor que calcula la probabilidad de que una molécula pertenezca a alguna clase particular de compuestos activos. Para el ácido escamónico estima que la probabilidad de que sea un inhibidor de cinasas de receptores acoplados a proteínas G es de 95.8%, asimismo la probabilidad de que pueda actuar como tratamiento para la demencia es de 65%.

7.8 Modificación del andamio del ácido escamónico.

A pesar de las predicciones de hidrofobicidad, solubilidad y no toxicidad del ácido escamónico, su biodisponibilidad aparentemente es baja porque incumple con algunas reglas de Lipinski. Es por ello, por lo que quiso probarse cómo cambiarían las propiedades de la molécula si se disminuyeran la cantidad de azúcares en su esqueleto lipídico. Como era de esperarse, la hidrofobicidad (y, por ende, el logP) aumentó conforme se descartaban uno a uno los azúcares; mientras que el peso molecular, la superficie topológica polar (TPSA) y la solubilidad disminuyeron; no obstante, no logró aumentarse sustancialmente la biodisponibilidad (figura 45). Es importante hacer notar que en ninguno de los pasos intermedios (entre el estado de cuatro azúcares y el de cero) se detectó toxicidad en alguna de las moléculas generadas.

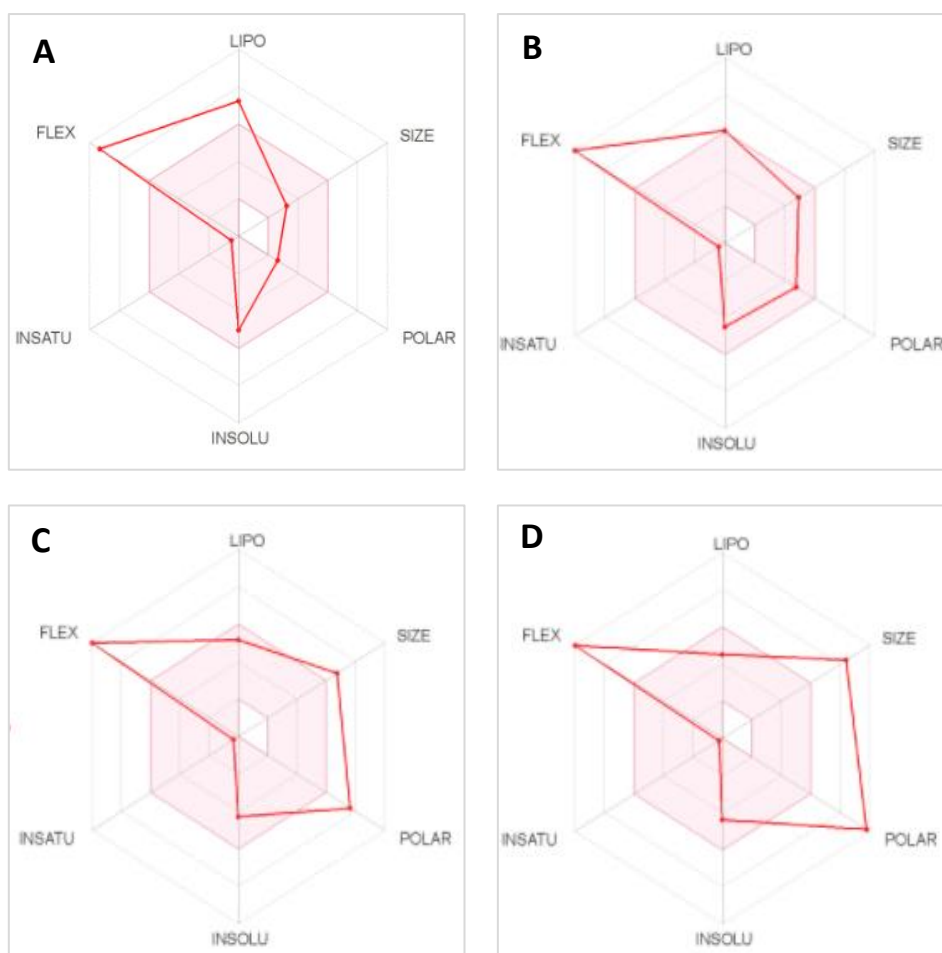


Figura 45. Parámetros fisicoquímicos de las moléculas modificadas con base en el andamio del ácido escamónico. **A.** 0 azúcares, **B.** 1 azúcar, **C.** 2 azúcares y **D.** 3 azúcares. La zona roja es con la que Swiss ADME identifica a los fármacos con biodisponibilidad oral óptima. Cada uno de los vértices del hexágono corresponde a la lipofilicidad, tamaño, polaridad, insolubilidad, insaturación y flexibilidad de la molécula en cuestión.

En la tabla 3 se pueden observar las características fisicoquímicas de las moléculas modificadas a partir del ácido escamónico. Es importante enfatizar que, según SwissADME, la única molécula con la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica es la que no cuenta con ningún azúcar y la única que cumple con todas las reglas de Lipinski es la que tiene un azúcar en su esqueleto lipídico.

Tabla 3. Características fisicoquímicas calculadas por SwissADME para las moléculas modificadas a partir del andamio lipídico del ácido escamónico. BBB= barrera hematoencefálica, TPSA= área de superficie polar

Número de azúcares	0	1	2	3
Absorción gastrointestinal	Alta	Alta	Baja	Baja
Atraviesa BBB	Sí	No	No	No
logP	5.20	3.25	2.35	1.51
logS	-5.02 (moderado)	-4.51 (moderado)	-4.30 (moderado)	-4.38 (moderado)
Facilidad de síntesis	2.31 (sencilla)	5.77 (media)	7.02 (media)	8.12 (difícil)
TPSA (Å²)	37.30	96.22	175.37	234.29
Biodisponibilidad	0.85	0.56	0.11	0.11

Con respecto de la actividad biológica de las moléculas modificadas, Pass Online sugiere que no habría afectación dependiente del número de azúcares en el esqueleto lipídico. Por su parte, los resultados de SwissTarget indican que mantener el andamio del ácido escamónico con uno, dos o tres azúcares efectivamente no afectaría sustancialmente su actividad; ya que su acción seguiría centrándose en las cinasas de receptor asociado a proteínas G, proteínas citosólicas y receptores nucleares. Sin embargo, si al andamio del ácido escamónico se le eliminan todos los azúcares, los blancos que predice SwissTarget se orientan hacia la familia de las proteínas de unión a ácidos grasos, las cinasas de receptor acoplado a proteína G y los receptores nucleares.

Finalmente, para saber si la modificación del ácido escamónico afectaría su posibilidad de unión al sitio activo de JAK2 se realizó docking molecular. Como se

observa en la figura 46, todas las moléculas modificadas siguen uniéndose al sitio activo de la enzima y mantienen las interacciones más importantes para funcionar como un inhibidor (figura 47).

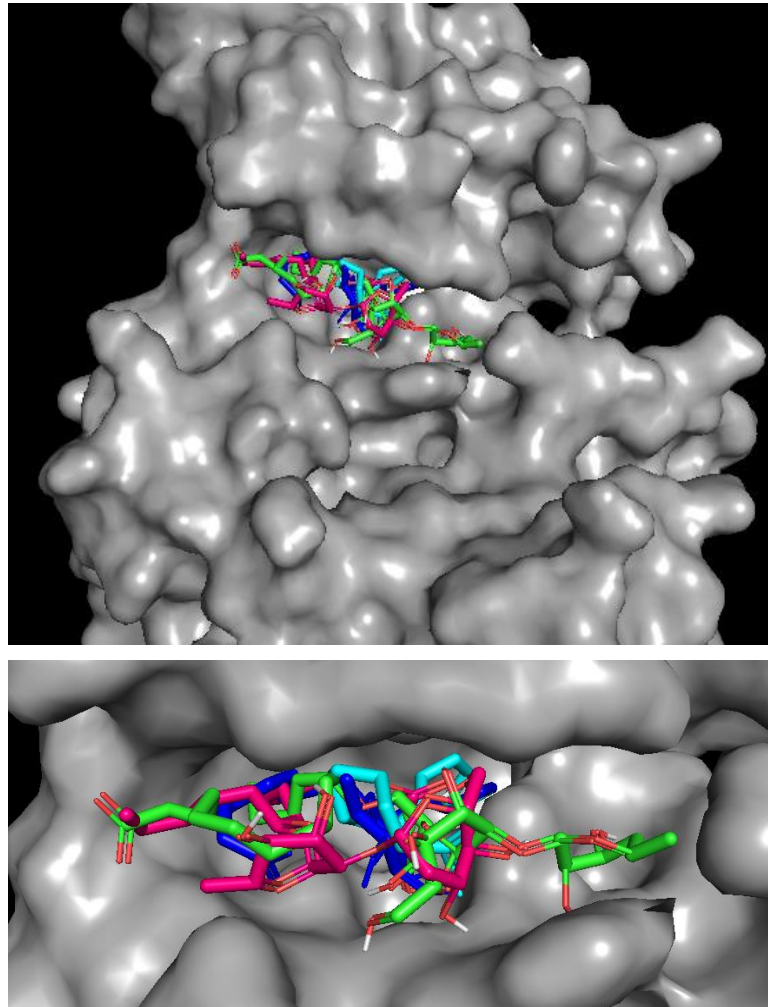


Figura 46. Docking molecular del ácido escamónico modificado en el sitio catalítico de JAK2. Tres azúcares (verde), dos azúcares (magenta), un azúcar (azul), cero azúcares (cyan). El panel de abajo es un acercamiento del de arriba.

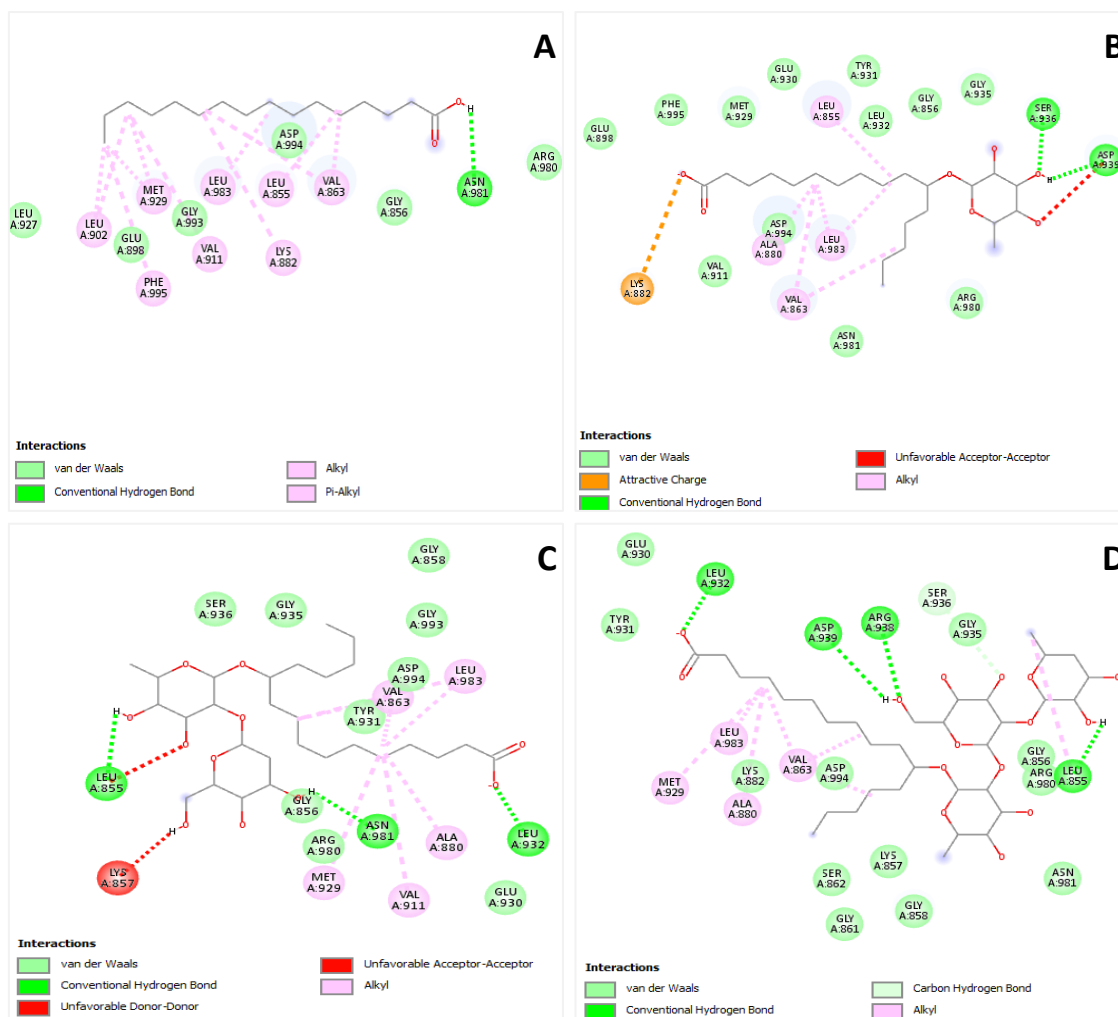


Figura 47. Interacciones que se forman entre el sitio activo de JAK2 y las moléculas modificadas a partir del ácido escamónico con **A.** Cero azúcares, **B.** Un azúcar, **C.** Dos azúcares, **D.** Tres azúcares en su esqueleto lipídico. Las respectivas energías de unión son de -6.1 Kcal/mol, -5.7 Kcal/mol, -6.4 Kcal/mol y -7.1 Kcal/mol.

7.9 Unión del ácido escamónico al péptido amiloide β 1-42.

Adicionalmente a lo anteriormente expuesto, se quiso averiguar si el ácido escamónico tiene la posibilidad de unirse al péptido amiloide β 1-42, para lo cual se hizo un acoplamiento molecular del cristal 1IYT (depositado en PDB) con los distintos conformeros del ácido escamónico.

Como puede observarse en la figura 48, hay tres modos de unión posibles, cuya energía de interacción oscila entre -4.7 kcal/mol y -4.4 kcal/mol.

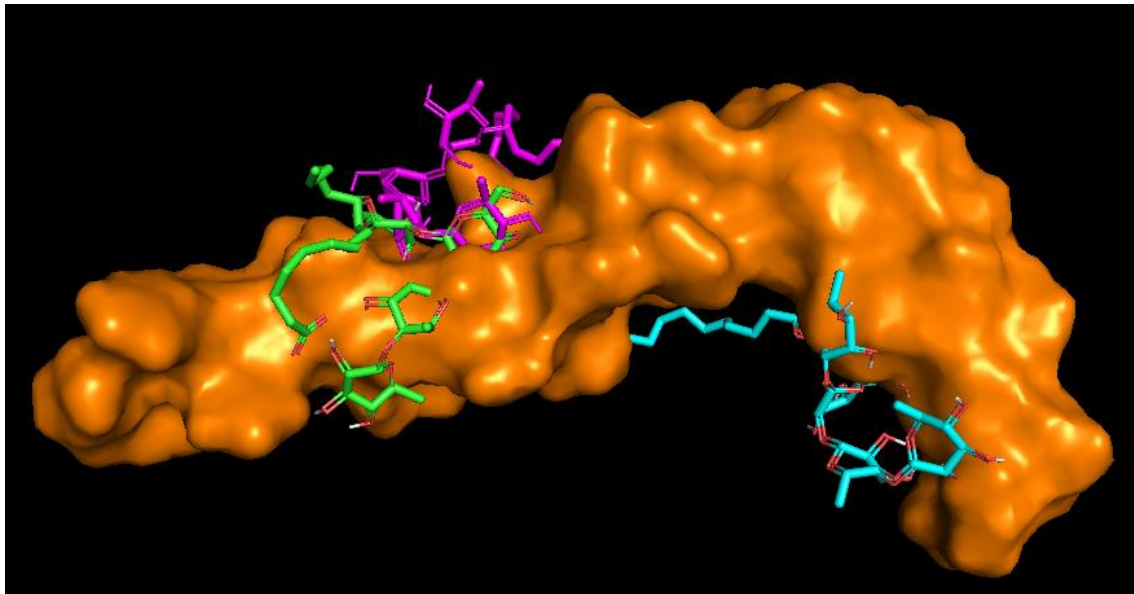


Figura 48. Existen tres posibles modos de unión entre el ácido escamónico y el péptido amiloide β 1-42 (naranja). La energía de unión de la pose que se observa en verde es de -4.7 kcal/mol, las que se observan en magenta y verde son de -4.4 kcal/mol cada una.

La pose que mayores interacciones tiene con el amiloide es una de las dos que tienen la energía de unión de -4.4 kcal/mol (color magenta), ya que forma enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, puentes salinos, cargas de atracción electrostática y enlaces alquil con Gly38, Leu17, Ile31, Leu34, Met35, Val39, Ile41, Ala42, Lys16, Phe20, Ala21, Val24 y Lys28. Por su parte, la pose de -4.7 kcal/mol (color verde) forma el mismo tipo de interacciones, pero con otros residuos, tales como Ser8, Gln15, Gly9, Val12, Glu11, Lys16, Phe19, Arg5, Asp1 y Phe4. Finalmente, la segunda pose que también tiene una energía de unión de -4.4 kcal/mol (color cyan), sólo puede unirse al péptido amiloide β mediante los residuos Glu11, Gln15, His14, Val18 y Glu22 (figura 49).

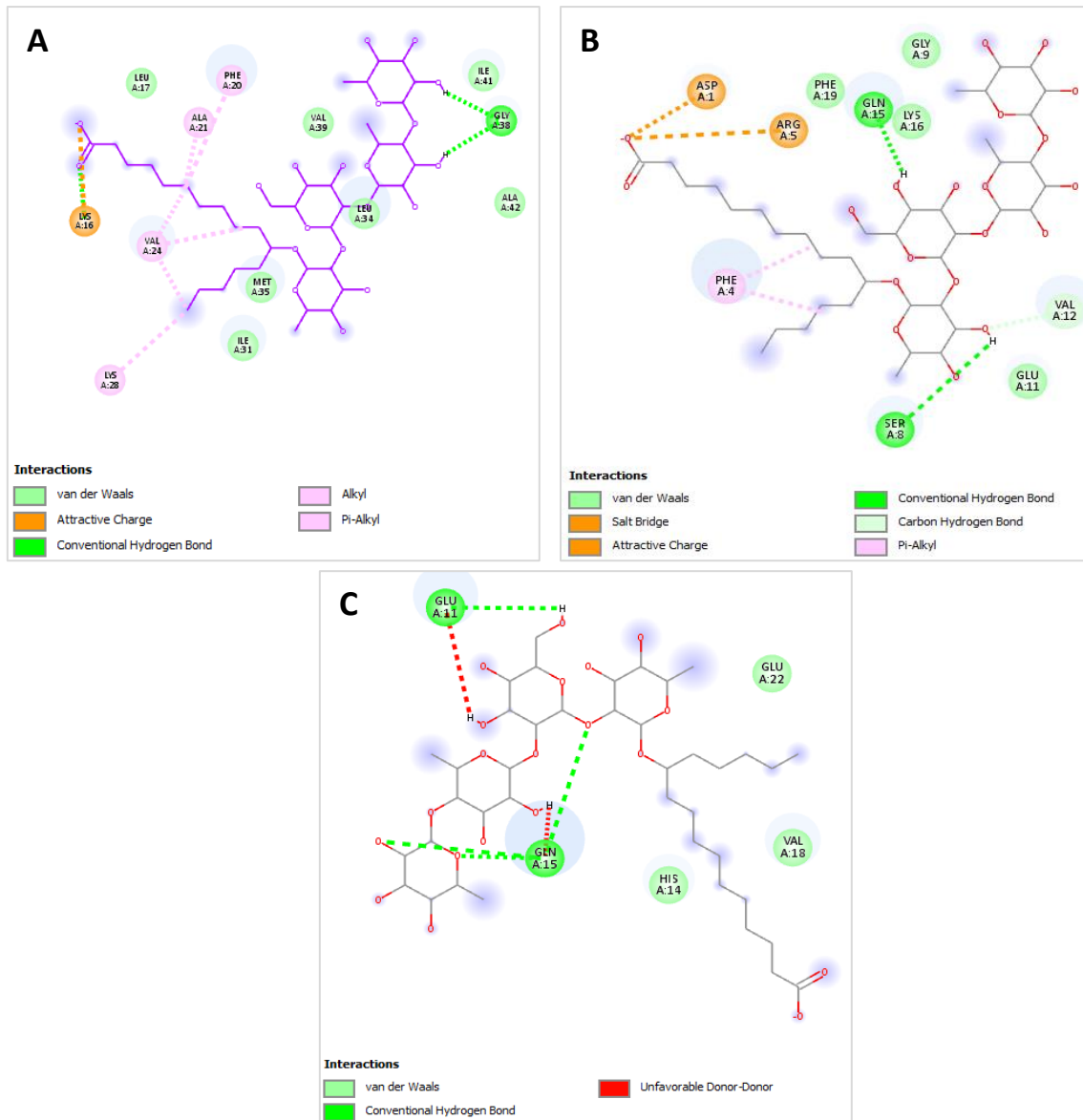


Figura 49. Interacciones que forma el ácido escamónico en las tres posibles formas de unión con el amiloide β . **A.** Pose de -4.4 kcal/mol (magenta en figura anterior), **B.** Pose de -4.7 kcal/mol (verde en figura anterior) y **C.** Pose de -4.4 kcal/mol (cyan en figura anterior).

8. DISCUSIÓN

La vía JAK-STAT, es una de las vías de señalización más importantes en la activación, función y homeostasis del sistema inmune. Juega un papel fundamental en la señalización de factores de crecimiento y citocinas necesarias para la supervivencia, diferenciación y proliferación celular. El potencial terapéutico de su inhibición fue descubierto en los años 90 y a poco menos de veinte años después, dos pequeñas moléculas inhibitoras de JAK2, el ruxolitinib y el fedratinib, fueron

aprobadas por la FDA como tratamiento para las neoplasias mieloproliferativas y artritis reumatoide, respectivamente. La evidencia genética, biológica y fisiológica, que se dispone a la fecha, indica que los inhibidores de JAK2 son efectivos agentes quimioterapéuticos y podrían utilizarse para tratar enfermedades como: la enfermedad de Alzheimer o de Huntington.^{12, 48}

Los inhibidores de JAK2 que se conocen en la actualidad son, en su mayoría, del tipo I y se caracterizan porque se unen a la enzima, imitando la forma de unión del ATP. Una de las mayores dificultades que se ha presentado para el desarrollo de un inhibidor selectivo —que carezca de efectos indeseados— es la similitud estructural que existe entre el sitio catalítico de las JAK y otras tirosina cinasas. Por si fuera poco, la conservación en la secuencia del dominio JH1 de los diferentes miembros de las JAK es muy alta, por lo que desarrollar un inhibidor para un miembro específico de la familia es aún más complicado. A pesar de estas dificultades, se han desarrollado una buena variedad de inhibidores de JAK con una especificidad razonable y se ha vuelto claro que los pan-Jakinhibs (con actividad contra múltiples miembros de las JAK) son eficaces y con un perfil aceptable de efectos adversos.^{12, 48, 49}

En este proyecto de investigación se utilizó un modelo *in silico* para determinar si el ácido escamónico extraído de *Ipomoea tyrianthina*, tiene la capacidad de inhibir a JAK2 por medio de su dominio JH1. Los resultados del acoplamiento molecular indican, que el ácido escamónico puede unirse al dominio catalítico de la enzima en tres bolsas diferentes: la de la hélice α C, la del ATP y la de las hélices α E, α G y α K; con energías de unión de -7.0, -6.6 y -6.0 kcal/mol, respectivamente. Según la herramienta DogSite Scorer del servidor Proteins plus, por su volumen, hidrofobicidad y angostura, éstas son tres de las cinco bolsas con mayor potencial farmacológico de la enzima.

La bolsa que se forma cerca de la hélice α C de JAK2, tiene el mayor potencial farmacológico porque es una región poco conservada entre la familia de las JAK ^{16,50}. El ácido escamónico unido en este sitio forma interacciones con los residuos Asp894, Lys1011, Gly1014, Pro1013; que son aminoácidos únicos para JAK2 y que podrían contribuir a la selectividad de la molécula. Todas estas interacciones son muy

parecidas a las reportadas para un derivado del ácido cinámico que funciona como un inhibidor competitivo bisustrato de JAK2⁵⁰. Por lo tanto, existe la probabilidad de que el ácido escamónico funcione de la misma manera; para tener certeza de que ello ocurre y cuáles son las interacciones que se forman, sería necesario realizar una cristalización de la enzima con el ligando unido o bien una titulación por fluorescencia.

Por otro lado, cuando el ácido escamónico se une al sitio catalítico de JAK2, interactúa con los residuos de la bisagra (Glu930, Leu932 y Tyr931), el gatekeeper (Met929), el motivo DFG (Asp994, Phe995 y Gly996), sitios a los que directamente se une el ATP (Ala880, Tyr881 y Lys882) e incluso con la bolsa hidrofóbica que ayuda a estabilizar a la mayoría de los inhibidores ya usados en la clínica (Leu983, Ala880, Val863 y Leu855). Todas estas interacciones han sido reportadas como fundamentales para la inhibición de la cinasa^{13,26,48,54}. Lin *et al.*, (2018) reportaron que el 100% de los inhibidores registrados en la base de datos del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos forma interacciones con Leu983, el 90% con Leu955 de la bisagra, el 80% con Val863 o con Ala880, mientras que el 50% lo hace con el Asp994 del motivo DFG. También sugieren que un inhibidor potente de JAK2 debe tener al menos un enlace de hidrógeno en tres sitios: la Leu932, el motivo DFG y el Glu898. En el caso del ácido escamónico, se cumple parte de esta premisa, ya que sí se forman ciertas interacciones en los tres sitios mencionados, pero de ellas, sólo la de Gly996 es un enlace de hidrógeno, las demás son interacciones hidrofóbicas.

Finalmente, cuando el ácido escamónico se une a la bolsa formada por las hélices αE , αG y αK forma interacciones que no se han reportado con otros inhibidores. Sin embargo, dado que el puntaje de potencial farmacológico es de 0.62, es posible que, de existir, su mecanismo de inhibición en este sitio sea alostérico.

El hecho de que el ácido escamónico tenga tres formas potenciales de unirse a JAK2 hace que sea indispensable conocer, mediante la experimentación, cuál es la conformación activa de la molécula, ya que de ello dependerá su grado de selectividad.

A pesar de que la mayor capacidad de inhibición y afinidad del ácido escamónico por JAK2, parecieran ser cuando se une a la hélice αC ; las características

observadas en su unión al sitio catalítico no deben subestimarse, ya que guardan similitudes importantes con moléculas que han sido descritas como buenos inhibidores de la cinasa. Zhao *et al.* (2016) propusieron un modelo estructural, basado en las características de seis grandes grupos de inhibidores de JAK2 que plantea que, los inhibidores potentes y selectivos típicamente están compuestos por tres partes: tres fracciones hidrofóbicas denominadas HYD1, HYD2 y HYD3; un linker que une a HYD1 con HYD3; y la fracción hidrofílica S. HYD1 es la estructura clave del inhibidor, ya que forma enlaces de hidrógeno con la región de la bisagra y usualmente se posiciona en la región hidrofóbica de JAK2, la cual está rodeada de Met929, Ala880 y Leu983. La mejor distancia entre esta región y el carbonilo terminal de Met929 es alrededor de 3.6 Å. HYD2, y es la responsable de mejorar la permeabilidad celular y usualmente se localiza entre los residuos hidrofóbicos Leu855 y Gly935. La región S se encuentra anclada a HYD2 y suele ubicarse exponiéndose al solvente, es por ello que puede interactuar con la enzima mediante enlaces de hidrógeno mediados por agua. El linker, cuando se presenta, ubica a la región HDY3 en el área hidrofóbica rodeada por la Val863 y Gly993 (figura 50).

Cuando se analizan las interacciones del ácido escamónico con JAK2 pueden verse algunas similitudes con el esquema propuesto por Zhao *et al.* (2016): la región hidrofóbica HYD1 estaría compuesta por la cadena lipídica más cercana al grupo carboxilo, HYD2 sería el resto de la cadena lipídica y S (aunque no se encuentra del todo expuesta al canal del solvente), sería la región formada por los dos azúcares unidos al esqueleto lipídico. Es importante mencionar que, aunque pueda hacerse una comparación entre el esquema de Zhao *et al.* (2016) y la estructura del ácido escamónico, éste último, no contiene la región del linker, la distancia entre la región HYD1 y la Met929 es mayor que la reportada (4.4 Å) y no forma los enlaces de hidrógeno señalados por los autores. Sin embargo, la falta de una red de enlaces de hidrógeno no debe considerarse una desventaja, ya que se ha reportado que las fuerzas principales que controlan la unión de ligandos en la conformación activa de JAK2 son no polares, sobre todo fuerzas electrostáticas y de Van der Waals formadas con Leu855, Val863, Leu932 y Leu983. Asimismo, se ha comprobado que el mantener un enlace de hidrógeno en el motivo DFG (como ocurre con el ácido escamónico), les brinda potencia a los inhibidores de JAK2^{26,48}.

Aunque pueda resultar una inhibición muy fuerte, las interacciones que el ácido escamónico forma con el gatekeeper (Met929) de JAK2 podrían explicar dicha potencia. De acuerdo con Lucet *et al.* (2006), las interacciones que se forman con la Met929 de JAK2 pueden funcionar como un indicador de una inhibición potente. Por ejemplo, CMP6 (inhibidor de todas las JAK), actúa en el rango de nM a las cinasas que poseen una metionina en una posición equivalente a la Met929 de JAK2, en comparación con aquellas que poseen una valina o treonina, las cuales son inhibidas en el rango de μM .

Los datos de I.C.50 obtenidos en este trabajo, no deben considerarse como un absoluto sino como una estimación y deben corroborarse experimentalmente, ya que el modelo generado tiene como desventaja que los inhibidores utilizados son muy diversos entre sí y también con respecto del ácido escamónico, en lo referente a su estructura. Para ello se pretende realizar una curva de la inhibición de la fosforilación de la Tyr1008 de JAK2 en presencia del ácido escamónico y con diferentes concentraciones de ATP.

Con respecto de la selectividad del ácido escamónico, los resultados obtenidos por medio del docking molecular, hacen necesaria una comprobación experimental; ya que por un lado, muestran que la molécula puede interactuar con residuos que únicamente se presentan en el dominio catalítico de JAK2 (por ejemplo, Pro933, Asp894, Lys1011, Gly1014, Pro1013), pero al mismo tiempo indican que puede unirse al dominio JH1 de JAK1, incluso con mayor energía que con la que se une a JAK2. Sin embargo, lo que queda completamente descartado, es la posibilidad de unión con JAK3 y TYK2, ya que, aunque teóricamente la unión es posible, desde el punto de vista energético y espacial las interacciones son muy desfavorables.

La falta de selectividad del ácido escamónico puede explicarse por las características propias de la familia JAK, o bien analizando al ligando. En el primer caso, se ha reportado que los miembros de la familia JAK tienen una homología muy alta, especialmente en el sitio de unión del ATP. Dado que el 53% de la secuencia de JAK1 y JAK2 son idénticas y el modo de unión de los inhibidores tipo I en ambas enzimas es muy similar⁵², la falta de selectividad del ácido escamónico es algo de

esperarse. Por otro lado, los aminoácidos que componen el loop rico en glicina de JAK1 pueden explicar por qué su unión con el ácido escamónico es más fuerte que la de JAK2, y es que esta región es más flexible en JAK1 que en JAK2, lo cual permite que los inhibidores entren con mayor facilidad, al tiempo que les brinda mayor estabilidad.⁴⁹

También hay algunas características del ácido escamónico que podrían explicar su baja selectividad por JAK2. Se ha reportado que el hecho de que el sitio activo de JAK2 sea más estrecho que el de otros miembros de las JAK hace que inhibidores con una estructura plana se dispongan de tal forma, que existe una complementariedad entre ellos y la estructura de la proteína, promoviendo así una alta selectividad^{51,54}. No obstante, ocurre lo contrario con el ácido escamónico, el cual tiene tantos enlaces rotables que le impiden ser plano y por lo tanto, la complementariedad con el sitio catalítico puede ser menor, al igual que su selectividad por JAK2. De acuerdo con Lucet *et al.* (2006), existe una constelación de residuos que explican la alta selectividad que un inhibidor como CMP6 muestra para JAK2 y no para otras JAK; estos incluyen Gln853, Lys857, Asn859, Ser862, Tyr931, Tyr934, Arg938, Tyr979 y Ile982. El ácido escamónico no interactúa con ninguno de ellos, excepto con la Tyr931, lo cual es otro factor que podría explicar su baja selectividad.

Todo lo anterior sugiere que el ácido escamónico podría funcionar como un inhibidor tipo I parecido al ruxolitinib o al fedranitib, los cuales se unen al sitio catalítico tanto de JAK1 como de JAK2 con una afinidad parecida. Si esto se comprobara experimentalmente, sería de esperarse que las tres moléculas tuvieran efectos secundarios parecidos debido a su falta de selectividad, por ejemplo, se ha reportado que fedratinib inhibe de forma inespecífica a cinasas del epitelio intestinal, FLT3 o al transportador de la vitamina B1. Otro aspecto que es importante considerar con respecto de la actividad del ácido escamónico, es que, al inhibir la señalización de los receptores de Interferón gamma, podría reactivar la infección causada por el virus del herpes-zoster, tener efectos sobre la hematopoyesis, inmunidad innata y adaptativa, infecciones en las vías respiratorias altas, gastroenteritis, citopenias y múltiples infecciones oportunistas tal y como se ha registrado para el ruxolitinib.¹⁵

De comprobarse experimentalmente que el ácido escamónico funciona como inhibidor tipo I, sería interesante saber si puede inducir un fenómeno de resistencia, como el que se ha reportado para otros inhibidores tipo I de JAK2. Andraos *et al.* (2012) demostraron que, al ocupar el sitio de unión del ATP, los inhibidores bloquean la señalización río abajo de JAK2, pero paradójicamente aumenta la fosforilación de la Tyr1007 del loop de activación por la transfosforilación causada por parte de otros miembros de la familia JAK o de otras cinasas.

Para conocer las características fisicoquímicas y biológicas del ácido escamónico se recurrió a diferentes servidores que calculan parámetros como logP, logS, polaridad, flexibilidad etc. con base en descriptores moleculares. Dichos servidores indican que, por sus características estructurales, el ácido escamónico podría tener baja biodisponibilidad debido a que no cumple con algunas reglas de Lipinski: su peso molecular es 873 g/mol, tiene 11 donadores de enlace de hidrógeno, 20 aceptores de enlaces de hidrógeno y 23 enlaces rotativos. Además, es probable que no cruce la barrera hematoencefálica y que su absorción por vía gastrointestinal sea baja.

No obstante, los resultados experimentales reportados en la literatura, no sólo del ácido escamónico extraído de *Ipomoea tyrianthina*, sino de varios extractos de plantas del mismo género, han demostrado su potencial farmacológico. En el caso específico del ácido escamónico, se sabe que no es una molécula tóxica y su potencial farmacológico ha sido comprobado en modelos murinos de epilepsia y Alzheimer^{30,32,33,35,36,37}. Además, los programas que estiman actividad biológica indican que es probable que tenga varios blancos biológicos, entre los que se encuentran cinasas de receptores acoplados a proteínas G, la enzima β -secretasa (que juega un papel preponderante en la EA) y STAT3 (uno de los factores de transcripción blanco de JAK2). Adicionalmente, el servidor PassOnline sugiere que la molécula podría funcionar en el tratamiento de la demencia y para la enfermedad intestinal inflamatoria (en donde se ha comprobado la participación de STAT3).

Dado que el incumplimiento con las reglas de Lipinski tiene que ver con el hecho de que el ácido escamónico es una molécula muy grande, se quiso evaluar si al modificarla se podrían mejorar sus características fisicoquímicas. La modificación

del andamio consistió en disminuir progresivamente el número de azúcares unidos al esqueleto lipídico. Esto se decidió con base en los resultados expuestos anteriormente, con respecto a que la parte hidrofóbica de la molécula tiene un papel muy importante en la inhibición de JAK2.

Los resultados sugieren que disminuir el número de azúcares mejora su biodisponibilidad (absorción gastrointestinal, lipofilicidad, logP y tamaño), sin impactar su actividad biológica. No obstante, aún con las modificaciones, la única molécula que cumple a cabalidad con las reglas de Lipinski es la que sólo tiene un azúcar en el esqueleto lipídico. De forma interesante, los resultados de acoplamiento molecular sugieren que la disminución progresiva de los azúcares va acompañada de una disminución en la energía de unión de las moléculas. Aunque no es el objetivo del presente proyecto de investigación, estos resultados sugieren que el optimizar la molécula de una forma más sistematizada podría ayudar a mejorar no sólo su biodisponibilidad sino su selectividad.

Hasta ahora pareciera que eliminar todos los azúcares del ácido escamónico podría hacer que fuera un mejor candidato farmacológico, ya que la molécula resultante tiene una energía de unión a JAK2 parecida a la molécula original, es más fácil sintetizarla y su lipofilicidad le permitiría atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, estos datos deben analizarse con cuidado, ya que, por un lado, el docking molecular sugiere, que esta molécula pierde interacciones con los aminoácidos del sitio catalítico y por otro, algunos de sus blancos biológicos cambian; por ejemplo, deja de ser relevante su acción sobre la β -secretasa y STAT3.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los programas utilizados y con el objetivo de mantener el esquema de inhibidor de JAK2 propuesto por Zhao *et al.* (2015), se sugiere que, de ser necesaria una optimización, se conserve un azúcar en el esqueleto lipídico del ácido escamónico.

Finalmente, se hizo docking molecular para saber si el ácido escamónico es capaz de unirse al péptido amiloide β . Los resultados indican que hay tres formas distintas de unión, todas con una afinidad baja. Es muy interesante observar que, aunque la energía de unión es muy similar, ninguna interacción (exceptuando al

Glu11), es común entre las tres formas de unión. Otro rasgo característico de esta unión es que, el mayor número de interacciones que forma el ácido escamónico es con el esqueleto lipídico y sus dos azúcares más cercanos. Esto reforzaría la idea de que esta es una región indispensable.

Será interesante comprobar, de forma experimental, si la unión del ácido escamónico evita la oligomerización del péptido y si puede unirse a la forma soluble del mismo, que es la que se ha asociado con mayor toxicidad.

Las perspectivas a futuro de este trabajo de investigación se encuentran enfocadas hacia el desarrollo de un inhibidor de JAK2 que pueda utilizarse como tratamiento para la EA, toda vez que se ha reportado con anterioridad que, en modelos de la misma, tanto *in vivo* como *in vitro*, e incluso en los cerebros de pacientes, se presenta una marcada activación de la vía. También se ha demostrado que la atenuación en la activación de STAT3 reduce la neuroinflamación y la muerte neuronal asociadas con la enfermedad.^{11,23,24,25}

Los efectos de la inhibición de STAT3 en enfermedades neurodegenerativas como la EA o la enfermedad de Huntington pueden reducir notablemente la neuroinflamación, promover una mejoría en el proceso de aprendizaje y modular la patología de ambos padecimientos. Sin embargo, aún no se ha dilucidado el mecanismo por el cual esto ocurre. Se ha sugerido que la activación de STAT3 puede ser el resultado de la acumulación del péptido amiloide β , el cual promueve la activación de células de la microglia y la subsecuente liberación de citocinas proinflamatorias y generación de altos niveles de especies reactivas de oxígeno. Una vez activada la vía, STAT3 contribuiría a la transcripción de genes pro-apoptóticos y de iNOS, lo cual conduciría a la muerte neuronal y aumentaría la neuroinflamación. Incluso, se ha especulado con el hecho de que la fosforilación de STAT3 y su actividad transcripcional sean reguladas de manera coordinada durante la progresión de la EA; de modo que la regulación temporal y espacial de la señalización de STAT3 podría ser crítica en las distintas etapas de la enfermedad.^{11,24}

Una fuente primordial de información con respecto del efecto de la inhibición de STAT3 sobre la EA, proviene de distintos modelos murinos. Por ejemplo, se sabe

que en los astrocitos de ratones *Knockout* de STAT3, inyectados con Amiloide- β vía intrahipocampal, se promueve la eliminación del amiloide por parte de las células de la microglia, por lo cual no hay deposición de placas amiloides, ni fallos en el aprendizaje espacial, ni deterioro cognitivo²⁴. Otro factor que contribuye a la atenuación de las características pato-fisiológicas de la EA, es que, la activación de STAT3, regula al alza a la enzima β -secretasa, necesaria para el procesamiento de la APP por vía amiloidogénica.¹¹

Los resultados de este proyecto de investigación sugieren que el ácido escamónico podría tener también como blancos biológicos a STAT3 y a la β -secretasa, pero además la información experimental de la que se dispone hasta la fecha³⁷ indica que este compuesto reduce la neuroinflamación causada por el péptido amiloide β . Es indispensable comprobar experimentalmente si el mecanismo de acción del ácido escamónico es a través de la inhibición de la vía JAK2-STAT3.

9. CONCLUSIONES

El ácido escamónico extraído de *Ipomoea tyrianthina* puede ser un inhibidor de la cinasa JAK2, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo. El acoplamiento molecular sugiere que la molécula puede unirse a la enzima en tres sitios con alto potencial farmacológico: el sitio de unión del ATP, la bolsa de la hélice α C y la bolsa de las hélices α E, α G y α K.

El ácido escamónico demostró que todas las interacciones farmacológicas relevantes para inhibir a JAK2 (como las que se forman con el gatekeeper, el loop de activación, el motivo DFG, los residuos hidrofóbicos, etc.) se encuentran presentes al unirse dicho ligando a su sitio activo.

El ácido escamónico es un inhibidor de tipo I que se une al sitio catalítico de la enzima imitando la forma de unión del ATP y presenta un I.C.₅₀ de 7.99 nM.

El ácido escamónico tiene la capacidad de unirse al sitio activo de JAK1, incluso con mayor afinidad que al de JAK2, por lo tanto su selectividad no es muy alta.

Aunque se trata de una molécula con baja biodisponibilidad, tiene posibles blancos biológicos relevantes para la enfermedad de Alzheimer, como lo son la β -secretasa o STAT3.

Los resultados sugieren que podría utilizarse con fines terapéuticos, ya que podría actuar como antiinflamatorio y ser capaz de eliminar radicales libres.

Debido a que el ácido escamónico es una molécula muy grande y flexible, es posible aumentar su biodisponibilidad, sin afectar su actividad biológica, si se eliminan dos moléculas de azúcares.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Hunsberger, H., Pinky, P., Smith, W., Suppiramaniam, V., Reed, M. 2019. The role of APOE4 in Alzheimer's disease: strategies for future therapeutic interventions. *Neuronal Signal*, 3(2).
2. Lane, C., Hardy, J., Schott, J. 2018. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*.25(1):59-70.
3. Organización Mundial de la Salud. 2019. *Demencia*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
4. Alzheimer's Disease International. 2015. Informe Mundial sobre el Alzheimer 2015. Las consecuencias de la demencia. Análisis de prevalencia, incidencia, coste y tendencias. Disponible en: <https://www.alz.co.uk/research/worldalzheimerrreport2015-summary-spanish.pdf>
5. Dos Santos, L., Ozelaa, P., De Brito, M., Pinheiroa, A., Padilhab, E., Bragac, F., De Paula da Silvad, C., Rodrigues, C., Rosad, J., Da Silva, L. 2018. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 2018(25): 3141-3159

6. Calsolaro, V. and Edison, P. 2016. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's & Dementia* (may 2016): 1-14
7. Gallardo, G. and Holtzman, D. Amyloid β and tau at the crossroads of Alzheimer's disease. 2019. En A. Takashima *et al.* (eds.), *Tau Biology, Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1184: 187-203.
8. Naseria, N., Wangb, H., Guoc, J., Sharmaa, M., Luo, W. 2019. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 705: 183–194
9. Li, S. and Selkoe, J. 2020. A mechanistic hypothesis for the impairment of synaptic plasticity by soluble A β oligomers from Alzheimer's brain. *Journal of neurochemistry*.
10. Wang, W., Tan, M. and Yu, J. 2015. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med* 3(10):136-150.
11. Wan, J., A. Fu, F. Ip, H-K Ng, J. Hugon, G. Page, J. Wang, K-O Lai, Z.Wu and N. Ip. 2010. *The journal of neuroscience* 30(20): 6873-6881
12. Banerjee, S., A. Biehl, M. Gadina and S. Hasni. 2017. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects. *Drugs* 77 (5): 521-546.
13. Zhao, C., D. Bikram and W. Cho. 2016. Insights into the structural features essential for JAK2 inhibition. *Current Medicinal Chemistry* 23 (13): 1331-1355.
14. Ghoreschi, K., A. Laurence, J. and O'Shea. 2009. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunological reviews* 228: 273-287
15. Leroy, E. and S.N. Constantinescu. 2017. Rethinking JAK2 inhibition: towards novel strategies of more specific and versatile Janus Kinase inhibition. *Leukemia* 31:1023-1038
16. Gnanasambandan, K. and P. Sayeski. 2011. A structure-function perspective of Jak2 mutations and implications for alternate drug design strategies: the road not taken. *Curr Med Chem* 18 (30): 4659-4673.
17. Dodington, D. H. Desai and M. Woo. 2018. JAK/STAT emerging players in metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism*. 29(1): 55-65
18. Murray, P. 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J. Immunol.* 178: 2623-2629.
19. Shen-Orr, S. D. Furman, B. Kidd, F. Hadad, P. Lovelace, Y. Huang, Y. Rosenberg- Hasson, S. Mackey, F. Grisar, Y. Pickman. 2016. Defective

- signaling in the JAK-STAT pathway tracks with chronic inflammation and cardiovascular risk in aging humans. *Cell Syst* 3: 374-384
20. Xu, M., T. Tchkonina, H. Ding, M. Ogrodnik, E. Lubbers, T. Pirskhalava, T. White, K. Johnson, M. Stout, V. Mezera. 2015. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory and frailty in old age. *Proc Natl. Acad. Sci.* 112 (46)
 21. Perner, F., C. Perner, T. Ernst and F. Heidel. 2019. Roles of JAK2 in aging, inflammation, hematopoiesis and malignant transformation. *Cells* 854 (8)
 22. Nevado-Holgado, A., E. Ribe, L. Thei, L. Furlong, M. Mayer, J. Quan, J. Richardson, J. Cavanagh, NIMA consortium and S. Lovestone. 2019. *Cells* 8 (425)
 23. Ben Haim, L., K. Ceyzeriat, M. Carrillo-de Sauvage, F. Aubry, G. Auregan, M. Guillermier, M. Ruiz, F. Petit, D. Houitte, E. Faivre, M. Vandesquille, R. Aron-Badin, M. Dhenain, N. Déglon, P. Hantraye, E. Brouillet, G. Bonvento and C. Escartin. 2015. The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *The journal of neuroscience* 35(6): 2817-2829.
 24. Reichenbach, N., A. Delekate, M. Plescher, F. Schmitt, S. Krauss, N. Blank, A. Halle and G. Petzold. 2019. Inhibition of STAT3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Molecular medicine* 11: e9665.
 25. Toral-Ríos, D., G. Patiño-López, G. Gómez-Lira, R. Gutiérrez, F. Becerril-Pérez, A. Rosales-Córdova, J. León-Contreras, R. Hernández-Pando, I. León-Rivera, I. Soto-Cruz, B. Florán-Garduño and V. Campos-Peña. 2020. Activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis and neuronal death induced by A β O neurotoxicity. *Int. J. Mol. Sci* 21, 7458.
 26. Lin, T., HuangFu, W., M. Chao, T. Sung, C. Chang, Y. Chen, J. Hsieh, H. Tu, H. Huang, S. Pan and K. Hsu. A novel selective JAK2 inhibitor identified using pharmacological interactions. *Front. Pharmacol.* 9: 1379.
 27. Weller, J. and Budson, A. 2018. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*. 7(F1000 Faculty Rev):1161.
 28. Koynova, R. and Tenchov, B. 2018. Natural product formulations for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: a patent review. *Recent patents on drug delivery & formulation* 12 (1): 23-39.

29. Anekonda, T. and Reddy, P. 2005. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? *Brain Research Reviews* 50: 361-376.
30. Meira, M., Pereira, E., David, J., David, J. 2012. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22(3): 682-713.
31. Pereda, R., Rosas-Ramírez, D y Castañeda-Gómez, J. 2010. Resin glycosides from the morning family. En A. D. Kinghorn *et al.* (eds.) *Progress in the chemistry of organic natural products*. Vol. 92.
32. Jaimes, J. 2019. *Evaluación de las actividades antiinflamatoria y antioxidante de escamonina I y compuestos aromáticos aislados de Ipomoea tyrianthina*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
33. Aguirre, A., 2014. *Evaluación de la actividad neuroprotectora de oligosacáridos aislados de Ipomoea stans y Ganoderma lucidum*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional del Estado de Morelos.
34. León Rivera, I., Castro, J., Mirón López, M, Del Río Portilla, F., Enríquez, R., Reynolds, W., Estrada-Soto, S., Rendón Vallejo, P., Gutiérrez, M., Herrera Ruíz, M., Mendoza, A., Vargas, G. 2014a. Resin glycosides from *Ipomoea tyrianthina* and their sedative and vasorelaxant effects. *J. Nat. Med.* 68: 655-667
35. León-Rivera, I., Villeda-Hernández, J., Campos-Peña, V., Aguirre-Moreno, A., Estrada-Soto, S., Navarrete-Vázquez, G., Rios, M., Aguilar-Guadarrama, B., Castillo-España, P. and Rivera-Leyva, J. 2014b. Evaluation of the Neuroprotective Activity of Stansin 6, a Resin Glycoside from *Ipomoea Stans*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (15): 3541–3545.
36. León Rivera, I., Mirón-López, G., Estrada-Soto, S., Aguirre-Crespo, F., Gutiérrez, M., Molina-Salinas, G., Hurtado, G. 2009. Glycolipid ester-type heterodimers from *Ipomoea tyrianthina* and their pharmacological activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19: 4652-4656.
37. Becerril, F., 2016. *Efecto del ácido escamónico en un modelo de neurotoxicidad inducido por amiloide b 1-42*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
38. Hanwell, M., D. Curtis, D. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek and G. Hutchison. 2012. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics* 4:17.

39. Berman, H., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 28: 235-242.
40. BIOVIA, Dassault Systèmes. 2021. Biovia Discovery Studio. San Diego: Dassault Systèmes.
41. Schöning-Stierand, K.; Diedrich, K.; Fährrolfes, R.; Flachsenberg, F.; Meyder, A.; Nittinger, E.; Steinegger, R.; Rarey, M. (2020). ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Research*, 48:W48-W53.
42. Dallakyan S., A. Olson. 2015. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods Mol Biol*. 1263:243-50
43. Tetko, I. V., Gasteiger, J., Todeschini, R., Mauri, A., Livingstone, D., Ertl, P., Palyulin, V. A., Radchenko, E. V., Zefirov, N. S., Makarenko, A. S., Tanchuk, V. Y., Prokopenko, V. V. 2005. Virtual computational chemistry laboratory-design and description. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 19: 453-463
44. SwissADMET: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* (2017) 7:42717.
45. Daina, A., O. Michielin, V. Zoete. 2016. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Research*. 47(W1): W357–W364
46. Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V. (2014). Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50 (3), 444-457.
47. Sander, T., J. Freyss, M. von Korff, C. Rufener. 2015. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *J Chem Inf Model* 55: 460-473
48. Jiao, J., J. Tu, P. Cheng, H. Lin and X. Yun. 2016. Insights into DFG-in and DFG-out JAK2 binding modes for a rational strategy of type II inhibitors combined computational study. *RSC Advances*, 6: 45540-45552
49. Alicea-Velázquez, N. and T. Boggon. 2011. The use of structural biology in Janus kinase targeted drug Discovery. *Current drug targets* 12 (4): 546-555.

50. Mielecki, M., M. Milner-Krawczyk, K. Grzelak, D. Mielecki. 2014. Analogs of cinnamic acid benzyl amide as nonclassical inhibitors of activated JAK2 kinase. *Current Cancer Drug Targets* 14(7)
51. Lucet, I., E. Fantino, M. Styles, R. Bamert, O. Patel, S. Broughton, M. Walter, C. Burns, H. Treutlein, A. Wilks and J. Rossjohn. 2016. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. *Blood* 107 (1): 176-183.
52. Vrontaki, E., G. Melagraki, A. Afantitis, T. Mavromoustakos and G. Kollias. 2017. Searching for novel Janus kinase-2 inhibitors using a combination of pharmacophore modeling, 3D-QSAR studies and virtual screening. *Mini-reviews in medicinal chemistry* 17: 268-294.
53. Andraos, R., Z. Qian, D. Bonenfant, J. Rubert, E. Vangrevelinghe, C. Scheufler, F. Marque, C. Régnier, A. de Pover, H. Ryckelynck, N. Bhagwat, P. Koppikar, A. Goel, L. Wyder, G. Tavares, F. Baffert, C. Pissot-Soldermann, P. Manley, C. Gaul, H. Voshol, R. Levine, W. Sellers, F. Hofmann and T. Radimerski. 2012. Modulation of activation-loop phosphorylation by JAK inhibitors is binding mode dependent. *Cancer Discovery* 2: 512-523
54. Zhong, H., S. Lin, I. Lam Tam, L. Lu, D. Shiu-Hin Chan, D. Lung Ma. 2015. *In silico* identification of natural product inhibitors of JAK2. *Methods* 71: 21-25
55. Li, J., Shi, Z. and Mi, Y. 2018. Purple sweet potato color attenuates high fat-induced neuroinflammation in mouse brain by inhibiting MAPK and NF- κ B activation. *Molecular medicine reports* 17: 4823-4831.
56. Cai, C., Chen, Y., Zhong, S., Ji, B., Wang, J. Bai, X. and Shi, G. 2014. Anti-inflammatory activity of N-Butanol extract from *Ipomoea stolonifera* *in vivo* and *in vitro*. *PLOS One* 9 (4): e95931.