

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Estudio de la actividad neuroprotectora de especies liquénicas del clado cetrarioide (F/Parmeliaceae) y compuestos aislados

Study of the neuroprotective activity of lichen species of the cetrarioid clade (F/Parmeliaceae) and isolated compounds

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isabel Ureña Vacas

Directoras

Elena María González Burgos
María Pilar Gómez- Serranillos Cuadrado

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Estudio de la actividad neuroprotectora de especies liquénicas del clado cetrarioide (F/Parmeliaceae) y compuestos aislados

Study of the neuroprotective activity of lichen species of the cetrarioid clade (F/Parmeliaceae) and isolated compounds.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Isabel María Ureña Vacas

Directores

Elena María González Burgos

María Pilar Gómez- Serranillos Cuadrado

Madrid, 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DOCTORADO EN FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Estudio de la actividad neuroprotectora de especies liquénicas del clado cetrarioide (F/Parmeliaceae) y compuestos aislados

Study of the neuroprotective activity of lichen species from the cetrarioid clade (F/Parmeliaceae) and isolated compounds.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Isabel María Ureña Vacas

Directores

Elena María González Burgos

María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado

Madrid, 2023



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

La **Dra María Pilar Gómez Serranillos Cuadrado**, Catedrática del Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y la **Dra Elena María González Burgos**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

Certifican que el presente trabajo de investigación titulado:

“Estudio de la actividad neuroprotectora de especies liquénicas del clado cetrarioide (F/Parmeliaceae) y compuestos aislados.”

“Study of the neuroprotective activity of lichen species from the cetrarioid clade (F/Parmeliaceae) and isolated compounds.”

constituye la memoria que presenta la graduada Isabel María Ureña Vacas para optar al grado de Doctor con Mención Internacional y que ha sido realizado en el Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección.

Asimismo, una vez concluido el trabajo experimental y bibliográfico y en el marco del proceso de evaluación requerido, damos nuestro consentimiento para su presentación y defensa en la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a cinco de mayo de dos mil veintitrés.

Dra. María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado

Dra. Elena María González Burgos

Este trabajo de investigación ha sido realizado en el **Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica** de la **Facultad de Farmacia** de la **Universidad Complutense de Madrid**, al amparo del proyecto PID2019-105312GB-I00 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Asimismo, la doctoranda Dña Isabel María Ureña Vacas ha disfrutado de una **beca contrato predoctoral UCM**, con referencia CT42/18-CT43/18, concedida por la Universidad Complutense de Madrid.

Durante el desarrollo de la Tesis Doctoral la doctoranda ha realizado una **estancia breve** de tres meses de duración incluida en el plan formativo del contrato predoctoral. Dicha estancia se ha realizado en la **Università degli Studi di Firenze** (UniFi) (Florenca, Italia), en el Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche 'Mario Serio', bajo la dirección de la Dra. Monica Bucciantini.



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE



*Au milieu de l'hiver, j'apprenais enfin
qu'il y avait en moi un été invincible.*

*En medio del invierno aprendí por fin
que había en mí un verano invencible.*

Albert Camus

Agradecimientos

Como bien dijo el escritor John Green *“Cualquiera puede mirarte. Pero muy pocas veces encuentras a alguien que ve el mismo mundo que estás viendo tú.”* y por suerte, durante estos años, he estado rodeada de gente que ha hecho todo lo posible por ponerse en mis zapatos, y acompañarme en el camino, siempre con una mano tendida. A todos vosotros, gracias.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras de Tesis, la Dra. María Pilar Gómez-Serranillos y la Dra. Elena González por su trabajo, confianza y cariño a lo largo de esta etapa. Pilar, gracias por permitirme formar parte de tu grupo de investigación y por brindarme la oportunidad de crecer a nivel científico y personal a lo largo de estos años. Has sido una pieza fundamental en este trabajo. Elena, es difícil resumir en unas líneas todo lo que merecerías escuchar. Gracias por transmitirme que con trabajo duro es posible conseguir lo que te propongas, por tu ayuda incondicional y sincera durante todos estos años, por guiarme, enseñarme, cuidarme y escucharme en todo momento. Has sido más que una directora de Tesis, gracias.

Mi agradecimiento a mis compañeros de grupo de investigación. A Marta, por estar disponible siempre para un café o una conversación, que nos hiciera desconectar y coger fuerzas para enfrentarnos al siguiente reto. A Jose, ojalá aprender de tu filosofía de vida. A Nacho, nunca olvides tu pasión por esto, te deseo lo mejor en esta nueva etapa.

Especial mención al Dr. Pradeep Divakar, por ser un referente en el mundo de los líquenes y permitirme adentrarme en su conocimiento. Gracias por tu ayuda siempre unida a una sonrisa.

Estos años han sido difíciles para todos, pero las personas que conforman el Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica han sido compañeros y amigos, que han conseguido darle la vuelta a las circunstancias. Por ello, a todos vosotros, mi más sincero agradecimiento. Gracias a la Dra. Juana Benedí y al actual director del departamento el Dr. Leopoldo García, por dirigir este departamento, y colaborar en crear un ambiente de trabajo unido. Gracias al grupo de Farmacología General, Alba, Ana, Arancha, Marisol, Jose, Joaquín, Luis, Paqui, Luismi por dejarme formar parte de todos vuestros proyectos docentes. Ana, Alba, Arancha, vuestro despacho siempre será un refugio. Jose, gracias por los sustos y hacerme reír. Luismi, tu secretaria te echará de menos. Gracias Paloma, por todas nuestras conversaciones matutinas, has sido y eres un apoyo constante. Gracias Paulina, por transmitirme la fuerza que necesitaba. Gracias Sagrario y Karla, por todos los momentos compartidos. Irene, Patri, Arturo, Olga, Teresa, Beatriz... vuestros ánimos y conversaciones han sido esenciales estos meses. A Rafa, por su trabajo y cariño. A Nieves, porque hacías del departamento un lugar mejor.

A los amigos con los que he compartido esta etapa predoctoral, sois la verdadera fuerza y futuro del departamento. A los que os fuisteis, os quedasteis o volvéis, que felicidad compartir esto con vosotros. A Rocío y a Marina, mi deuda en cafés, comida y comprensión es impagable, gracias por todo. A Iván, por su ayuda y apoyo. A Pablo, por todos los secretos compartidos, eres un gran amigo. A Laura, no digas nada, pero... eres mi favorita. Gracias por la amistad sincera, el apoyo, la empatía, gracias por tantas cosas. Seguiremos compartiendo la vida, no tengo dudas amiga. A Adrián, siempre al otro lado del teléfono hasta a continentes de distancia, gracias por ser el amigo que eres. A Víctor, por ayudarme en mis primeros momentos, por enseñarme a pelear por los sueños. A Elisa, ojalá haberte tenido de compañera siempre.

Mi piacerebbe anche ringraziare la Dott.ssa Monica Buccinatini del Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche "Mario Serio" dell'Università degli Studi di Firenze per avermi permesso d'imparare da lei e dal suo gruppo di ricerca nello sviluppo del mio percorso predottorale. Un ringraziamento speciale alla Dott.ssa Manuela Leri, che ha condiviso il suo tempo e le sue conoscenze con me ogni giorno. Manuela, mi manca veramente lavorare lì, spero ci riusciremo ad incrociarci più volte in futuro. Grazie anche a tutto il dipartimento per aver reso il mio soggiorno un'esperienza incredibile. Grazie a Marzia, Leandro, Constanza, Lorenzo, Max, Elisa, Marta, Giulio, per ogni momento e per avermi fatto sentire così a mio agio lontano da casa.

Pero para llegar al día de hoy, se necesita a mucha gente que a veces no entiende ni la mitad de lo que haces, o las palabras con las que se lo explicas, pero sí entienden de amistad, de amor, y de transmitirte la fuerza y desconexión que necesitas. A mis amigas, Lucia, Raquel, Andrea, Patri, por no dejarme caer nunca, por ser el mejor equipo posible. Completamente segura de que conseguiremos nuestras metas. A Bea, Ana, Andrea, Alex, Jaime, Asier, por crecer juntos. A todos mis amigos farmacéuticos, la mejor promoción de la historia, porque llenasteis los pasillos y clases de la Facultad de Farmacia de recuerdos, siempre presentes en esta etapa. Orgullosa de cada uno de vosotros. A mis amigos de Florencia, Víctor, Miranda, Marina, Ángela llegasteis en los últimos meses de esta etapa, pero me cambiasteis más de lo que creéis.

Finalmente, si alguien merece las gracias en este periodo, es mi familia. Gracias por conseguir darle la vuelta a lo malo, y ser ejemplo de seguir peleando por disfrutar de las cosas buenas. A mis primos y a mis tíos. En especial, gracias a mi tío Tomás y a mi tío Ángel, por enseñarme a ser buena persona y quererme sin condiciones, os echo mucho de menos.

A mis abuelos, siempre en mi mente, os quiero. A mi abuela Aurora, el pegamento de la familia. A mi abuela Isabel, este trabajo va por ti. Te echaré de menos siempre.

A mi hermana Almudena, por allanar el camino que luego pisé yo. Gracias por el apoyo, el cariño y por ser ejemplo de esfuerzo y valentía. Porque ahora, Alicante también es mi casa y Eli mi familia.

A Antonio, por ser la mejor persona que conozco. Porque esta Tesis ya ha merecido la pena sólo por encontrarnos. Gracias por escucharme, cuidarme, por apoyarme. Por hacerme ver lo que valgo, y enseñarme que la vida es algo más. Gracias de corazón por todos estos meses. Compartir la vida contigo es el verdadero premio.

Y a los responsables de todo, al verdadero pilar fundamental, a mis padres. Por transmitirme los valores de esfuerzo, trabajo, perseverancia, sin olvidar lo importante que es cuidar a la gente que nos rodea. A mi madre, haces que todo sea más fácil. Gracias por recordarme quién soy y cuidarme siempre. Por acompañarme en todas mis etapas, desde el colegio hasta estos últimos meses duros de trabajo. Por tu valentía y superación. Te quiero mucho. A mi padre, si estoy aquí en este camino, es porque me enseñas día a día que se puede llegar lejos en la universidad, haciéndolo bien. Por ser referente en investigación, docencia y gestión, pero mejor padre aún. Si nunca perdí mi meta, a pesar de las tormentas, es por ti. Gracias por cuidarme y acompañarme cada día. Te quiero mucho.

Muchas gracias a todos por estos años, esta Tesis Doctoral también es vuestra.

ÍNDICE

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	4
Abreviaturas.....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	15
1. Enfermedades neurodegenerativas.....	15
<u>1.1. Sistema Nervioso Central.....</u>	15
1.1.1. Generalidades.....	15
1.1.2. Barrera hematoencefálica.....	16
<u>1.2. Enfermedades neurodegenerativas.....</u>	22
1.2.1. Principales enfermedades neurodegenerativas.....	23
1.2.2. Mecanismos patogénicos.....	27
<u>1.3. Neuroprotección en enfermedades neurodegenerativas: enfoque en la etiología del daño y las dianas terapéuticas.....</u>	27
1.3.1. Estrés oxidativo y estrategias neuroprotectoras frente al daño oxidativo.....	27
<u>1.3.1.1. Radicales libres e Intermediarios Reactivos de Oxígeno y Nitrógeno.....</u>	27
1.3.1.1.2. Fuentes de especies reactivas de oxígeno endógenas y exógenas.....	28
1.3.1.1.3. Sistemas y mecanismos antioxidantes.....	29
1.3.1.1.4. Estrés oxidativo.....	33
1.3.1.1.4.1 Daño oxidativo a moléculas biológicas. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	34
1.3.1.1.4.2 Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas.....	36
<u>1.3.1.1.5. Estrategias neuroprotectoras frente al estrés oxidativo.....</u>	38
1.3.1.1.5.1. Inducción del sistema enzimático antioxidante.....	38
1.3.1.1.5.2. Disminución de la disfunción mitocondrial y mantenimiento de la homeostasis del calcio y del potencial de membrana.....	40
1.3.1.1.5.3. Inhibición de la apoptosis.....	42
1.3.1.1.5.4. Activación de la autofagia.....	44
1.3.2. Déficit colinérgico e inhibidores de enzimas colinesterasas.....	47
1.3.2.1. Neurotransmisores en trastornos neurodegenerativos.....	47
1.3.2.2. Déficit colinérgico.....	48
1.3.2.3. Enzimas colinesterasas.....	49

1.3.2.4. Neuroprotección mediante la inhibición de las enzimas colinesterasas.....	49
1.3.3. Estrategia neuroregeneradora frente a daño neuronal.....	54
1.3.3.1. Pérdida estructural y funcional de neuronas en enfermedades neurodegenerativas....	54
1.3.3.2. Modulación terapéutica de la neurogénesis adulta y la plasticidad sináptica.....	56
<u>1.4. Compuestos naturales y neuroprotección.....</u>	57
2. Líquenes.....	58
<u>2.1 Líquenes.....</u>	58
2.1.1. Características generales.....	58
2.1.2. Morfología y anatomía del líquen.....	59
2.1.3. Distribución geográfica.....	60
2.1.4. Composición química.....	61
2.1.5. Taxonomía y Filogenia.....	67
<u>2.2. Líquenes del clado cetrarioide.....</u>	68
2.2.1. Familia Parmaliaceae.....	68
2.2.2. Clado cetrarioide.....	70
2.2.3. Especies líquénicas utilizadas en el desarrollo de la Tesis Doctoral.....	72
<u>2.3. Usos y aplicaciones de los líquenes para el ser humano.....</u>	76
2.3.1 Ecología: bioindicadores de contaminación y cambio climático.....	76
2.3.2 Industria alimentaria y cosmética.....	77
2.3.3 Medicina tradicional.....	77
2.3.4 Propiedades farmacológicas de compuestos líquénicos.....	79
<u>2.4. Actividades antioxidantes y neuroprotectoras de los líquenes.....</u>	79
2.4.1. Actividad antioxidante de los líquenes cetrarioides.....	79
2.4.2. Actividad neuroprotectora de líquenes y metabolitos secundarios.....	81
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	85
III. RESULTADOS.....	89
CAPÍTULO I: Revisión del estado actual del conocimiento sobre las actividades farmacológicas de los grupos de metabolitos secundarios líquénicos predominantes.....	91
-Publicación 1: Lichen Depsidones with Biological Interest.....	93
-Publicación 2: Dibenzofurans From lichens- A Pharmacological Overview.....	121
-Publicación 3: Lichen depsides and tridepsides: Progress in Pharmacological Approaches.....	135

CAPÍTULO II: Screening farmacológico <i>in vitro</i> de especies líquénicas pertenecientes al clado cetrarioide (F/Parmeliaceae) como primer cribado para posterior aplicación en modelos celulares	169
-Publicación: Phytochemical Characterization and Pharmacological Properties of Lichen Extracts from Cetrarioid Clade by Multivariate Analysis and Molecular Docking.....	171
CAPÍTULO III: Validación farmacológica en modelo celular de la actividad anticolinesterásica de extractos y compuestos más prometedores.....	191
-Publicación: Discovery of Natural Acetylcholinesterase inhibitors from the Cetrarioid lichens <i>Cetraria cucullata</i> and <i>Asahinea scholanderi</i> and its secondary metabolites.....	193
CAPÍTULO IV: Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora de extractos líquénicos en modelos celulares de estrés oxidativo. Caracterización fitoquímica.....	205
-Publicación: Lichen Extracts from Cetrarioid Clade provide neuroprotection against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative stress.....	207
CAPÍTULO V: Evaluación del papel neuroprotector del ácido giróforico y su permeabilidad en modelos de paso de barrera hematoencefálica.....	225
-Publicación: Neuroprotective roles and blood barrier permeability of lichen tridepside gyrophoric acid.....	227
IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA.....	253
V. CONCLUSIONES.....	289
V. CONCLUSIONS.....	293
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	309

Resumen

Estudio de la actividad neuroprotectora de especies liquénicas del clado cetrarioide (F/Parmeliaceae) y compuestos aislados.

El aumento de la esperanza de vida conlleva un incremento en la prevalencia de las enfermedades relacionadas con la edad, entre las que se destaca a las enfermedades neurodegenerativas. Estas patologías constituyen un serio problema de salud pública por las graves consecuencias físicas y psicológicas que sufre el paciente y su entorno y el impacto sanitario y económico.

Su patogenia es compleja, viéndose implicados numerosos mecanismos como la agregación anómala de proteínas, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la disfunción sináptica o el desequilibrio de neurotransmisores. La multiplicidad de factores implicados dificulta la búsqueda y desarrollo de tratamientos curativos con los que no sólo sea posible frenar, sino también revertir el proceso neurodegenerativo. En la actualidad, la investigación está orientada a la búsqueda de "ligandos dirigidos hacia múltiples dianas", actuando sobre múltiples mecanismos de la enfermedad reduciendo los efectos adversos ocasionados por interacciones en terapias combinadas.

Desde la antigüedad, la naturaleza ha sido utilizada como fuente de productos bioactivos. En la terapéutica moderna, los compuestos naturales o sus derivados obtenidos mediante semisíntesis han destacado por sus propiedades farmacológicas en diversas áreas terapéuticas. En este contexto, los líquenes surgen como una novedosa fuente de metabolitos activos, que, durante mucho tiempo, ha sido escasamente explorada. En los últimas décadas, extractos liquénicos y compuestos aislados han sido investigados en modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* e, demostrando importantes actividades farmacológicas tales como antioxidante, citotóxica, antimicrobiana, antiinflamatoria, analgésica, o fotoprotectora.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el de evaluar las actividades neuroprotectoras de extractos liquénicos y metabolitos secundarios de especies del clado cetrarioide (Familia Parmeliaceae), determinando sus efectos sobre diversos mecanismos implicados en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas.

Con la revisión del estado actual del conocimiento sobre las diversas actividades farmacológicas de los compuestos liquénicos se observó que, a pesar de su demostrada actividad antioxidante, la actividad neuroprotectora había sido escasamente estudiada. Asimismo, la quiralidad de sus estructuras permite la interacción con múltiples enzimas.

El trabajo experimental desarrollado en esta Tesis Doctoral comprende, inicialmente, el análisis de catorce especies de líquenes del clado cetrarioide (Familia Parmeliaceae) en base a sus propiedades antioxidantes e inhibitorias de enzimas colinesterasas.

Así, los extractos de las especies *Asahinea scholanderi* y *Cetraria cucullata* destacaron por su capacidad *in vitro* inhibitoria frente a las enzimas AChE y BuChE. Los análisis fitoquímicos por HPLC-UV revelaron la presencia de ácido alectorónico y ácido colatólico en *Asahinea scholanderi* y de ácido protoliqueterénico y ácido úsnico en *Cetraria cucullata*. Por otro lado, los estudios *in silico* de acoplamiento molecular mostraron que el ácido alectorónico presentaba un buen perfil de inhibición frente a la enzima AChE, próximo al del inhibidor de referencia donepezilo. Esta inhibición enzimática fue posteriormente validada en un modelo celular neuronal. Además, el extracto del líquen *A. scholanderi* y los compuestos ácido alectorónico y ácido úsnico redujeron los niveles de expresión de la enzima AChE, sugiriéndose funciones protectoras no asociadas a la inhibición de esta enzima.

En cuanto a la actividad antioxidante *in vitro*, destacaron los extractos metanólicos de *Dactylina arctica*, *Nephromopsis stracheyi*, *Tuckermannopsis americana* y *Vulpicida pinastri*. Estos líquenes se seleccionaron para profundizar en su estudio en un modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Los líquenes que mostraron mayor capacidad neuroprotectora fueron *Dactylina arctica* y *Vulpicida pinastri* que redujeron de forma significativa la sobreproducción de EROS y la peroxidación lipídica, restauraron la morfología celular, aumentaron la actividad de enzimas antioxidantes y atenuaron el daño mitocondrial. La especie *Vulpicida pinastri* presentó ácido vulpínico, ácido pinástrico y ácido úsnico en su composición y la especie *Dactylina arctica* los compuestos ácido lecanórico, ácido úsnico y ácido girofórico. El líquen *Dactylina arctica* fue más activo que *Vulpicida pinastri* por lo que se llevaron a cabo posteriores estudios con el compuesto mayoritario ácido girofórico empleándose el mismo modelo celular de estrés oxidativo.

El ácido girofórico ejerció su potencial actividad neuroprotectora a través de la inducción de la respuesta antioxidante endógena (mediante el aumento de los niveles de enzimas antioxidantes) y la potenciación de la autofagia frente a la apoptosis como respuesta de supervivencia celular. Además, debido a la implicación de la disfunción sináptica en las enfermedades neurodegenerativas se constató su papel neuromodulador en procesos a nivel sináptico como el crecimiento axonal y la sinaptogénesis, implicados en la plasticidad neuronal.

Finalmente, se demostró que el ácido girofórico es capaz de atravesar la BHE en un modelo *in vitro* de permeabilidad celular, sugiriéndose la difusión pasiva como transporte principal. Estos resultados apoyan los datos obtenidos sobre sus propiedades moleculares *in silico*. Por otro lado, estudios *in silico* de su perfil ADMET, mostraron que el ácido girofórico presentaba un perfil moderado de absorción y adecuado de toxicidad.

En conclusión, los líquenes del clado cetrarioide constituyen una fuente valiosa de compuestos bioactivos con propiedades neuroprotectoras, que actúan sobre diferentes procesos y enzimas implicados en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas

Abstract

Study of the neuroprotective activity of lichen species of the cetrarioid clade (F/Parmeliaceae) and isolated compounds.

As a consequence of the increase of life expectancy, the prevalence of age-related diseases has risen, with neurodegenerative disorders being particularly prominent. These pathologies constitute a serious public health issue due to the severe physical and psychological consequences experienced by the patient and their environment, as well as the health and economic impacts.

Its pathogenesis is complex, involving numerous mechanisms such as abnormal protein aggregation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, synaptic dysfunction, and neurotransmitter imbalance. The multiplicity of factors involved makes it difficult to find curative treatments that can not only slow down but also reverse the neurodegenerative process. Presently, the focus of research is directed towards identifying "ligands aimed at multiple targets," which act on various disease mechanisms and decrease the adverse effects caused by combinatorial therapies' interactions.

Since ancient times, nature has been used as a source of bioactive products. In modern therapeutics, natural compounds or their derivatives obtained by semi-synthesis have stood out for their pharmacological properties in various therapeutic areas. In this context, lichens emerge as a novel source of active metabolites, which, for a long time, has been scarcely explored. In the last decades, lichen extracts and isolated compounds have been investigated in *in silico*, *in vitro* and *in vivo* models, demonstrating important pharmacological activities such as antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, or photoprotective.

The aim of this Doctoral Thesis was to evaluate the neuroprotective activities of lichen extracts and secondary metabolites of species of the cetrarioid clade (Parmeliaceae family), determining their effects on various mechanisms involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

A review of the current state of knowledge on the various pharmacological activities of lichen compounds showed that, despite their proven antioxidant activity, their neuroprotective activity had been object of little study. Furthermore, the chirality of their structures allows interaction with multiple enzymes.

The experimental work carried out in this Doctoral Thesis comprises, initially, the analysis of fourteen species of lichens of the cetrarioid clade (Parmeliaceae Family) based on their antioxidant and cholinesterase enzyme inhibitory properties.

Thus, the extracts of *Asahinea scholanderi* and *Cetraria cucullata* species stood out for their *in vitro* inhibitory capacity against AChE and BuChE enzymes. Phytochemical analysis by HPLC-UV revealed the presence of alectoronic acid and collatolic acid in *Asahinea scholanderi* and protolichesterenic acid and usnic acid in *Cetraria cucullata*. On the other hand, *in silico* molecular docking studies showed that alectoronic acid had a good inhibition profile against the AChE enzyme, close to that of the reference inhibitor donepezil. This enzyme inhibition was subsequently validated in a neuronal cell model. In addition, the *A. scholanderi* lichen extract and the compounds alectoronic acid and usnic acid reduced AChE enzyme expression levels, suggesting protective functions not associated with AChE inhibition.

In terms of *in vitro* antioxidant activity, methanolic extracts of *Dactylina arctica*, *Nephromopsis stracheyi*, *Tuckermannopsis americana*, and *Vulpicida pinastri* stood out. These lichens were selected for further study in a model of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. The lichens that showed the largest neuroprotective capacity were *Dactylina arctica* and *Vulpicida pinastri*, which significantly reduced ROS overproduction and lipid peroxidation, restored cell morphology, increased antioxidant enzyme activity and attenuated mitochondrial damage. The species *Vulpicida pinastri* showed vulpinic acid, pinastric acid and usnic acid in its composition and the species *Dactylina arctica* presented the compounds lecanoric acid, usnic acid and gyrophoric acid. The lichen *Dactylina arctica* was more active than *Vulpicida pinastri* so further studies were carried out with its major compound gyrophoric acid using the same cellular model of oxidative stress.

Gyrophoric acid exerted its potential neuroprotective activity through induction of the endogenous antioxidant response (by increasing antioxidant enzyme levels) and potentiation of autophagy against apoptosis as a cell survival response. In addition, due to the involvement of synaptic dysfunction in neurodegenerative diseases, its neuromodulatory role in synaptic level processes such as axonal growth and synaptogenesis, involved in neuronal plasticity, has been demonstrated.

Finally, it was shown that gyrophoric acid can cross the BBB in an *in vitro* model of cell permeability, suggesting passive diffusion as the main transport. These results support the data obtained on its molecular properties *in silico*. On the other hand, *in silico* studies of its ADMET

profile showed that gyrophoric acid had a moderate uptake profile and an adequate toxicity profile.

In conclusion, lichens of the cetrarioid clade are a valuable source of bioactive compounds with neuroprotective properties, which act on different processes and enzymes involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

A

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana
AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
AIH	Absorción intestinal humana
AQP	Aquaporina
ANG-1	Angiopoyetina-1
APOE- ϵ 4	Apolipoproteína E
ARE	Elemento de Respuestas Antioxidante
AT	Acil-transferasa
ATG	Genes relacionados con la autofagia
ATP	Adenosina trifosfato

B

BACE	Enzima β -secretasa
BCG	Clúster de genes biosintéticos
BCRP	Proteína asociada a resistencia de cáncer de mama.
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
BHE	Barrera hematoencefálica
BuChE	Butirilcolinesterasa

C

CAS	Centro activo catalítico
CAT	Catalasa
ChAT	Acetilcolina transferasa
CHOP	Proteína homóloga C/EBP
Cit C	Citocromo C
Cx	Conexina

D

DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DH	Deshidratasa
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DPPH	1-difenil-2-picrilhidrazil

E

EA	Enfermedad de Alzheimer
EAP	Índice de potencial antioxidante
EC-SOD	Enzima extracelular SOD
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EMA	Agencia Europea del Medicamento
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EnR	Enoilreductasa
EP	Enfermedad de Parkinson
ERNS	Especies reactivas de nitrógeno
EROS	Especies reactivas de oxígeno

F

FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FRAP	Poder antioxidante reductor férrico
FUS	Proteína fusionada en sarcoma.

G

GAP43	Proteína 43 asociada al crecimiento recombinante
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GDNF	Factor neurotrófico derivado de células gliales
GLU	Glutamato
GLUT-1	Transportador de glucosa 1

PH-GPx	Fosfolípido hidroperóxido GPx	<u>M</u>	
GPx	Glutación peroxidasa	mAChRs	Receptores muscarínicos
GR	Glutación reductasa	MAI	Moléculas de adhesión intercelular
GSH	Glutación sulfhidrilo	MAO	Monoamino oxidasas
GSSG	Glutación oxidado	MCT	Transportadores monocarboxilato
GST	Glutación S-transferasa	MCU	Uniporter de calcio mitocondrial
<u>H</u>		MDA	Malondialdehído
HAT	Transferencia de átomo de hidrógeno	MDCK	Células renales caninas de Madin-Darby
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	mHtt	Proteína mutante de huntingtina
5-HT	Serotonina	MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridinio
HA	Histamina	mPTP	Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
HCA	Análisis de agrupamiento jerárquico	MRPs	Proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos
hCMEC/D3	Endotelio microvascular de cerebro humano	MSCs	Células madre mesenquimales
HO	Hemoxigenasa	mtDNA	ADN mitocondrial
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia	MTDL	Multi-target-direct-ligands
H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón	<u>N</u>	
HRPKS	PKS reductoras	NA	Noradrenalina
<u>I</u>		nAChR	Receptor de nicotínico de acetilcolina
IChEs	Inhibidores colinesterásicos	NeuN	Antígeno Neuronal Nuclear
<u>J</u>		NGF	Factor de crecimiento nervioso
JNKK	Proteína kinasa c-Jun N terminal activada por mitógeno	NMDA	N-metil-D-aspartato
<u>K</u>		NO [•]	Radicales óxido nítrico
KR	Cetorreductasa	NO ₂ [•]	Dióxido de nitrógeno
KS	Quetoacil sintasa	NQO1	NADPH quinona deshidrogenasa 1
<u>L</u>		Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
LAT-1	Transportador de L-alfa aminoácidos	NRPKS	PKS no reductoras
LC-MS	Espectrometría de masas	NS/PCs	Células madre/células madre progenitoras
LCR	Líquido ceforraquídeo	<u>O</u>	
LTD	Depresión a largo plazo	O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
LTP	Potenciación a largo plazo		

•OH	Radicales hidroxilo	RBE4	Endotelio cerebral de rata
•OOR	Peroxilo	RL	Radicales libres
¹ O ₂	Oxígeno singlete	ROOH	Hidroperóxido orgánico
OATP	Transportadores de aniones orgánicos	RSeOH	Selenénico
OCT	Transportadores de cationes orgánicos	<u>S</u>	
OGD/R	Oxígeno y glucosa/reperfusión	SET	Transferencia de electrón único
ONOOH	Peroxinitrito	SH-SY5Y	Células de neuroblastoma humano
ORAC	Capacidad de absorción de radicales derivados del oxígeno	SLC	Transportadores de soluto
OXPHOS	Fosforilación oxidativa	SNC	Sistema Nervioso Central
6-OHDA	6-hidroxidopamina	SOD	Superóxido dismutasa
8-oxodG	8-Oxo-2'-deoxyguanosine	<u>T</u>	
<u>P</u>		TARDBP	Proteína de unión a ADN TAR 43
PARP	poli ADP ribosa polimerasa	TBK1	Quinasa de unión a TANK 1
PAMPA-BHE	Predicción del paso de la barrera hematoencefálica	TLC	Cromatografía en capa fina
PAS	Sitio aromático periférico	TPC	Contenido fenólico total
PCA	Análisis de componentes principales	TPSA	Área topológica de la superficie polar
PC12	Feocromocitoma adrenal de rata	Trx	Tiorredoxina
PKSs	Poliquétido sintasas	TrxR	Tiorredoxina reductasa
PRPKS	PKS parcialmente reductoras	TuJ1	β-tubulina de clase III específica de neuronas
PSD95	Proteína de densidad postsináptica de 95 kDa	<u>V</u>	
PUFAs	Ácidos grasos polinsaturados	VDAC	Canal aniónico voltaje dependiente
<u>Q</u>		VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
QSAR	Relación estructura-actividad cuantitativa	VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas 2
		<u>Z</u>	
		ZO	Zonula occludens
		ZSG	Zona subgranular
		ZSV	Zona subventricular

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades neurodegenerativas

1.1. Sistema Nervioso Central

1.1.1 Generalidades

En términos anatómicos, el Sistema Nervioso Central (SNC) está formado por el cerebro, en la cavidad craneal, y la médula espinal, en la columna vertebral. El cerebro a su vez se subdivide en encéfalo, cerebelo y hemisferios cerebrales.

El SNC está compuesto por células nerviosas, conocidas como neuronas, y células gliales no neuronales. El nombre de éstas últimas deriva del término griego referido a pegamento, unión, puesto que son las responsables de mantener unido el sistema nervioso (Virchow, 1856).

Las neuronas están constituidas por el cuerpo celular denominado soma, y por una serie de proyecciones, las dendritas y el axón. Las dendritas aumentan la superficie neuronal y reciben señales de otras células nerviosas mediante las espinas dendríticas, mientras que el axón es responsable de la conducción de los impulsos nerviosos a otras neuronas o células musculares. Las neuronas son las encargadas de transmitir el impulso nervioso mediante la liberación de neurotransmisores en la sinapsis, los cuales se unen a receptores específicos en la neurona siguiente permitiendo la transmisión de la señal. (Per Brodal, 2010).

Las células gliales constituyen aproximadamente la mitad de las células nerviosas del SNC. De manera general, se clasifican en microglía, que son células implicadas en la respuesta inmune, y en macroglía, formada por oligodendrocitos que son responsables de la formación de la vaina de mielina del axón y de los astrocitos (Guillamón-Vivancos y col., 2015). Estos últimos, a los que primeramente se le atribuyó una acción única de soporte, participan en numerosos procesos esenciales como la homeostasis de iones y agua, la defensa frente al estrés oxidativo, la biogénesis mitocondrial, la plasticidad neuronal, la reparación tisular vía neurogénesis, la supervivencia neuronal, la formación de la barrera hematoencefálica y la formación y eliminación de las sinapsis (Kim y col., 2019; Domingues y col., 2016) (**Figura 1**).

Formando parte del SNC, también se encuentran las células endocelulares que son células epiteliales presentes en la superficie de los ventrículos del cerebro y en la médula espinal y que participan en la homeostasis del líquido cefalorraquídeo (LCR) (MacDonals y col., 2021). Por último, dentro de las células gliales, la glía radial desempeña funciones esenciales en el desarrollo

del sistema nervioso, actuando como precursora de neuronas y otras células gliales (Campbell y Gotz, 2002).

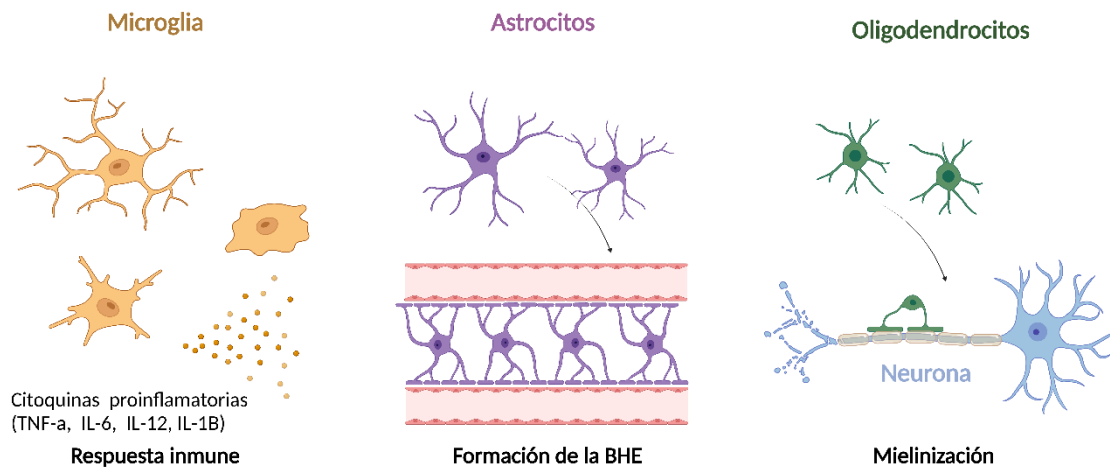


Figura 1. Unidades celulares principales del Sistema Nervioso Central y sus funciones. (Imagen creada con Biorender.com)

Definir las funciones del sistema nervioso es una tarea compleja. El sistema nervioso es el responsable de coordinar la mayoría de las funciones corporales y vitales. Desde la recepción, procesamiento e integración de la información sensorial con la consecuente respuesta motora coordinada hasta la regulación de funciones corporales involuntarias como la respiración, la frecuencia cardíaca, los ritmos circadianos o la postura corporal. Además, es el encargado de regular el sistema endocrino. Entre sus funciones cabe también destacar el control de las funciones mentales como la memoria, el aprendizaje y el estado de ánimo, así como la adaptación y la respuesta al daño (Ludwing y col., 2022).

Por todo ello, las enfermedades que afectan al sistema nervioso tienen efectos devastadores en los pacientes y, debido a la complejidad de los procesos involucrados, encontrar tratamientos efectivos es un desafío para la ciencia.

1.1.2 Barrera hematoencefálica

Las neuronas son células sensibles a diversas sustancias y a leves cambios en la concentración, por lo que cualquier desequilibrio químico puede alterar el correcto funcionamiento del SNC (Tajes y col., 2014). Por otro lado, el cerebro es uno de los órganos más activos a nivel metabólico y requiere de un aporte de oxígeno y nutrientes elevado y constante (Rink y Khanna, 2011). En este contexto, la necesidad de una barrera física y bioquímica encargada de controlar la entrada de nutrientes y evitar el paso de tóxicos y patógenos es

necesaria. Esta estructura altamente selectiva recibe el nombre de barrera hematoencefálica (BHE) y separa el tejido cerebral de la circulación sanguínea (Abbot y col., 2010).

La BHE está formada fundamentalmente por células endoteliales especializadas, astrocitos, pericitos y neuronas. Las células endoteliales presentan características diferenciales a otras células endoteliales del organismo lo que determina una permeabilidad limitada en ambos sentidos. Entre estas características se incluyen un menor número de vesículas endocíticas, un mayor número de mitocondrias, la expresión de uniones estrechas y adherentes y la presencia de transportadores especializados (Tajes y col., 2014).

Las uniones estrechas constituyen el primer obstáculo en el transporte de sustancias y están formadas esencialmente por tres proteínas transmembrana denominadas claudina, ocludina y las moléculas de adhesión intercelular (MAI), así como por una serie de proteínas citoplasmáticas como zonula occludens (ZO)-1,-2,-3 y cingulina, encargadas de conectar las proteínas transmembrana con la actina del citoesqueleto (Kadry y col., 2020).

La claudina constituye la principal proteína de la unión estrecha (Chiba y col., 2008). Consta de cuatro dominios transmembrana, dos bucles extracelulares y dos dominios intracelulares, uno amino terminal de pequeño tamaño y otro carboxilo terminal. El primer bucle extracelular es esencial para las propiedades de sellado de las uniones (Green y col., 2019). En el cerebro, la claudina 5 es la dominante y la descrita como factor clave. También se ha reportado expresión de claudina -1,-3 y -12 (Jia y col., 2013a).

A nivel estructural la ocludina presenta cinco dominios, entre ellos dos bucles extracelulares, un bucle intracelular y sus terminales carboxilo y amino orientados hacia el citoplasma (y unidos a ZO-1, ZO-2 y éstos a la actina). Los bucles extracelulares se relacionan con la regulación de la permeabilidad paracelular entre células adyacentes (Yuan y col., 2020).

Las moléculas de adhesión intercelular pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y entre ellas destacan MAI-1, MAI-2 y MAI-3. Presentan un único dominio transmembrana y una cola citoplasmática que contiene dominios de unión a proteínas, posiblemente relacionados con la transducción de señales (Jia y col., 2013b).

Por otro lado, se encuentran las uniones adherentes situadas bajo las uniones estrechas. En este caso, las cadherinas (proteínas transmembrana) y las cateninas (proteínas citoplasmáticas) adoptan una organización similar a la presente en las uniones estrechas (Stamatovic y col., 2016). Aunque en ambas uniones existe una asociación con la actina del citoesqueleto, en este caso mediada por las cateninas, las funciones que desempeñan son diferentes. Las uniones adherentes

son las encargadas de iniciar el contacto célula-célula y el mantenimiento de este. Entre la familia de las cadherinas destaca la E-cadherina que inicia estos contactos intercelulares. A su vez, se unen a las cateninas p120-catenina, β -catenina y α -catenina regulando de esta manera la organización de la actina del citoesqueleto, la estabilidad de las cadherinas y la señalización intracelular y la transcripción génica (Harstsock y Nelson, 2008).

Finalmente, a nivel de las células endoteliales, es necesario comentar la existencia de las uniones gap, constituidas por proteínas de la familia conexina (Cx). A nivel cerebral se expresan Cx37, Cx40 y Cx43 y son esenciales en la comunicación intercelular y transducción de señales permitiendo el paso de iones y moléculas (Stamatovic y col., 2016).

Como se ha comentado anteriormente, en esta unidad neurovascular los astrocitos y los pericitos también juegan un papel esencial. Los astrocitos participan en la formación y mantenimiento de la BHE. Diversos estudios correlacionan la presencia de astrocitos con la formación de uniones estrechas más fuertes (Dehouck y col., 1990; Isobe y col., 1996) y con la expresión de transportadores fundamentales como la glicoproteína-P (Abbot y col., 2016) o de moléculas especializadas como la acuoporina-4 que regula las concentraciones iónicas en la BHE (Cabezas y col., 2014). Por otro lado, los astrocitos se encargan de liberar factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y la angiopoyetina-1 (ANG-1) que son esenciales para la formación de las uniones estrechas.

Los pericitos también participan en la biogénesis y el mantenimiento de la integridad de la BHE mediante la regulación de la expresión de genes específicos en las células endoteliales y la inducción de la polarización de los astrocitos (Armulik y col., 2010). Se encuentran entre el parénquima cerebral y los vasos sanguíneos lo que les permite actuar como mediadores de la comunicación entre ambas células. Otra función esencial es la regulación del flujo sanguíneo cerebral en respuesta a la actividad neuronal (Mishra y col., 2016), evidenciada por la presencia de múltiples receptores de mediadores vasculares como la angiotensina I, la vasopresina y los péptidos intestinales vasoactivos, entre otros (Kadry y col., 2020). A su vez, diversos estudios destacan el papel de los pericitos en la respuesta inmune por su capacidad fagocítica y por su reciente interés como células madre multipotentes (Brown y col., 2019).

- *Tipos de transporte a través de la Barrera Hematoencefálica*

En situación fisiológica, la BHE presenta una permeabilidad restringida, permitiendo sólo el paso de nutrientes y de ciertos metabolitos e impidiendo la entrada de diversas sustancias tales

como moléculas tóxicas y citoquinas (Abbot y col., 2006). Esta robusta barrera también es la responsable del fracaso terapéutico de muchos de los candidatos a fármaco para el tratamiento de enfermedades del SNC al ser incapaces de alcanzar el parénquima cerebral

Más del 98% de los fármacos de pequeño tamaño y el 100% de las moléculas grandes, entre las que se encuentran los medicamentos biológicos, son incapaces de atravesar la BHE. Además, el progreso en el desarrollo de formulaciones que mejoren la penetración de estos fármacos es muy lento (Pardridge y col., 2020). Actualmente, una de las estrategias más prometedoras para superar estas limitaciones consiste en la incorporación de moléculas en nanopartículas y su posterior modificación y funcionalización para facilitar su paso a través de las células endoteliales de la BHE.

Dado que el transporte paracelular es limitado, existen diversos tipos de transporte transcelular, en su mayoría, sustrato-específicos (mediados por receptores, transportadores y bombas) que permiten seleccionar qué compuestos podrían atravesar la BHE (Abbot y col., 2006). Los mecanismos de transporte existentes, resumidos en la **Figura 2**, son los siguientes:

- ❖ **Transporte paracelular:** este transporte entre células constituye un tipo de transporte pasivo. Debido a la existencia de uniones estrechas, es considerado despreciable ya que sólo permite el paso de iones (Tang y Goodenough, 2003).
- ❖ **Transporte transcelular:** es el verdadero responsable del paso a través de la BHE. Este tipo de transporte, a través de la célula endotelial, se clasifica en:

-**Difusión pasiva:** este proceso basado en diferencias de concentración entre ambos lados de la membrana e independiente del gasto energético queda limitado a un pequeño número de moléculas. Su paso viene determinado por toda una serie de propiedades fisicoquímicas entre las que destaca su peso molecular, su lipofilia (expresada en términos de $\log P$), su área topológica de la superficie polar (TPSA), su potencial para unirse a iones de hidrógeno expresado mediante la presencia de enlaces hidrógeno (donadores y aceptores), el estado de su carga y la flexibilidad de su molécula (Mikitsh y Chacko, 2014).

La regla de Lipinski, denominada la regla de los cinco, establece como límites para que un compuesto sea capaz de atravesar la BHE por mecanismos de difusión pasiva que presente un peso molecular no superior a 500 Da, un $\log P \leq 5$, no más de 5 enlaces donadores de hidrógeno (-NH-, -OH) y no más de 10 enlaces aceptores de hidrógeno (-N=, -O-). Si el compuesto incumple dos o más criterios de la regla de Lipinski, la probabilidad de paso a través de la BHE por difusión pasiva es escasa. Es importante destacar que esta regla sigue sirviendo como criterio rápido para

clasificar a las moléculas. A pesar de ello, cumplir todos los criterios no implica una obligada difusión pasiva, ni se relaciona de manera directa con su paso a nivel cuantitativo, ya que sólo es válida para compuestos que no son sustratos de transportadores activos (Lipinski y col., 2001; Lipinski, 2000). De hecho, se ha comprobado de manera experimental que muchas de las moléculas que presentan estas características son incapaces de atravesar la BHE (Bodor y Buchwald, 2003).

Entre los fármacos que se ha visto que son capaces de atravesar la BHE por este mecanismo se encuentran los opioides o el diazepam que presentan pequeño tamaño y alta lipofilia (Puris y col., 2002). Las moléculas gaseosas como el O₂ y el CO₂ también difunden libremente a través de las membranas (Abbot y col., 2006). A pesar de ello, cabe destacar que muchas de las pequeñas moléculas lipófilas que consiguen difundir son expulsadas de vuelta a la sangre por medio de bombas de eflujo como la glicoproteína-P (Wang y col., 2019).

-Transporte mediado por proteínas. Este tipo de transporte está mediado por transportadores proteicos específicos presentes en la membrana luminal y/o abluminal; permiten el transporte unidireccional de entrada o salida de moléculas o el transporte bidireccional en función de gradiente. A su vez, pueden ser transportadores pasivos, independientes de energía como el transportador de glucosa GLUT-1 presente en ambas membranas (Devraj y col., 2011), o transportadores activos, que requieren energía para el transporte de sustancias en contra de gradiente. Según la naturaleza proteica del transportador podemos diferenciar entre:

-Transporte mediado por transportadores ABC: esta superfamilia de proteínas es una de las más extensas y antiguas. Está clasificada en 7 familias denominadas desde la letra A (ABC-A) a la letra G (ABC-G). Requieren de la hidrólisis de ATP para el transporte de sustratos, devolviendo en este caso a la circulación sanguínea múltiples moléculas que reconocen como corticoides, inmunosupresores, citostáticos o antidepresivos. La regulación de su expresión está mediada por mecanismos transcripcionales y postrcripcionales en respuesta a estímulos endógenos y exógenos como es el estrés oxidativo o la inflamación (Mahringer y Fricker y col., 2016). Entre las bombas de eflujo que predominan en la BHE destaca la glicoproteína-P (ABCB1), la proteína asociada a resistencia de cáncer de mama (BCRP(ABCB2)) y las proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos (MRPs/ ABCC) (Gosselet y col., 2021). Este tipo de transporte es el principal responsable de la protección del SNC frente a xenobióticos, pero a su vez, del fracaso terapéutico de muchas moléculas.

-Transporte mediado por transportadores de soluto (SLC): si bien las proteínas ABC median fundamentalmente el transporte de salida, serán los transportadores de soluto los principales

responsables de la captación de sustratos. En esta superfamilia de proteínas se han identificado canales y proteínas portadoras, de difusión facilitada, como el mencionado GLUT-1 o el transportador de aminoácidos LAT-1, involucrado en el transporte de fármacos como gabapentina, L-DOPA o metildopa (Morris y col., 2017). Asimismo, existen transportadores monocarboxilato del tipo MCT1, dependientes del cotransporte de protones, que son responsables del transporte de lactato, piruvato y cuerpos cetónicos o del tipo MCT8, independiente de protones y sodio, y que es el encargado del transporte de la hormona tiroidea (Vijay y Morris, 2014). A su vez, el transporte de nucleósidos como purinas y pirimidinas está mediado por transportadores de difusión facilitada del tipo ENT1 Y ENT2, mientras que la captación de hormonas tiroideas, prostaglandinas, esteroides y péptidos está mediada por transportadores de aniones orgánicos (ej. OATP1A2) independientes de sodio (Schafer y col., 2021). Finalmente, hay también transportadores de cationes orgánicos (OCT) implicados en la entrada de neurotransmisores tipo monoamina (Koepsell, 2021).

-Transcitosis: tipo de transporte transcelular mediado por vesículas utilizado por moléculas de elevado peso molecular para atravesar la BHE. El proceso consiste en una primera endocitosis o internalización vesicular, el posterior transporte en el interior de la célula y finalmente la exocitosis (Ayloo y Gu, 2010). Este proceso puede ser selectivo, mediado por la unión específica de un ligando a su receptor, o no selectivo, basado en adsorción.

-Transcitosis mediada por receptor. En este caso, moléculas específicas se unen a su receptor en la cara luminal. Este tipo de transporte permite el reciclaje del receptor de la membrana abluminal a la luminal, siendo posible reiniciar el proceso de captación. Ejemplos de este tipo de transporte son el transporte de insulina mediado por el receptor de insulina (IR) o el receptor de la transferrina (Abbot, 2013; Tajés y col.,2014). Esta es la vía principal de entrada de macromoléculas a través de la barrera. Además, muchos de estos receptores han sido utilizados para incrementar el paso de fármacos al cerebro (Sharma y col., 2019).

-Transcitosis mediada por adsorción: en este caso, el mecanismo se inicia por medio de una interacción electrostática entre proteínas cargadas positivamente como las histonas y los sitios aniónicos de los grupos carboxilo de las glicoproteínas de la membrana plasmática de las células endoteliales (Hervé y col., 2008).

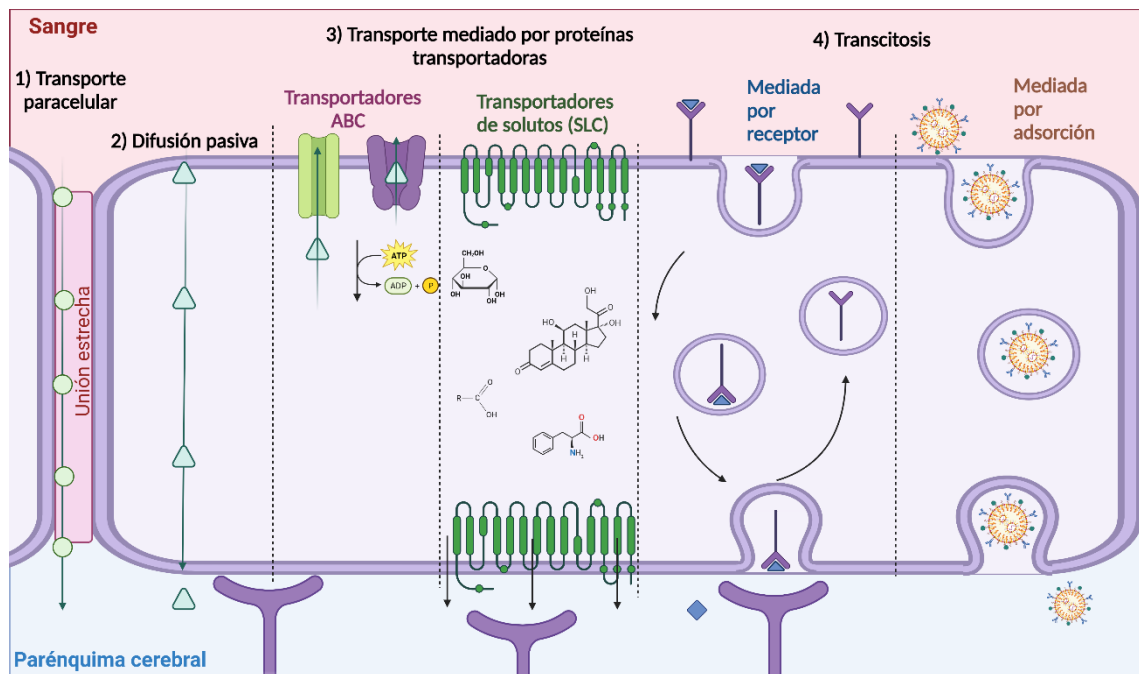


Figura 2. Tipos de transporte a través de la barrera hematoencefálica. (Imagen creada con BioRender.com)

1.2 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades debilitantes e incurables ocasionadas por la pérdida progresiva de aspectos estructurales y funcionales en las células nerviosas, llevando en último término, a su muerte celular. Entre los procesos degenerativos más comunes se incluyen la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Lin y Beal, 2006).

Son muchos los factores que inducen el proceso neurodegenerativo, siendo la edad el principal factor de riesgo. Las características más destacables del envejecimiento son la inestabilidad genómica, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de proteostasis y el desgaste de los telómeros como responsables. A éstas les siguen toda una serie de respuestas compensatorias que, mantenidas en el tiempo, se convertirán en responsables del proceso, como son la disfunción mitocondrial, la senescencia celular y la disregulación de la detección de los nutrientes. Todas ellas en su conjunto llevarán a deficiencias en las células madre y a alteraciones en la comunicación intercelular y, por consiguiente, a la pérdida funcional celular (Lopez-Otín, 2013). Las neuronas, al ser células postmitóticas, son más vulnerables a estos efectos (Hou y col., 2019).

Actualmente, los datos poblacionales muestran una aceleración global del envejecimiento, especialmente en el grupo de personas mayores de 65 años. La Revisión de las Perspectivas de Población Mundial realizada por Naciones Unidas prevé que el número de personas ≥ 80 años pase de 157 millones en 2020 a 459 millones en 2050 (2022 Revision of World Population Prospects, Naciones Unidas).

Estas cifras muestran una realidad futura compleja ya que con la inversión cada vez más acusada de la pirámide poblacional, los datos y proyecciones epidemiológicas de las principales enfermedades neurodegenerativas aumentan de forma exponencial. Se estima que en el mundo hay 152 millones de personas que sufren de EA u otro tipo de demencia, con una prevalencia de 51,62 cada 100.000 personas (Nichols y col., 2022). Asimismo, en los últimos 30 años ha habido un aumento de la incidencia y de la prevalencia en la EP con 8,5 millones de pacientes a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, 2022). En relación con la EH, los datos publicados son limitados y variables. Estudios recientes indican una prevalencia a nivel mundial de 4.88 casos entre 100.000 (Medina y col., 2022). Finalmente, en relación con la ELA, la incidencia en Europa y Estados Unidos se establece en 2,3 enfermos por cada 100.000 personas al año y una prevalencia variable de 5,2-6,3 por cada 100.000 habitantes (Shi y col., 2022). Cabe señalar que la variabilidad de las cifras existentes entre países puede deberse a las diferencias metodológicas relacionadas con la obtención de los datos.

Aunque las incidencias de estas dos últimas enfermedades (EH y ELA) son menores, la discapacidad progresiva e incluso total que generan, al igual que ocurre con la EA y la EP, tiene consecuencias físicas y psicológicas inestimables para el enfermo y los familiares además de consecuencias sociales, sanitarias y económicas para la sociedad en su conjunto, siendo necesaria una actuación integral.

1.2.1 Principales enfermedades neurodegenerativas

De acuerdo con el criterio seleccionado para clasificar las enfermedades neurodegenerativas, éstas se pueden agrupar según su clínica en demencias, enfermedad de la motoneurona o parkinsonismo, según la distribución anatómica de la afección, en desórdenes frontotemporales, extrapiramidales o espinocerebrales, y según sus características moleculares en amiloidosis, taupatías, α -sinucleinopatías y TDP-43 proteinopatías (Dugger y Dickson, 2017). Dada su relevancia ya comentada, cabe destacar las siguientes enfermedades:

La **enfermedad de Alzheimer** es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y la causa más común de demencia (50-70% de los casos) (Zhang y col., 2021). Esta enfermedad se

caracteriza inicialmente por causar pérdidas de memoria, confusión, desorientación temporal y espacial, problemas de comunicación al olvidar palabras o su significado, apatía, ansiedad, depresión e irritabilidad que progresarán hacia un grave deterioro de la memoria que impedirá al enfermo el normal desarrollo de su vida cotidiana (Atri y col., 2019). A nivel genético, el riesgo atribuible de presentar la EA se estima en un 70%. Podemos diferenciar diversos tipos. Por un lado, se encuentra la EA familiar autosómica dominante, generalmente de inicio temprano, causante de menos del 4 % de casos y originada por mutaciones en el gen de la presenilina 1, de la proteína precursora de amiloide o de la presenilina 2. Por otro lado, en la EA esporádica de inicio tardío se han identificado más de 20 genes que contribuyen al aumento del riesgo a padecerla. Entre estos se destaca el alelo E4 del gen que codifica para la apolipoproteína E (APOE- ϵ 4) (Loy y col., 2014; Bertram y col., 2007; Corder y col., 1993). En cuanto a los mecanismos implicados en esta enfermedad se incluyen la formación de agregados proteicos de diverso origen dando lugar a una proteinopatía mixta, la amiloidosis primaria por la presencia de agregados A β en forma de placas amiloides y la taupatía secundaria con la formación de ovillos neurofibrilares por hiperfosforilación de la proteína tau (Dugger y Dickson, 2017). La eliminación de estos agregados está mediada por la autofagia, proceso que se encuentra afectado en etapas tempranas de la EA (Li y col., 2017). Otro de los mecanismos implicados es la disfunción colinérgica, responsable de diversas demencias, y originada por el daño y pérdida de neuronas colinérgicas, así como la actividad reducida de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y la expresión reducida de la enzima colina acetil transferasa y del receptor de n-acetilcolina (nAChR) (Ferreira-Vieira y col., 2016). Asimismo, existe un desequilibrio a nivel de los neurotransmisores por alteraciones en neuronas noradrenérgicas, serotoninérgicas y glutamatérgicas (Leanza y col., 2018; Vakalopoulos, 2017; Wang y Reddy, 2017). Las respuestas del organismo frente a la presencia de estos agregados progresan hacia una activación persistente y dañina de la respuesta inflamatoria y del estrés oxidativo (Kinney y col., 2018; Liu y col., 2017). Actualmente, los únicos fármacos comerciales disponibles indicados para el tratamiento de la EA son los fármacos inhibidores de la enzima colinesterasa (donepezilo, galantamina y rivastigmina) y un fármaco antagonista de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), la memantina (Doroszkiewicz y Mroczko, 2022). Los ensayos clínicos actuales están dirigidos a actuar sobre los mecanismos neuropatogénicos comentados previamente. Así, se incluyen inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, agonistas y antagonistas de los receptores de neurotransmisores, inhibidores de la enzima β -secretasa (BACE) o de la enzima γ -secretasa, vacunas o anticuerpos dirigidos contra la eliminación de A β o la proteína tau y compuestos antiinflamatorios (Hung y Fu, 2017). En el año 2021 y 2023, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) aprobó los fármacos

aducanumab y lecanemab, respectivamente, ambos anticuerpos monoclonales que actúan eliminando las placas amiloides. El fármaco aducanumab no fue aprobado por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) por falta de balance beneficio/riesgo (EMA EMA/112932/2022.). El fármaco lecanemab se encuentra en proceso de revisión actual.

La **enfermedad de Parkinson** es una enfermedad neurodegenerativa compleja y heterogénea. En su descripción inicial, los síntomas clásicos eran motores, propios del parkinsonismo, caracterizados por bradicinesia, rigidez muscular, temblores, disfagia y alteraciones posturales (Lotankar y col., 2017). Actualmente, también se reconocen síntomas no motores como parte de la clínica de esta enfermedad, incluyéndose desórdenes del sueño, dolor, disfunción del sistema autónomo, síntomas psiquiátricos y deterioro cognitivo. Estos síntomas suelen ser de aparición anterior a los síntomas motores (Khoo y col., 2013). Entre los factores de riesgo en la EP destaca la interacción entre factores ambientales como la exposición a pesticidas o un traumatismo craneoencefálico previo y, factores genéticos autosómicos dominantes como el gen *SNCA* que codifica para la α -sinucleína y mutaciones en el gen *LRRK2* o en genes recesivos como *Parkin* o *PINK1* (Corti y col., 2011). Las características principales de la patogenia de esta enfermedad son la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, la presencia de cuerpos y neuritas de Lewy y los agregados proteicos de α -sinucleína que forman inclusiones intracelulares. En las últimas décadas, se ha observado una afectación neuronal en otras muchas regiones del sistema nervioso como la médula espinal y el sistema nervioso periférico. También se han identificado interacciones entre otras proteínas como tau y $A\beta$ que podrían actuar de manera sinérgica con los cuerpos de Lewy. Además de la agregación proteica, la vía de la ubiquitina proteosoma y de la autofagia se encuentran alteradas, así como la función mitocondrial (Kalia y Lang, 2015). Al igual que ocurre con la EA, en la EP, los procesos neuroinflamatorios y el estrés oxidativo se encuentran aumentados principalmente por la disfunción mitocondrial (Teleanu y col., 2022). Hoy en día, no existe tratamiento curativo para la EP siendo las opciones terapéuticas disponibles de tipo sintomático. Así, para los síntomas motores se utiliza levodopa, agonistas dopaminérgicos, inhibidores de la monoamino oxidasa B, o de la enzima catecol O-metiltransferasa y fármacos anticolinérgicos. Para los síntomas no motores como los antipsicóticos, los antidepresivos o los psicótropos, se emplean fármacos directamente enfocados al síntoma que presente el paciente (Kalia y Lang, 2015). Cabe destacar el buen resultado de los tratamientos quirúrgicos como la estimulación cerebral profunda (Kalta y col., 2013).

La **esclerosis lateral amiotrófica** es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la degeneración de las neuronas motoras tanto superiores (del córtex cerebral a la médula espinal)

como inferiores (de la médula a músculos y glándulas) (Hardiman y col., 2017). A nivel genético se han identificado más de 20 genes asociados con esta enfermedad, entre los que se encuentran mutaciones en la proteína superóxido dismutasa 1 (*SOD1*), en la proteína de unión a ADN TAR 43 (*TARDBP*), en la proteína fusionada en sarcoma (*FUS*) y en la quinasa de unión a TANK 1 (*TBK1*) así como expansiones de hexanucleótidos en el cromosoma nueve. Estas alteraciones sólo explican el 15% de los enfermos con ELA (Masrori y Van Damme, 2020). Además, en el 97% de los casos se han encontrado en el citoplasma de las neuronas agregados de la proteína nuclear de unión a ARN TDP43, implicada en el transporte entre el núcleo y el citoplasma. Asimismo, se ha visto que la hiperactivación glutamatérgica, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la alteración del proceso autofágico, la neuroinflamación mediada por la activación anómala del sistema del complemento, la activación de cascadas apoptóticas, el daño en el ADN y ARN, alteraciones en la integridad del citoesqueleto y el transporte axonal participan en el proceso patogénico de esta compleja enfermedad (Chiò y col., 2020). A nivel clínico, los síntomas varían según sea el inicio de la enfermedad con problemas de habla y dificultad al tragar en inicio bulbar y con debilidad muscular que avanza hasta la parálisis en inicio lumbico. Los pacientes con daños en las motoneuronas superiores sufren espasticidad y reflejos enérgicos mientras que los que presentan daño en las neuronas inferiores sufren de fasciculaciones y atrofia muscular. También se dan casos de insuficiencia respiratoria, pérdida de peso y alteraciones cognitivas (Kiernan y col., 2021). Para esta enfermedad actualmente tampoco existe tratamiento curativo, tan solo sintomático, como el riluzol (benzotiazol). Actualmente, hay varias líneas de investigación activas para identificar nuevos tratamientos (más de 40 fármacos en estudio) y diversos ensayos clínicos en fase 1 y en fase 2 basados en el uso de células madre mesenquimales y neurales (Chiò y col., 2020).

La **enfermedad de Huntington** es una enfermedad autosómica dominante causada por un defecto genético (expansión repetida de CAG) en el primer exón del gen *HTT*, presente en el cromosoma 4. Este gen codifica la proteína huntingtina, siendo tóxica en su forma mutante. Su acumulación en las células nerviosas causa pérdida funcional y muerte neuronal. Este daño celular se relaciona con la propia toxicidad de la proteína y con la interrupción de otros procesos como la proteostasis, la transcripción y la función mitocondrial (Tabrizi y col., 2022; McColgan y Tabrizi, 2018). A nivel clínico, los síntomas se engloban en síntomas motores (movimientos oculares anormales, movimientos hipercinéticos e involuntarios en las primeras fases de la enfermedad que evolucionan a estados hipocinéticos y distónicos, así como disfagia), síntomas cognitivos (inicialmente con problemas de organización, concentración y decisión hasta un estado de demencia) y síntomas psiquiátricos (irritabilidad, impulsividad, cambios en la personalidad y

apatía) (Nopoulos, 2016). Actualmente no hay tratamientos modificadores de la enfermedad, sólo sintomáticos. Numerosos ensayos clínicos se encuentran activos, tanto con fármacos dirigidos a tratar los síntomas (a través de la modulación dopaminérgica, glutamatérgica y sináptica, modulación de los niveles de BDNF, regulación de la función y biogénesis mitocondrial e inhibición de la agregación proteica) así como con fármacos con efecto potencialmente modificador (modificación genética mediante oligonucleótidos antisentido) (Kim y col., 2021).

1.2.2 Mecanismos patogénicos

Si bien cada una de las enfermedades mencionadas presenta orígenes y características moleculares diferentes, en todas ellas podemos encontrar puntos en común. A nivel clínico, los síntomas son devastadores e incapacitantes, no existiendo, como ya se ha comentado, tratamientos modificadores de la enfermedad, sólo sintomáticos. A nivel celular, son numerosos los mecanismos moleculares y las vías de señalización que se encuentran alteradas (Dugger y Dickson, 2017).

Entre los mecanismos que contribuyen en estos procesos neurodegenerativos se encuentran:

- Agregación anómala de proteínas
- Estrés oxidativo
- Disfunción mitocondrial
- Alteración de la homeostasis de proteínas
- Alteración los procesos autofágico y ubiquitin proteosomal
- Neuroinflamación
- Muerte celular programada, también conocida como apoptosis
- Disfunción sináptica y del transporte axonal
- Desequilibrio de neurotransmisores
- Disfunción y muerte neuronal

1.3. Neuroprotección en enfermedades neurodegenerativas: enfoque en la etiología del daño y las dianas terapéuticas

1.3.1. Estrés oxidativo y estrategias neuroprotectoras frente al daño oxidativo

1.3.1.1 Radicales libres e Intermediarios Reactivos de Oxígeno y Nitrógeno

Los radicales libres (RL) son moléculas con uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Esta estructura les confiere inestabilidad y alta reactividad reaccionando con otras

moléculas, bien como oxidantes o reductores (Lobo y col., 2010). Asimismo, existen especies intermediarias no radicales altamente reactivas. Entre los que presentan oxígeno en su estructura, conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROS), se encuentran los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), anión superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxilo ($\cdot\text{OOR}$) y los no radicales, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperóxido orgánico (ROOH) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Por otro lado, entre las especies reactivas de nitrógeno (ERNS) se encuentran los radicales óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$) y los no radicales como peroxinitrito (ONOOH) (Phaniendra y col., 2015).

Estas moléculas reaccionan con moléculas no radicales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos iniciando reacciones en cadena a través de las cuales se forman nuevos radicales libres (Betteridge, 2000).

1.3.1.2 Fuentes de especies reactivas de oxígeno endógenas y exógenas

La producción de EROS ocurre de manera fisiológica en el organismo durante los procesos metabólicos. Las fuentes más importantes son la mitocondria (a través de la cadena de transporte de electrones) y las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) mediante las NADPH oxidasas. Otras fuentes responsables de la generación de EROS son en menor medida, el retículo endoplasmático y los peroxisomas.

A nivel mitocondrial, destacan:

❖ Cadena de transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa

La respiración celular juega un papel esencial en la producción de EROS. Este proceso se basa en la reducción del oxígeno para la formación de enlaces fosfato generando adenosina trifosfato (ATP). Esta molécula es la principal fuente de energía. Por cada molécula de glucosa se generan aproximadamente 32 moléculas de ATP, consumidas en diversos procesos como el transporte activo, la transmisión del impulso nervioso, la contracción muscular, la señalización celular y la síntesis de ADN y ARN. (Dunn, 2023)

La formación de esta molécula tiene lugar en la última fase de la respiración celular, la denominada fosforilación oxidativa (OXPHOS). En esta fase, los transportadores de electrones de alta energía, NADH Y FADH₂ formados durante la glicólisis y el ciclo de Krebs, transfieren los electrones a la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Esta cadena de transporte compuesta por cuatro complejos proteicos (I, II, III y IV), la coenzima Q y el citocromo C, será responsable de la formación del gradiente electroquímico mediante el transporte de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (cuatro protones por cada par de

electrones). En el complejo IV, dos de estos protones reaccionan con el O_2 para formar H_2O . La entrada de protones de vuelta a la matriz mitocondrial tendrá lugar a través del complejo V o ATP sintasa generando ATP (Cooper, 2000; Andreyev y col., 2005)

Esta reducción se produce de manera secuencial, ya que el oxígeno acepta cada vez uno de los electrones, formándose intermediarios parcialmente reducidos como el anión superóxido.

❖ Desaminación oxidativa mediada por monoamino oxidasas (MAO)

Asimismo, entre las fuentes productoras de EROS, se incluyen a las monoamino oxidasas (MAO-A y MAO-B), de especial relevancia a nivel del sistema nervioso. Las enzimas MAO se localizan en la cara externa de la membrana mitocondrial y se encargan de la desaminación oxidativa de neurotransmisores y de aminas de la dieta. Mientras que la enzima MAO-A cataliza la desaminación de la noradrenalina y la serotonina, la enzima MAO-B actúa sobre la bencilamina y la feniletilamina. Ambas isoformas actúan sobre la dopamina, la triptamina y la tiramina. Estas reacciones finalizan con la formación de aldehídos, amoníaco y peróxido de hidrógeno (Di Lisa y col., 2009). Esta producción de H_2O_2 es mayor a nivel cerebral que la que se produce a través de la cadena de transporte mitocondrial (Cadenas y col., 2000).

A nivel exógeno las fuentes productoras de radicales libre, entre ellas, el humo del tabaco, el ozono, los contaminantes atmosféricos o los químicos industriales (Lobo y col., 2010).

Las especies H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ formadas darán lugar a los diferentes radicales previamente mencionados. Por ejemplo, el radical $O_2^{\cdot-}$ reaccionará con radicales NO^{\cdot} (cuya fuente es la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)) dando lugar a $ONOO^{\cdot}$. Asimismo, el radical superóxido por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) formará H_2O_2 . (Poprac y col., 2017). El peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición como hierro y cobre se descompone, formándose radicales hidroxilos que son los principales responsables del daño sobre el ADN. Esta reacción recibe el nombre de reacción de Fenton (Winterbourn, 1995).

1.3.1.3. Sistemas y mecanismos antioxidantes

Para contrarrestar los efectos perjudiciales que supone la acumulación de EROS, las células han desarrollado mecanismos moleculares para hacer frente a los mismos. Estos reciben el nombre de sistemas antioxidantes. En el año 1989, se definió antioxidante como “aquella sustancia que encontrándose a concentraciones más bajas respecto a la de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato” (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Los antioxidantes pueden actuar a niveles: (i) previniendo la formación de radicales libres actuando sobre los intermediarios reactivos. Por ejemplo, reduciendo la formación de hidroperóxidos por acción de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT); (ii) eliminando radicales libres mediante la captación de los mismos (“*radical scavenger*”) o actuando como quelantes de metales. Las moléculas que actúan a través de estos mecanismos participan en las etapas de iniciación o propagación de la cadena de reacciones. Como ejemplo de *radical scavenger* son la vitamina C y la vitamina E; (iii) mediante la eliminación de biomoléculas oxidadas, previniendo del daño oxidativo. Por ejemplo, por acción de las enzimas proteolíticas o nucleasas (Lobo y col., 2010).

En términos generales, se pueden clasificar en dos categorías: antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos. Entre los antioxidantes enzimáticos se encuentran la metaloenzima **SOD** que cataliza la reacción $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (Halliwell, 1992). Dependiendo de sus cofactores metálicos existen tres tipos de enzima SOD: la Cu/Zn-SOD, la Mn-SOD y la Fe-SOD. Por otro lado, atendiendo a su localización celular, estas isoformas se clasifican en enzima SOD-1 del tipo Cu/Zn-SOD, de localización citoplasmática, la enzima Mn-SOD o SOD2, presente en la matriz mitocondrial y estrechamente relacionada con el estrés oxidativo y esencial en su respuesta a EROS, y la enzima extracelular EC-SOD o SOD-3 del tipo Cu/Zn (Perry y col., 2010). Estas enzimas además de catalizar la conversión del radical anión $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , inhiben la inactivación oxidativa del óxido nítrico, reduciendo la formación de peroxinitritos. (Fukai y Ushio Fukai, 2011).

Otro de los antioxidantes enzimáticos de especial relevancia es la enzima **CAT**. Esta enzima tetramérica, con un grupo hemo en cada monómero, es la encargada de degradar el H_2O_2 en H_2O y O_2 (Birben y col., 2012). Durante esta reacción se forma un intermediario de hierro hipervalente (compuesto I), que es reducido de nuevo por una segunda molécula de H_2O_2 , siendo el resultado final $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. La enzima CAT se localiza predominantemente en los peroxisomas. A nivel tisular, se expresa en mayor medida a nivel hepático, en eritrocitos y en riñón (Glorieux y Calderon, 2017), siendo menor su proporción en el cerebro (Naziroglu, 2011).

De manera cooperativa con la enzima catalasa, la detoxificación del H_2O_2 e hidroperóxidos (producto de la peroxidación lipídica) es llevada a cabo por la familia de enzimas **GPx**. Estas enzimas utilizan el GSH como sustrato donador de electrones y la reacción que catalizan es $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$ / $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$ (Arthur, 2000; Baud y col., 2004). El mecanismo de acción implica la oxidación del aminoácido selenocisteína, dando lugar a un derivado con un grupo ácido selenénico (RSeOH), que será reducido de nuevo en dos pasos por

dos moléculas de GSH, a través de la formación de un intermediario selenodisulfuro mixto (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013). En el cerebro, existen cuatro isoenzimas selenio dependientes: la enzima GPx1 clásica, presente en todos los tejidos y muy eficiente en la reducción del H₂O₂; la enzima GPx2 gastrointestinal, responsable de la reducción de peróxidos consumidos en la dieta; la enzima GPx3 plasmática que es una isoenzima extracelular, y la enzima fosfolípido hidroperóxido GPX (PHGPx4). Las tres primeras enzimas son homotetrámicas y la última enzima es monomérica (Margis y col., 2008; Lobo y col., 2010; Birben y col., 2012). El pequeño tamaño de esta última enzima le permite reaccionar con lípidos complejos de membrana (Jurkovic y col., 2008). Las enzimas GSH-Px se encuentran predominantemente en el citoplasma y en menor proporción en la mitocondria (Tossato y col., 2008).

La enzima GPx forma parte del sistema glutatión, esencial en la respuesta frente al estrés oxidativo. Formando parte de este sistema se encuentran toda una serie de enzimas implicadas en el metabolismo del glutatión como son la enzima glutatión reductasa (**GR**) y la enzima glutatión S-transferasa (**GST**).

Las enzimas GST son proteínas diméricas que median la detoxificación de compuestos xenobióticos a través de la conjugación de una molécula de glutatión con sus centros electrófilos (Salinas y Wong, 1999). Existen enzimas GST citosólicas, mitocondriales y microsomales, siendo predominantes las formas citosólicas a nivel cerebral. Se han identificado siete tipos de enzimas GST denominadas como Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega y Zeta. En el cerebro, la enzima GST Mu es la que más se expresa seguida de las enzimas Pi y Alpha. Estas enzimas participan en la homeostasis redox; en periodos libres de estrés oxidativo, la enzima GST se une a JNK en su forma monomérica, mientras que, ante un aumento de los niveles de RL, esta enzima se dimeriza e interacciona con GSH reduciendo el estrés oxidativo (Smeyne y Smeyne, 2013).

Por otro lado, la enzima GR es una oxidorreductasa dependiente de la coenzima FAD, como grupo prostético y de una molécula de NADPH como cofactor para la reducción. La reacción que cataliza es $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$. (Fagan y Palfey, 2010). Esta enzima GR es la responsable del reciclaje del glutatión oxidado (GSSG), que se forma durante el proceso de detoxificación, y se recupera en su forma reducida y activa conocida GSH (Couto y col., 2016).

Junto al sistema glutatión antioxidante, el sistema tiorredoxina se presenta como uno de los principales sistemas antioxidantes del organismo. Está constituido por NADPH, tiorredoxina reductasa (TrxR) y tiorredoxina (Trx). La Trx es una pequeña oxidorreductasa que cataliza la reducción de proteínas como las peroxidasas o las ribonucleótido reductasas a través de la

donación de electrones por la presencia de un grupo tiol-disulfuro en el aminoácido cisteína. Asimismo, TrxR actúa, al igual que la GR, para recuperar la Trx reducida (Lu y Holmgren, 2014).

Finalmente, a nivel enzimático, es importante mencionar el papel de la **hemooxigenasa** (HO). Esta enzima, a diferencia de las enzimas SOD, CAT o GPx, no actúa directamente sobre las EROS, sino que está relacionada con el incremento de la resistencia celular frente al daño oxidativo. (Dennerly, 2000). La HO cataliza la degradación del grupo hemo, dando lugar a CO, Fe²⁺ y biliverdina. Esta última es reducida a bilirrubina por la biliverdina reductasa (Ryter y col., 2002). La enzima HO presenta dos isoformas HO-1 y HO-2. La enzima HO-1 es inducible en situación de estrés oxidativo, mientras que la enzima HO-2 es constitutiva (Leffler y col., 2006). Estímulos inductores de estrés oxidativo activan la transcripción del gen que codifica para la enzima HO-1 a través de la activación de factores transcripcionales como AP-1, AP-2, NF-κB o Nrf2. Diversos estudios reportan el papel neuroprotector de la sobreexpresión de la enzima HO-1 inducida por diversos compuestos (Orozco- Ibarra y Pedraza- Chavarri, 2010).

Entre los antioxidantes de tipo no enzimático se incluyen antioxidantes exógenos como vitamina C (ácido ascórbico) o vitamina E (α -tocoferol) y antioxidantes endógenos como melatonina, coenzima Q, ácido úrico, bilirrubina, biliverdina y el más importante y ya mencionado, GSH.

A nivel endógeno el **GSH** es la principal molécula antioxidante presente en el citoplasma de las células, y de especial relevancia en el mantenimiento de la homeostasis redox en neuronas. A diferencia de otros tejidos, en el cerebro los niveles de GSH son menores, y su depleción está relacionada con la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas (Aoyama, 2022). Su acción se atribuye a la presencia de residuos tiol de la cisteína que compone este tripéptido (glutamato, cisteína y glicina) (Forman y col., 2009). Como se ha explicado anteriormente, esta molécula ejerce su acción antioxidante actuando en procesos de detoxificación mediados por las enzimas GPx y GST (Birben y col., 2012). Además, participa en el reciclaje de los radicales formados por otros antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas C y E, recuperando sus formas activas (Forman y col., 2009).

El **ácido úrico** es uno de los responsables de la respuesta antioxidante a nivel plasmático. Actúa como captador de radicales libres como ¹O₂, •OH y •OOR, formados durante la autooxidación de la hemoglobina o la formación de peróxidos por los macrófagos (Pisoschi y Pop, 2015). La **melatonina** (N-acetil-5-metoxitriptamina) es sintetizada en la glándula pineal. Tiene efectos directos sobre los RL como O₂•, •OH y NO•. Además, se han reportado acciones indirectas al aumentar la actividad de enzimas antioxidantes, la síntesis de glutatión o la protección frente

al daño en la cadena de transporte mitocondrial (Reiter y col., 2003; Pisoschi y Pop, 2015; Reiter y col., 2016). La melatonina no se recupera tras su acción reductora, sino que forma una serie de productos estables y se comporta como un antioxidante terminal (Tan y col., 2000). La **coenzima Q10** es una molécula constituida por un anillo benzoquinona y una cadena lipófila conformada por 10 unidades de isopreno. Está presente en todos los tejidos y células, destacando su localización en la membrana interna mitocondrial en su forma reducida y oxidada (ubiquinol/ubiquinona) (Bentinger y col., 2007). Participan en el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), permitiendo el transporte de electrones entre los complejos proteicos I y II, favoreciendo la formación del gradiente de protones. (Crane y col., 2001). Estas propiedades le confieren la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica en las etapas de iniciación y propagación. En este proceso, la célula es capaz de regenerar de manera cíclica la forma reducida gracias a la enzima NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (NQO1) (Bentinger y col., 2007; Sifuentes-Franco y col., 2022). Por otro lado, la **bilirrubina** y la **biliverdina** actúan directamente sobre RL como $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ y $\text{ONOO}\cdot$. Asimismo, inhiben la acción de las enzimas NADPH oxidasa y eNOS, fuentes de RL antes mencionadas (Jansen y col., 2012; Lanone y col., 2005).

Cabe mencionar la actividad antioxidante ejercida por las vitaminas C y E obtenidas mediante la dieta. La **vitamina E** es liposoluble e interfiere en la propagación de la peroxidación lipídica, actuando sobre los radicales $\cdot\text{OOR}$, a nivel de la membrana celular. Por otro lado, la **vitamina C** es hidrosoluble y actúa como donador de electrones, reduciendo RL a nivel intra y extracelular. Se encarga de reducir también los radicales formados de la vitamina E. Este proceso es mediado por el GSH (Forman y col., 2009; Padayatty y col., 2013; Birben y col., 2012).

1.3.1.4. Estrés oxidativo

Tanto las EROS como las ERNS juegan un papel dual en nuestro organismo. A nivel fisiológico, estas moléculas, a concentraciones bajas y moderadas, participan en procesos celulares importantes como la respuesta defensiva frente a patógenos, la regulación autofágica, la adaptación a situaciones de hipoxia o la diferenciación. Además, actúan como intermediarios de señalización en el estrés oxidativo e inducen la adaptación al mismo (Sena y Chandel, 2012). Sin embargo, niveles elevados de estas especies reactivas dan lugar a situaciones patogénicas, al actuar como mediadores del daño de diversas estructuras biológicas (Valko y col., 2007).

El organismo, a través de diversos mecanismos antioxidantes ya descritos, permite establecer un equilibrio entre la producción y la eliminación de estas especies reactivas (homeostasis redox). Por el contrario, el aumento excesivo de EROS y una respuesta deficiente o insuficiente de los mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos causa el denominado

estrés oxidativo. El estrés oxidativo está implicado en la patogenia de numerosas enfermedades como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y respiratorias, el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas, sujeto de estudio en la presente Tesis Doctoral (Panieri y Santoro, 2016; Dröge y Schipper, 2007).

1.3.1.4.1 Daño oxidativo a moléculas biológicas. Biomarcadores de estrés oxidativo

Como se ha mencionado anteriormente, la alta reactividad de los radicales libres e intermediarios reactivos de oxígeno les confiere la habilidad de atacar y reaccionar con las biomoléculas, induciendo su disfunción e interfiriendo en procesos vitales celulares. Esto recibe el nombre de **daño oxidativo**. Cada uno de los procesos afectados dará lugar a toda una serie de biomarcadores de estrés oxidativo, medibles y evaluables. Aunque las propias EROS y ERNS se puede medir, generalmente son inestables, muy reactivas y de vida media corta; esto explica el por qué los productos de la oxidación de biomoléculas se utilizan como biomarcadores (Dalle-Donne y col., 2016).

❖ Daño oxidativo frente a **proteínas**

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los RL (Radak y col., 2011). Las proteínas más vulnerables son aquellas que presentan aminoácidos azufrados como la cisteína y la metionina y los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, histidina y triptófano) (Berlett y Stadtman, 1997). El daño oxidativo puede producirse (i) por oxidación directa del esqueleto proteico, originando cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de la proteína; (ii) por oxidación de aminoácidos específicos como la cisteína dando lugar a radicales tioles que a su vez pueden reaccionar con otro tiol generando un disulfóxido o reaccionar con O₂ generando radicales peroxilo o (iii) por formación de enlaces cruzados de proteínas (Zhang y col., 2013). Entre los marcadores de estrés oxidativo se incluyen la nitrotirosina, la S-glutationilación de diversas proteínas como la hemoglobina, la actividad mieloperoxidasa y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y fosfolípidos (Ho y col., 2013).

Este proceso afecta a proteínas implicadas en múltiples procesos celulares como enzimas, receptores y transportadores de membrana, alterando su estabilidad, su actividad e interrumpiendo la transducción de señales (Lobo y col., 2010).

❖ Daño oxidativo frente a **ácidos nucleicos**

Las moléculas de ADN y ARN también son susceptibles al daño oxidativo. El principal radical responsable del daño es el radical hidroxilo. Entre los daños asociados a estas

biomoléculas se destacan la presencia de sitios apurínicos/apirimidínicos en el ADN, las purinas y pirimidinas oxidadas, y la roturas de una y/o dos cadenas del ADN. En el caso del ARN, al estar formado por una sola cadena, las bases se encuentran más desprotegidas y por tanto son más susceptibles al daño. La oxidación de la desoxiguanosina o la guanosina de los ácidos nucleicos por acción del radical hidroxilo culmina con la formación de los productos 8-oxodG u 8-oxoG, empleados como biomarcadores de daño oxidativo (Guo y col., 2017).

❖ Daño oxidativo frente a **lípidos**

Los lípidos se localizan fundamentalmente en las membranas celulares; el daño oxidativo altera las propiedades de estas membranas y debido a su naturaleza reactiva se promueve la formación de EROS (Gaschler y Stockwell, 2017).

Entre los procesos oxidativos que afectan a los lípidos se destaca la formación de oxisteroles como 7α -hidroperoxicolesterol, 7-ketocolesterol y $7\alpha/\beta$ -hidroxicolesterol; estos productos se utilizan como biomarcadores y están implicados en los procesos de apoptosis e inflamación (Arca y col., 2007). Además, se destaca el proceso de la peroxidación lipídica. Está mediado por el ataque de RL a los dobles enlaces carbono-carbono presentes en los lípidos, especialmente en los ácidos grasos polinsaturados (PUFAs), lo que resulta en la formación de radicales peroxilo e hidroperóxidos. Este proceso presenta tres fases: (i) iniciación, generando el radical lipídico ($L\cdot$) tras la abstracción de hidrógeno; (ii) propagación, formándose radical peroxilo ($LOO\cdot$) por acción del $L\cdot$ con el oxígeno. Este radical reinicia el proceso, continuando la reacción. Finalmente, (iii) la fase de terminación tiene lugar en presencia de una molécula antioxidante que dona un átomo de hidrógeno al radical $LOO\cdot$, que en su forma reactiva reacciona con otros RL formando productos no radicales (Ayala y col., 2014). Entre los marcadores de la peroxidación lipídica se incluyen los isoprostanos y el malondialdehído (MDA) (Ho y col., 2013).

Por otro lado, además del daño descrito en las principales biomoléculas, es de especial relevancia por su implicación en la neurodegeneración, la acción del estrés oxidativo a nivel de las **mitocondrias**. La mitocondria, presenta su propio ADN mitocondrial (mtDNA), que muta cuando hay una sobreproducción de EROS, dando lugar a la disfunción del orgánulo, afectando a la cadena de transporte mitocondrial y aumentando de manera cíclica la producción de EROS. Además, estas EROS atacan a los complejos I, II y III de la cadena respiratoria mitocondrial impidiendo la síntesis de ATP (Ghezzi y col., 2012). Asimismo, se altera la permeabilidad de la membrana interna de la mitocondria por la peroxidación lipídica de sus fosfolípidos y el daño oxidativo ocasionado en los transportadores y enzimas respiratorias (Guo y col., 2013). Otro de

los procesos afectados por la disfunción mitocondrial es la homeostasis del calcio. La membrana externa es permeable al calcio a través del canal aniónico voltaje dependiente (VDAC). Sin embargo, su paso a través de la membrana interna es más restringido y está mediado por los canales específicos de calcio mitocondrial uniporte (MCU). La alteración de la permeabilidad provoca un aumento de los niveles de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial lo que induce la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), liberándose Ca^{2+} , factores apoptóticos y EROS al citoplasma (Madreiter-Sokolowski y col., 2020). Esta desregulación de la homeostasis del calcio deriva en neurodegeneración y muerte celular (Guo y col., 2013).

1.3.1.4.2 Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas

En el proceso de neurodegeneración, el cerebro experimenta un desequilibrio progresivo de la homeostasis redox (Cobb y Cole, 2015). El estrés oxidativo se presenta como una característica común en diversas patologías neurodegenerativas, y aunque en la mayoría de los casos no es el desencadenante de la enfermedad, sí juega un papel importante en la progresión y empeoramiento de la misma (Teleanu y col., 2022).

En primer lugar, es importante destacar que el SNC es especialmente susceptible al estrés oxidativo por diversas causas, entre las que cabe destacar: (i) el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas, especialmente de ácido docosahexaenoico (DHA); (ii) el alto consumo de oxígeno (20% del consumo basal total); (iii) los elevados niveles de metales de transición como Fe^{2+} y Cu^{+} ; (iv) la autooxidación de neurotransmisores, especialmente los de tipo catecolamina como dopamina y adrenalina; (v) una respuesta antioxidante modesta dado el bajo contenido en mecanismos antioxidantes endógenos en comparación con otros tejidos; (vi) la presencia de enzimas monoamino oxidasas de neurotransmisores como la dopamina que aumentan los niveles de H_2O_2 ; (vii), el cerebro que es un órgano muy vulnerable al estrés oxidativo debido a los altos niveles de consumo de glucosa y (viii) la elevada fosforilación oxidativa mitocondrial para suplir la alta demanda energética (Cobley y col., 2018).

A continuación, se detalla el papel del estrés oxidativo en el desarrollo y progresión de las principales enfermedades neurodegenerativas EA, EP, EH y ELA:

En la **enfermedad del Alzheimer**, el estrés oxidativo juega un papel clave en la patogenia de la enfermedad. La disfunción mitocondrial, la neuroinflamación, la acumulación de agregados β -amiloide, la hiperfosforilación de la proteína tau o la acumulación de metales como el hierro están implicados en la formación de EROS, y en consecuencia en un daño oxidativo. A su vez, el estrés oxidativo contribuye sobre estos procesos, ya que altera la actividad de la enzima α -secreta

o acelera la polimerización de la proteína tau (Chen y Zhong, 2014). Asimismo, el estrés oxidativo está implicado en la disfunción sináptica (Tonnes y Trushina, 2017)

Las causas de la sobreproducción de EROS en la **enfermedad del Parkinson** están relacionadas con la disfunción mitocondrial, los niveles elevados de hierro y de calcio y la degradación de dopamina (Telenau y col., 2022). Asimismo, la acumulación de la proteína α -sinucleína está implicada en la desregulación del transportador de dopamina (DAT) y del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), ambos implicados en la protección frente a las EROS producidas por el metabolismo de la dopamina (Harrington y col., 1996). Cabe también destacar el papel de la neuroinflamación como fuente de EROS y ERNS por activación de la NADPH oxidasa, óxido nítrico inducible sintetasa o mieloperoxidasa en las células de la glía. Por otro lado, la acumulación de hierro con neuromelanina aumenta la producción de radicales libres en la sustancia negra (Percario y col., 2020). En pacientes con la EP se ha visto que el estrés oxidativo puede actuar bien como iniciador del daño y muerte celular ya que en estadios tempranos de la enfermedad los pacientes presentan elevados niveles de EROS, pero sin pérdida significativa de neuronas o bien como aceleradores de la muerte celular al aumentar la vulnerabilidad de las células al daño oxidativo (Trist y col., 2019).

Al igual que ocurre con las enfermedades previamente mencionadas, en la **enfermedad de Huntington** el papel primario o secundario que ejerce el estrés oxidativo no está claro. Por un lado, se sabe que la proteína mutante de huntingtina (mHtt) causa disfunción mitocondrial aumentando los niveles de producción de EROS (Lin y Beal, 2006). Además, el estrés oxidativo y el aumento en los niveles de mHtt bloquean la degradación de las mitocondrias dañadas por inactivación o bloqueo de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Liot y col., 2017). Por otro lado, se han reportado marcadores de estrés oxidativo como MDA, 8-oxodG y 3-nitrotirosina en pacientes asintomáticos con la EH, previo al desarrollo de los síntomas (Klepac et al., 2007).

Finalmente, en la **Esclerosis Lateral Amiotrófica**, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo contribuyen activamente al proceso de neurodegeneración. En este caso la evaluación de los marcadores tempranos de la enfermedad supone un hándicap, debido a la juventud de los pacientes enfermos y la reducida esperanza de vida. A pesar de ello se sabe que la mutación del gen *SOD-1* que codifica para la enzima superóxido dismutasa o la mutación del gen de TARDBP que codifica para la proteína TDP-43 están estrechamente relacionadas con el factor Nrf2 implicado en la respuesta antioxidante de la célula (Cunha-Oliveira, 2020).

1.3.1.5. Estrategias neuroprotectoras frente al estrés oxidativo

Durante el desarrollo de esta introducción, se ha establecido qué es el estrés oxidativo, qué respuesta da el organismo para defenderse del mismo, y qué papel desempeña en la patogenia de diferentes enfermedades neurodegenerativas. En la literatura científica se establecen diversos abordajes terapéuticos para revertir dicho daño oxidativo sobre las estructuras biológicas y por tanto para impedir la muerte celular y la progresión de la neurodegeneración. Entre los compuestos responsables de la actividad neuroprotectora se han identificado numerosos productos de origen natural que han sido investigados en diversos modelos y frente a distintas dianas biológicas. Se detallan a continuación los mecanismos neuroprotectores explorados en los **capítulos 4 y 5** del presente trabajo de Tesis Doctoral:

1.3.1.5.1 Inducción del sistema enzimático antioxidante

Como se ha comentado en el punto 1.3.1.3 de la Introducción, las células presentan una serie de mecanismos antioxidantes para hacer frente a la producción de EROS y mantener la homeostasis redox. Como respuesta adaptativa para la supervivencia celular, estos sistemas son inducibles. Así, ante determinados estímulos se desencadenan cascadas de señalización que regulan la transcripción y la expresión de genes relacionados. Los genes que codifican para las enzimas detoxificantes antes explicadas, se encuentran en una secuencia específica de unión denominada Elemento de Respuestas Antioxidante (ARE), entre los que se incluye NQO1, HO-1, Trxs, GST, GR, SOD1, GPx y otras enzimas de fase I, II y III (Lee y Johnson, 2004; Buendía y col., 2016).

El principal regulador de la expresión génica de ARE es el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). En condiciones fisiológicas el factor Nrf2 se localiza en el citoplasma y está secuestrado por la proteína represora Keap-1. Keap-1 en su forma homodimérica se une a Nrf2 formando el complejo Keap1-Nrf2, el cual se une mediante la proteína adaptadora Cullin3 al complejo funcional ubiquitin ligasa E3. La ubiquitinización de Nrf2 lleva a su degradación por el proteasoma 26S. En situaciones de estrés oxidativo, la oxidación de los residuos de cisteína presentes en Keap 1 induce la disociación del complejo y la liberación del factor Nrf2. Posteriormente, Nrf2 se transloca al núcleo gracias a las señales de localización nuclear (NLS) y las secuencias de exportación nuclear (NES). A nivel nuclear constituye un heterodímero con proteínas de pequeño tamaño denominadas Maf, uniéndose a la secuencia ARE e iniciando la transcripción. Asimismo, existen otros mecanismos de regulación del factor Nrf2 que afectan a las diferentes etapas del proceso, ya sea la traslocación, la activación de la transcripción o la degradación. Por ejemplo, las proteínas p62 o p21 se unen a Keap-1 impidiendo la unión del factor

Nrf2 o bien la inhibición de GSK3 β que impide la fosforilación de Nrf2, y en consecuencia su degradación (Buendía y col., 2016, Johnson y col., 2008, Ma, 2013) (Figura 3).

Existen otras vías implicadas en la respuesta al estrés oxidativo, de menor relevancia, como la vía del NF-Kb, la vía PI3K/AKT, la vía de la proteína quinasa c-Jun N terminal activada por mitógeno (JNKK) o la vía TrkB/CREB/BDNF (Bowie y O'Neill, 2000; Maeise y col., 2012; Shaukat y col., 2016; Hannan y col., 2020).

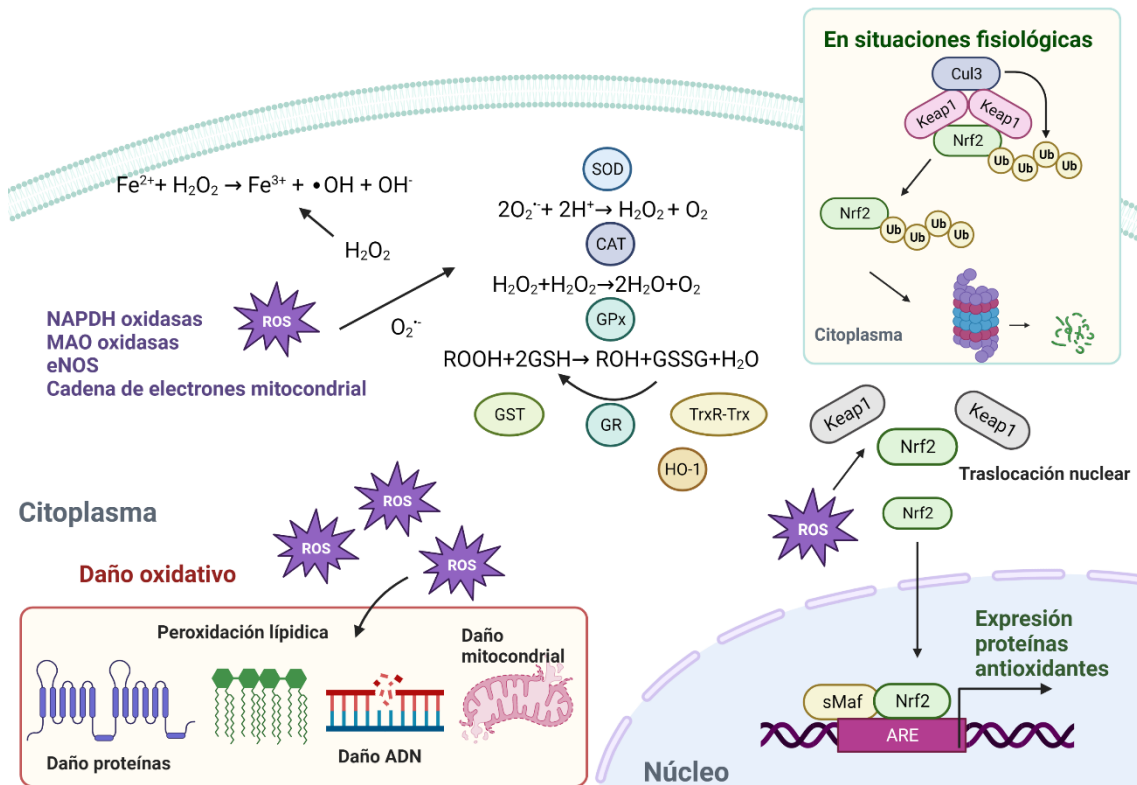


Figura 3. Estrés oxidativo y respuesta antioxidante endógena. Fuentes de EROS, daño oxidativo, sistema antioxidante enzimático y vía antioxidante Nrf2/ARE. (Imagen creada con BioRender.com).

La sobreexpresión de los diferentes mecanismos antioxidantes y la inducción de la vía Nrf2/ARE constituyen las principales estrategias neuroprotectoras investigadas en modelos *in vitro* e *in vivo* de neurodegeneración (Davis y Pennypacker, 2017; Hannan y col., 2020). En los últimos años, el papel de los productos de origen natural, y en especial, de los compuestos polifenólicos han sido estudiados en profundidad. Así, el flavonoide hesperidina ha demostrado prometedora actividad neuroprotectora en un modelo de la enfermedad de Alzheimer en ratones APP/PS1, reduciendo los niveles de estrés oxidativo mediante la sobreexpresión de las enzimas HO-1, SOD, CAT y GSH-Px, a través de la activación de la vía Nrf2 e inhibición de la vía del NF- κ B (Hong y An, 2018). En otro estudio, el resveratrol ha mostrado aumentar los niveles de SOD-1 y GSH en un modelo de citotoxicidad inducido por el péptido- β amiloide (1-42) en células PC12 por activación de la vía PI3K/Akt/Nrf2 (Hui y col., 2018). También, el ácido elágico, en modelos

de envejecimiento inducidos por D-galactosa en células SH-SY5Y, ha ejercido un efecto citoprotector aumentando los niveles de GSH e inhibiendo la producción de ROS, MDA y TNF- α (Rahimi, y col.,2018). Por último, el carvacrol ha demostrado proteger frente al cadmio en ratas Sprague Dawley, disminuyendo los niveles de MDA y aumentando significativamente los niveles de GSH y las actividades de las enzimas CAT, SOD Y GSH-Px en el tejido cerebral (Yildiz y col., 2022).

1.3.1.5.2 Disminución de la disfunción mitocondrial y mantenimiento de la homeostasis del calcio y del potencial de membrana

El calcio juega un papel esencial en las cascadas de transducción de señales y en procesos como la liberación de neurotransmisores. Los niveles de calcio citoplasmático se encuentran estrechamente regulados por numerosos transportadores y bombas (Mattson y col., 2006). El estrés oxidativo provoca el aumento de los niveles de calcio citoplasmático al favorecerse la liberación de calcio del retículo endoplasmático (orgánulo con mayor capacidad de almacenaje), promoverse la entrada de calcio extracelular e inhibirse la actividad de las bombas Ca²⁺ ATPasa de salida del calcio. El aumento de calcio citoplasmático incrementa el flujo de entrada de este ion en la mitocondria, alterando la función mitocondrial e induciendo la muerte celular. A nivel del núcleo, se activan factores de transcripción génica relacionados con la apoptosis (Ermak y Davies, 2002). Como se ha comentado en el apartado 1.3.1.4. de la Introducción, los niveles de calcio elevados en la matriz mitocondrial inducen la formación del mPTP que, mantenido en el tiempo, altera la presión osmótica de la matriz mitocondrial llevando a su ruptura y a la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo C (Madreiter-Sokolowski y col., 2020; Ryan y col., 2020) (**Figura 4**).

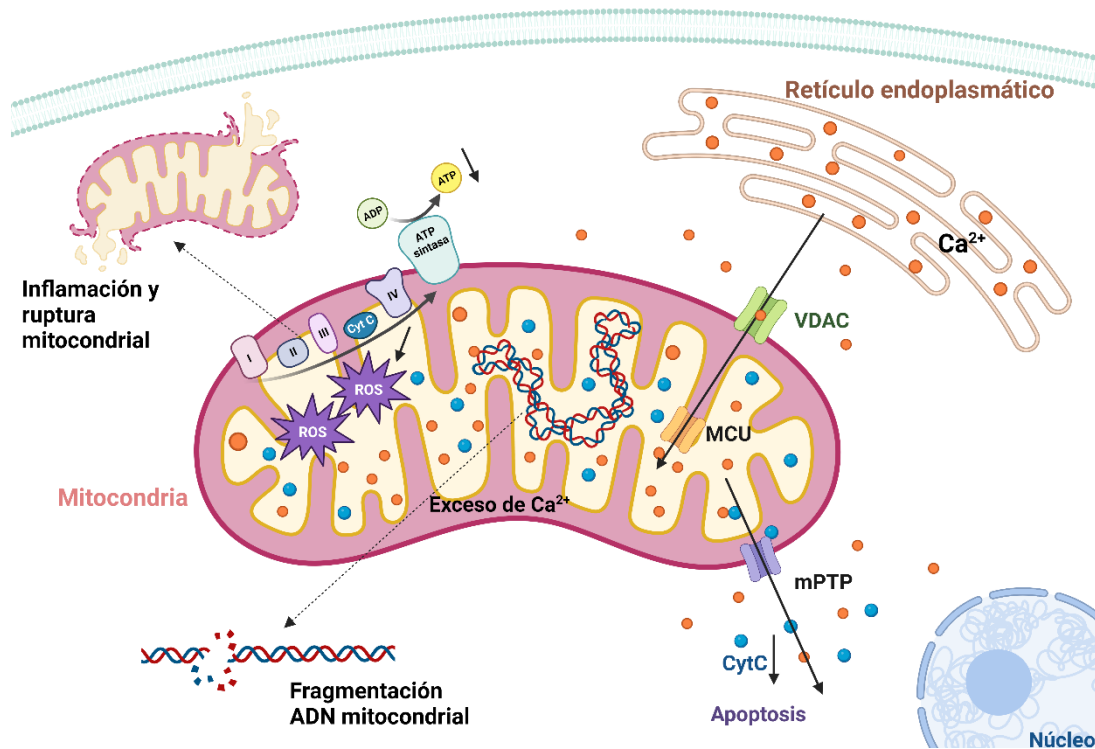


Figura 4. Disfunción y alteración de la homeostasis del calcio. (Imagen creada con BioRender.com).

Por otro lado, el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) actúa como marcador de la disfunción mitocondrial. En situaciones fisiológicas, el $\Delta\Psi_m$ se mantiene estable mientras que en situaciones patológicas se produce una alteración prolongada que lleva a la muerte celular (Ward y col., 2017). El $\Delta\Psi_m$ es generado por el sistema OXPHOS permitiendo la síntesis de ATP en la mitocondria. Un $\Delta\Psi_m$ elevado indica que hay un aumento de la producción de EROS mientras que un $\Delta\Psi_m$ bajo no permitiría la producción del ATP, siendo ambas situaciones perjudiciales (Zorova y col., 2018).

Los estudios científicos realizados en los últimos años revelan que son numerosos los compuestos naturales que actúan regulando la homeostasis del calcio mitocondrial y estabilizando el $\Delta\Psi_m$ en modelos de neurodegeneración. Así, se ha estudiado el efecto protector a nivel mitocondrial de diterpenos tipo kaurano en modelos *in vitro* de estrés oxidativo inducido por H_2O_2 en células de feocromocitoma de rata PC-12, de sesquiterpenos como la artemisinina que previene la pérdida del $\Delta\Psi_m$ en células ganglionares de retina (RGC-5) y de derivados del floroglucinol como la hiperforina que reduce la neurotoxicidad inducida por el péptido A β en modelos *in vivo* de rata APP/PS1, revirtiendo el aumento de calcio mitocondrial (González-Burgos y col., 2016; Yan y col., 2017; Zolezzi y col., 2013). Asimismo, se han reportado diversos polifenoles con propiedades neuroprotectoras como los flavonoides baicaleína o nobiletina que previenen el

aumento del calcio intracelular y del calcio mitocondrial en modelos de daño mediado por el neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y por el glutamato en neuronas corticales de rata primarias (Wang y col., 2017; Lee y col., 2018). También el flavonoide miricetina ejerce un efecto citoprotector al reducir la pérdida del potencial de membrana inducido por el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) en modelos de neuroblastoma murino (MES23.5) (Zhang y col., 2011). Otros compuestos fenólicos como el ácido ferúlico han demostrado restaurar el $\Delta\Psi_m$ en modelos de daño inducido por oligómeros A β_{1-42} (Picone y col., 2009).

1.3.1.5.3 Inhibición de la apoptosis

La apoptosis es un mecanismo molecular de muerte celular. Es un proceso complejo en el que tienen lugar toda una serie de eventos que culminan con la eliminación celular (Battistelli y Falcieri, 2020). Entre los eventos más característicos que ocurren en una célula apoptótica son la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, seguida de cambios morfológicos, contracción del citoplasma y perforación de la membrana para terminar con la formación de cuerpos apoptóticos y su eliminación fagocítica (Rashedi y col., 2007).

La regulación de esta vía es esencial para el mantenimiento de la homeostasis al eliminarse células no deseadas o dañadas. Una desregulación de la apoptosis deriva en patologías como el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas (Fulda y col., 2010). La apoptosis está regulada por la activación de la vía extrínseca de unión a receptor de muerte celular y la vía intrínseca que se desencadena a nivel mitocondrial y del retículo endoplasmático. Las EROS juegan un papel esencial en la regulación de estas vías apoptóticas.

En la vía extrínseca las EROS activan receptores de muerte celular como Fas, TNF-R1 o TRAIL-R1 lo que desencadena la autoactivación de las procaspasas-8 y 10. Estas enzimas serán las encargadas de activar directamente las caspasas efectoras 3, 6 y 7 que inducen la apoptosis. Por otro lado, la activación de la caspasa 8 lleva a la formación de tBid que se transloca a la mitocondria bloqueando la actividad antiapoptótica Bcl-2 y activando Bax y Bak (Mahmood y Shukla., 2010).

Por otro lado, la vía intrínseca mitocondrial está mediada por la activación de p53 y JNK que inhiben la acción de las proteínas antiapoptóticas y activan las proteínas proapoptóticas. Además, el efecto del estrés oxidativo sobre el potencial de membrana y la homeostasis del calcio provoca la liberación de factores proapoptóticos como citocromo C (Cit C) y AIF al citoplasma. El citocromo C media la formación del apoptosoma junto con la procaspasa 9 y el factor Apaf-1 induciéndose la activación de la enzima caspasa 9 y por consiguiente la caspasa efectora 3. La vía

intrínseca en el retículo endoplasmático está estrechamente vinculada con la mitocondria y la alteración de los niveles de calcio. Las enzimas caspasa 4 y caspasa 12 del retículo endoplasmático lleva a la activación de las caspasas 3 y 9. Asimismo la expresión génica de genes proapoptóticos se activa frente a la inhibición de Bcl-2 vía traslocación nuclear de la proteína homóloga C/EBP (CHOP) (Redza-Dutordoir y Averil-Bates, 2016; Hu y col., 2019; Matsson y col., 2000) (Figura 5).

Entre los principales activadores y ejecutores de la apoptosis se destaca a la familia de proteínas Bcl-2 y a las caspasas. A nivel neuronal, la enzima **caspasa 3** se ha identificado como el principal efector de la apoptosis (D'Amelio y col., 2010). Asimismo, las proteínas Bcl-2 y Bcl-XL inhiben la formación del mPTP y por tanto la liberación del Cit C y otros factores proapoptóticos (Reed y col., 1998).

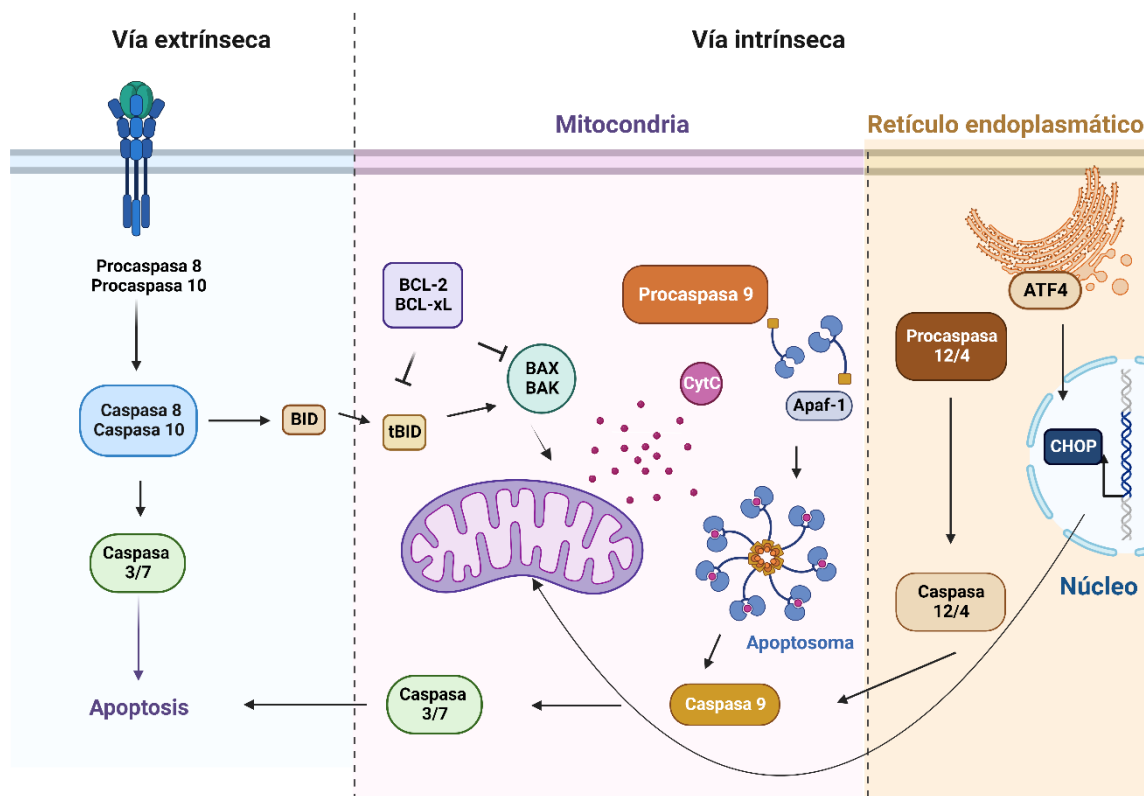


Figura 5. Apoptosis. Vías extrínseca (receptores de muerte) e intrínsecas (mitocondria y retículo endoplasmático). (Imagen creada con BioRender.com)

Son varios los compuestos naturales que inhiben la apoptosis inducida por el estrés oxidativo. El terpenoide bilobáldido ha demostrado inhibir la apoptosis mediante la reducción de los niveles de c-Myc, p53, Bax y la activación de la enzima caspasa-3 en un modelo de estrés oxidativo en células PC12 (Zhou y Zhu, 2000). En otro estudio, el flavonoide acetina ha mostrado proteger las células SH-SY5Y en un modelo de neurotoxicidad inducido por 6-OHDA.

Este compuesto es capaz de disminuir la expresión de las enzimas caspasa-9 y caspasa-3, del PARP escindido, y la liberación del citocromo C. Además, la acetina también aumenta el ratio Bcl-2/Bax a través de la fosforilación de JNK, p38 y ERK 1/2 MAPKs (Kim y col., 2017). Recientemente también se ha estudiado el efecto protector de la timoquinona y la curcumina en modelos de envejecimiento inducidos por D-galactosa en ratas Wistar. El tratamiento con estos compuestos ha resultado en una reducción de la expresión de mRNA en TP53, p21, Bax y caspasa 3 y un aumento de Bcl-2 (El-Far y col., 2021). Asimismo, el flavonoide quercetina ha demostrado efectos antiapoptóticos en modelos de daño oxidativo celular en ratas macho albino reduciendo la expresión de la enzima caspasa-3 y aumentando los niveles de Bcl-2 (Dora y col., 2021).

1.3.1.5.4 Activación de la autofagia

La autofagia es un proceso degradativo lisosomal en el que la propia célula elimina y recicla proteínas mal plegadas, orgánulos dañados y microorganismos patógenos (Glick y col., 2010). En el año 1963, Christian de Duve describió por primera vez esta vía en células animales (De Duve, 1963). La autofagia se presenta como un mecanismo de supervivencia celular implicado en el crecimiento, longevidad, homeostasis celular y diferenciación, así como en la prevención frente al daño genómico (Bhatia y Sharma, 2021). Actualmente existe cierta controversia en relación con la respuesta autofágica ya que, aunque la autofagia funciona como respuesta protectora frente al daño celular, si este daño es elevado podría conducir a la muerte celular (Debnath y col., 2005). Además, la existencia de una muerte celular autofágica o una modulación de la muerte apoptótica sigue en debate.

Según el modo de entrega del contenido citoplasmático al lisosoma se diferencian tres tipos de autofagia (Levine y Kroemer, 2019; Lee y col., 2012):

- **Macroautofagia** este proceso no selectivo comprende la formación de un autofagosoma y su posterior fusión con el lisosoma, resultando en la eliminación de proteínas de larga vida y de constituyentes celulares como mitocondrias o proteosomas. En células eucariotas es el mecanismo catabólico más utilizado (Levine y Kroemer, 2019; Lee y col., 2012). La macroautofagia está mediada por los conocidos como genes relacionados con la autofagia (ATG) que son genes muy conservados en organismos eucariotas y que se relacionan con procesos evolutivos clave de la vida eucariota (Levine y Klionsky, 2017). Comúnmente la vía canónica de la autofagia hace referencia a la macroautofagia.
- **Microautofagia:** en este proceso el contenido citoplasmático dañado es directamente secuestrado por la membrana lisosomal (Li y col., 2012a). Están implicados diversos mecanismos que permiten su clasificación en tres tipos: microautofagia con protusión

lisosomal o tipo 1; microautofagia con invaginación lisosomal o tipo 2 o microautofagia con invaginación endosomal o tipo 3 (Oku y Sakai, 2018).

- **Autofagia mediada por chaperonas:** A través de este tipo de autofagia se degradan proteínas solubles con secuencias específicas y no orgánulos. No implica la formación de vesículas. Las proteínas solubles chaperonas HSC70 y cochaperonas forman un complejo con la proteína, se dirigen a la membrana lisosomal, y son introducidas al interior del lisosoma a través del receptor lisosomal LAMP-2A (Kaushik y Cuervo, 2018; Cuervo y Wong, 2013).

También se han descrito fenómenos de autofagia específicos según el tipo de cargo eliminado como la mitofagia (mitocondrias), pexofagia (peroxisomas), lisofagia (lisosomas) o agregofagia (agregados proteicos) (Munch y Dikic, 2018).

Dado que en el capítulo 5 de la presente Tesis Doctoral se aborda de manera preliminar el efecto del ácido girofórico sobre la macroautofagia se procede a explicar brevemente sus etapas (Yang y Klionsky, 2012; Glick y col., 2010; Feng y col., 2014) (**Figura 6**). La autofagia se puede expresar en diversas etapas:

- **Iniciación/Nucleación:** consiste en la formación del fagóforo o estructura preautofagosomal (PAS) ante señales inductoras. En ausencia de estas señales el complejo de iniciación ULK, responsable de la formación del fagóforo, está unido a mTORC1, inhibiendo la vía. Para la formación del fagóforo es esencial la formación del complejo ATG14-VPS34-p150-BECN1.
- **Formación del autofagosoma:** consiste en la elongación del fagóforo que lleva a la formación de vesículas de doble membrana conocidas como autofagosomas que contienen en su interior el cargo. En este proceso se destaca el complejo ATG5, ATG12 y ATG16L1 y el sistema LC3. Tras la activación de la ruta autofágica, **LC3-I** (soluble en el citosol) se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) dando lugar a **LC3-II**, asociada a la membrana del autofagosoma. LC3-II se relaciona con el número de autofagosomas presentes en la célula, empleándose como indicador del proceso. Asimismo, es importante destacar la proteína p62 como marcador del flujo autofágico. Esta proteína se une a los agregados proteicos ubiquitinizados que se dirigen al autofagosoma para su degradación. Si el proceso está inhibido, **p62** se acumula (Bjorkoy y col., 2009).
- **Maduración y fusión con el lisosoma:** en este paso el autofagosoma se une al lisosoma constituyendo el autofagolisosoma. En el caso que el autofagosoma se fusione con un endosoma se genera un anfisoma. La fusión está mediada por tres familias de proteínas: GTPasas Rab, complejos de ligación de membranas y SNAREs.

- **Degradación y reciclaje:** el contenido es degradado en el interior del lisosoma por enzimas hidrolasas y liberado al citoplasma donde se recicla.

Diversas enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con un desarrollo anormal del proceso autofágico, impidiéndose el aclaramiento de agregados proteicos como ocurre con las placas β -amiloides y los ovillos neurofibrilares en la EA, con la acumulación de α -sinucleína en la EP, con la mHtt en la EH o con TDP43 en la ELA (Ghavami y col., 2014). Atendiendo al estrés oxidativo, puesto que este estudio se circunscribe en este marco, las EROS están asociadas a la inducción autofágica. La autofagia está implicada tanto en la detección del estrés oxidativo como en la eliminación de proteínas y orgánulos dañados por la oxidación. La desregulación de la autofagia causa aumentos del estrés oxidativo en diversos modelos *knockout* (Lee y col., 2012). La restauración o activación de esta vía constituye una de las actuales estrategias terapéuticas para hacer frente a las enfermedades neurodegenerativas (Yun y col., 2020).

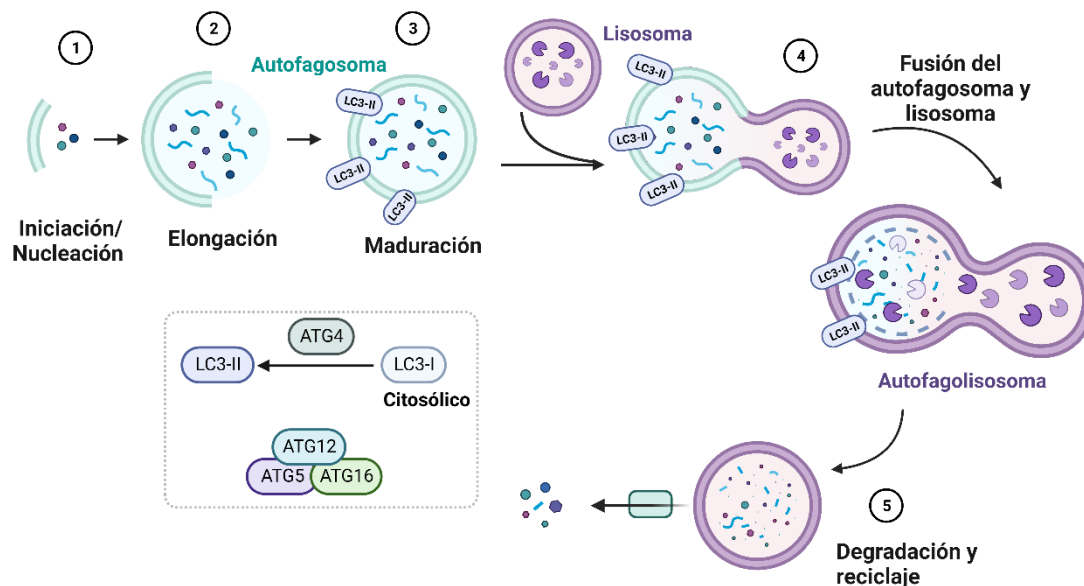


Figura 6. Etapas de la macroautofagia. (Imagen creada con BioRender.com)

En las últimas décadas se ha investigado el efecto neuroprotector de diversos compuestos de origen natural vía estimulación del proceso autofágico en modelos de neurodegeneración. Así, en el grupo de los terpenos, se ha reportado que el sesquiterpeno cubebeno induce la autofagia en un modelo de toxicidad inducido por el péptido β -amiloide en un cultivo primario de neuronas. Este compuesto aumenta la expresión de las proteínas autofágicas beclina-1, ATG5, ATG12 y LC3-II por inhibición de la vía PI3K/AKT/mTOR (Li y col., 2019). Asimismo, el monoterpeno geraniol ha mostrado ejercer un efecto neuroprotector en un modelo de estrés oxidativo inducido por rotenona en células del neuroblastoma SK-N-SH. El geraniol reduce el estrés oxidativo y la acumulación de la proteína α -sinucleína vía estimulación autofágica tal y

como se evidencia con el aumento de LC3-II y la disminución de p62 (Rehka y Sivakamasundari, 2018). Por otro lado, también se han estudiado diversos alcaloides como la berberina que activa la autofagia vía inhibición de mTOR en un modelo celular de neuroblastoma de Neuro 2a, aclarando los agregados insolubles TDP-43 presentes en proteinopatías como la enfermedad de ELA (Chang y col., 2016). Otros compuestos naturales que han demostrado actuar sobre la vía de la autofagia son los compuestos fenólicos. Como ejemplo se destaca el resveratrol que aumenta los niveles de Beclin-1 y LC3-II y reduce los de LAMP1 y la proteína de la matriz mitocondrial HSP60, promoviendo la mitofagia en un cultivo primario de neuronas expuestas a glutamato (Pineda-Ramírez y col., 2020). También se ha mostrado su efectividad en modelos de EH, induciendo la degradación autofágica de la mHtt (Vidoni y col., 2018).

1.3.2. Déficit colinérgico e inhibidores de enzimas colinesterasas

1.3.2.1. Neurotransmisores en trastornos neurodegenerativos

Uno de los mecanismos patogénicos característicos en los procesos neurodegenerativos es el desequilibrio y alteración de los niveles de los neurotransmisores. Estos desempeñan un importante papel en la neurotransmisión al actuar como mensajeros químicos endógenos transmitiendo señales entre neuronas, y entre éstas y las células diana, siendo a su vez responsables de procesos esenciales como el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia neuronal (Teleanu y col., 2022).

El funcionamiento normal del sistema nervioso puede verse alterado por el aumento o disminución de los niveles de los neurotransmisores (Lee y Dan, 2012). Por ejemplo, en la EP es característico el déficit en dopamina (DA) y alteraciones en los niveles de otros neurotransmisores como glutamato (GLU), GABA, noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), histamina (HA) y acetilcolina (ACh) (Yadav y Kumar, 2022). En el caso de la EH, los niveles de DA, GLU y ACh se encuentran aumentados mientras que los niveles de GABA están disminuidos (Jamwal y Jumar, 2019). En los enfermos de ELA, la neurotoxicidad se asocia con un exceso de GLU (Satarker y col., 2022). En cuanto a la EA, el declive cognitivo y las pérdidas de memoria se asocian a la degeneración progresiva y muerte de las neuronas colinérgicas y a un severo déficit de ACh (Ferreira-Vieira y col., 2016). De hecho, la primera teoría que se desarrolló en torno a la enfermedad fue la “hipótesis colinérgica” en el año 1982 (Bartus y col., 1982). En la actualidad, otras hipótesis están tomando más fuerza en relación al origen de esta enfermedad, pero la implicación del déficit colinérgico en su progresión es innegable. La administración de fármacos que actúan directamente en la reversión de este déficit ha demostrado ser una estrategia efectiva para ralentizar la progresión de la enfermedad.

1.3.2.2. Déficit colinérgico

Además de la EA como principal ejemplo de pérdida de neuronas colinérgicas, se han reportado alteraciones de este sistema en otras enfermedades como la EP, la ELA, la EH (Dubois y col., 1983; Barron y col., 1987; Aquilonius y col., 1975).

Para comprender el abordaje terapéutico frente al déficit de ACh es necesario destacar las enzimas responsables de su síntesis, transporte y degradación, así como los receptores encargados de sus efectos. La ACh es sintetizada en el citoplasma a partir de la acetil-CoA y de la colina por acción de la enzima acetiltransferasa colina (ChAT) y transportada a las vesículas sinápticas a través del transportador vesicular de ACh (VAcHT). Con la despolarización de la neurona, la ACh es liberada al espacio sináptico donde se une a sus receptores muscarínicos (mAChRs) o nicotínicos (nAChRs). La ACh es entonces rápidamente degradada a acetato y colina por la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La colina liberada es recaptada por la neurona presináptica a través de los transportadores de colina (CHT) (Amenta y Tayebati, 2008) (Figura 7).

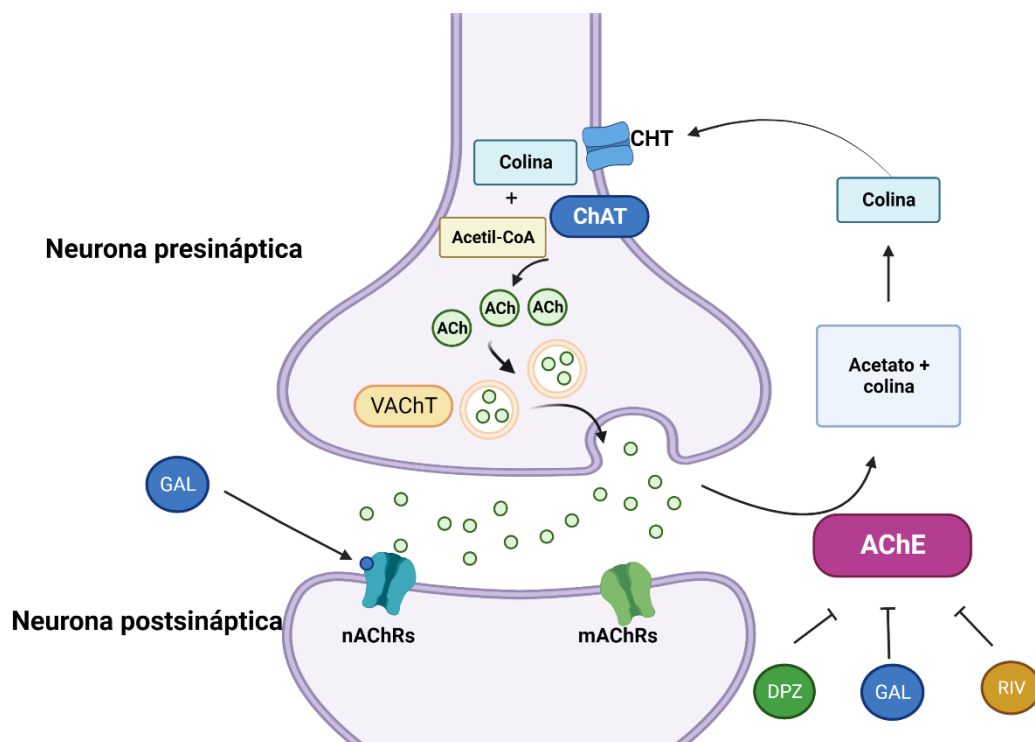


Figura 7. Síntesis, transporte y degradación de la ACh. Enzimas, transportadores y receptores implicados. Lugar de acción inhibidores comercializados: Donepezilo (DPZ), Galantamina (GAL) y Rivastigmina (RIV). (Imagen creada con BioRender.com)

En el déficit colinérgico se han reportado niveles bajos de expresión y actividad de ChAT. (Wilcock y col., 1982). Además, hay una reducción de la recaptación de colina y de los niveles de VAChT, una disminución de la liberación de ACh, una alteración de mAChRs y nAChRs, una disminución del soporte neurotrófico por NGF y una pérdida de la actividad AChE (Gasiorowska y col., 2021).

En la actualidad, el aumento de los niveles de ACh sigue siendo uno de los abordajes terapéuticos más empleados e investigados en enfermedades con desórdenes cognitivos asociados a déficits colinérgicos. Así, se investigan tratamientos dirigidos a las diferentes dianas biológicas que participan en las distintas etapas del proceso ya sea aumentando la liberación de ACh o la recaptación de colina o administrando agonistas de receptores muscarínicos. Sin embargo, hoy en día la única terapia efectiva consiste en inhibir a las enzimas AChE y BuChE, con el fin de aumentar los niveles de ACh en el espacio sináptico (Marucci y col., 2021).

1.3.2.3. Enzimas colinesterasas

Las colinesterasas (ChEs) son enzimas responsables de la hidrólisis de la ACh, rompiendo los ésteres de colina, dando lugar a acetato y colina (Colovic y col., 2013). Son enzimas serina hidrolasas y presentan el aminoácido serina en su centro activo. Se descubrieron a principios del siglo XX por Loewi y Navratil (Loewi y Navratil, 1926).

En vertebrados superiores se han identificado dos tipos de ChEs (AChE y BuChE) que difieren entre sí por el sustrato, localización tisular y funciones.

- La AChE es una acetilcolina hidrolasa. Su sustrato preferente es la acetilcolina o sus tioanálogos. Aunque esta enzima está presente en todos los tejidos, sus localizaciones principales son en tejido nervioso, en músculo y en el plasma (Silver, 1974; Sanz y col., 1991). Es una de las enzimas más eficientes que se conocen, siendo capaz de hidrolizar unas 5000 moléculas de ACh por segundo.
- La butirilcolinesterasa (BuChE) es una enzima acilhidrolasa. Se conoce también como colinesterasa no específica o pseudocolinesterasa. Su sustrato preferente es la butirilcolina o la propionilcolina. Se expresa fundamentalmente en el hígado, plasma, músculo liso, músculo cardiaco y tejido nervioso.

Estructura catalítica y mecanismo de acción

Estas enzimas, aunque son codificadas por genes diferentes, presentan una secuencia homóloga de al menos un 65% (Boison, 2007). Además de las diferencias comentadas, existen leves cambios en su subunidad catalítica.

Ambas enzimas presentan dos sitios de unión esenciales en el reconocimiento molecular, el centro activo catalítico (CAS) y el sitio aromático periférico (PAS). El CAS está formado por la conocida como triada catalítica constituida por los aminoácidos serina, ácido glutámico e histidina. (Nicolet y col., 2003). Por su parte, los aminoácidos presentes en el PAS son serina, tirosina, ácido aspártico y triptófano en la enzima AChE y ácido aspártico, glutamina, serina y tirosina en la enzima BuChE. El PAS tiene naturaleza polar; está cargado negativamente y está implicado en la unión de sustratos y ligandos con carga positiva. La presencia de un mayor número de aminoácidos alifáticos en la enzima BuChE parece ser la responsable del mayor tamaño en su bolsillo de unión lo que permite la entrada de sustratos de mayor tamaño (De Boer y col., 2021; Berg y col., 2011).

En cuanto a su mecanismo de acción, es esencialmente el mismo y se distinguen dos etapas: (i) la unión covalente entre el grupo acilo del sustrato y el aminoácido serina del centro activo que lleva a la rotura del enlace éster en el sustrato y la liberación de colina. En esta etapa se forma un intermediario acil-enzima y (ii) la liberación del grupo acilo y la enzima mediante la acción de una molécula de H₂O (Rosenberry, 1975).

Genética y formas moleculares de las enzimas colinesterasas

A nivel génico, se distinguen dos genes diferentes para cada enzima, *ACHE*, presente en el región q22 del cromosoma 7 y *BCHE* en la posición q26.1- q26.2- del cromosoma 3 (Getman y col., 1992; Gaughan y col., 1991). Mientras que *BCHE* no sufre empalme alternativo, *ACHE* da lugar a tres transcritos: AChE-S o AChE-T, isoforma sináptica, tetrámera; AChE-E dimérica, isoforma eritrocítica, y AChE-R "readthrough", monomérica (Darvesh y col., 2003; Massoulié y col., 1998).

Las proteínas codificadas por estos transcritos presentan formas moleculares diversas debido a los múltiples cambios postranscripcionales y postraduccionales, específicos de cada tejido (Massoulié y Bon, 1982). Forman homómeros si se agregan subunidades catalíticas idénticas, o heterómeros, si se asocian a su vez a otras proteínas estructurales. Según la forma de agregación a su vez pueden ser formas asimétricas o globulares. Estas últimas pueden ser monómeros, dímeros o tetrámeros (Massoulié y col., 1993). La distribución de las distintas formas difiere mucho de un tejido a otro. Alteraciones de la misma se correlacionan con patologías como la enfermedad de Alzheimer (Campanari y col., 2016).

Funciones de las enzimas colinesterasas

La función clásica de las ChEs, como ya se ha comentado, es la hidrólisis de la ACh en la sinapsis colinérgica dando término a la transmisión del impulso. La principal enzima responsable

de esta acción a nivel cerebral es la AChE, dada su mayor distribución en este tejido. Se encuentra principalmente en las neuronas mientras que la enzima BuChE se expresa en las células de la glía (Wright y col., 1993). Aunque en un primer momento se consideró que la enzima BuChE no desempeñaba un papel esencial en este proceso, ciertos estudios le atribuyen un papel regulador, colaborando con la enzima AChE en la degradación del exceso del neurotransmisor, e incluso sustitutivo en situaciones de carencia de la AChE (Graybiel y Ragsdale, 1982). Asimismo, en la EA la actividad de la AChE se ve disminuida (siendo la mayoritaria en cerebros sanos), mientras que la actividad de la BuChE se ve incrementada de forma significativa (Greig y col., 2002).

Además de su función en la neurotransmisión se han reportado actividades “no clásicas” relacionadas con procesos como la hematopoyesis, el crecimiento neuronal, la tumorigénesis y la apoptosis (Silman y Sussman., 2005; Small y col., 1996; Soreq y Seidman, 2001). Se ha establecido relación entre la sobreexpresión de la enzima AChE y el proceso apoptótico, postulándose su implicación en la formación del apoptosoma (Park y col., 2004). Además, la expresión de las diferentes variantes parece estar relacionada con funciones diversas. Así, la AChE-R parece estar relacionada con procesos de neuroprotección y reparación mientras que la AChE-T está implicada en procesos de neurotoxicidad (Cohen y col., 2002; Perrier y col., 2006). Asimismo, se ha relacionado ambas enzimas con la agregación amiloide, pudiendo estar implicadas en la maduración de las placas (Carvajal e Inestrosa, 2011; Darvesh y col., 2012).

1.3.2.4. Neuroprotección mediante la inhibición de las enzimas colinesterasas

A pesar de los significativos avances en la comprensión de las causas subyacentes de las enfermedades neurodegenerativas, el desarrollo de tratamientos efectivos no ha progresado de manera equiparable. De entre todas las enfermedades neurodegenerativas comentadas a lo largo de este trabajo y dada la relevancia de sus datos epidemiológicos, la EA se presenta como ejemplo del lento avance del desarrollo farmacoterapéutico. De todas las estrategias planteadas, la inhibición de las enzimas colinesterasas se plantea como uno de los pocos abordajes terapéuticos con eficacia. De los cuatro fármacos para el tratamiento de la EA aprobados y comercializados en España, tres son inhibidores colinesterásicos (IChEs).

La inhibición enzimática es la pérdida de capacidad metabólica de una enzima ante la presencia de inhibidores enzimáticos. La inhibición puede ser reversible (unión no covalente) o irreversible (unión covalente modificando la estructura de la enzima). Asimismo, la inhibición reversible puede ser competitiva (mismo sitio de unión que el sustrato), no competitiva (distinto sitio de unión que el sustrato) o acompetitiva (se une al complejo enzima sustrato).

De igual manera, encontramos IChEs reversibles ya sea competitivos o no competitivos, los cuales desempeñan una función farmacológica e IChEs irreversibles, como pesticidas, en la mayoría de los casos asociados a efectos tóxicos (Singh y Sadiq, 2023).

Fármacos comercializados inhibidores de las enzimas colinesterasas

La utilización de IChEs reversibles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas comenzó en el año 1993 con la aprobación del fármaco tacrina, pero se dejó de utilizar debido a su alta hepatotoxicidad (Watkins y col., 1994). Actualmente se encuentran comercializados:

- **Donepezilo** es un inhibidor selectivo de la enzima AChE. Se trata de un derivado sintético de la N-benzilpiperidina (Sugimoto y col., 2002). Está aprobado en España desde el año 1998. Su vida media plasmática es elevada y permite una dosificación sencilla (un comprimido al día). Además de actuar como fármaco IChEs, se ha visto que tiene efectos neuroprotectores al reducir los depósitos de las placas amiloides (Castro y Martínez, 2006).
- **Rivastigmina** es un inhibidor pseudoirreversible no competitivo, de tipo carbamato. Forma un complejo carbamoyl-AChE que inactiva temporalmente la enzima (Moss, 2020). Es un derivado del alcaloide natural fisostigmina extraída del haba de Calabar (*Physostigma venenosum*). La rivastigmina inhibe tanto la enzima BuChE como la enzima AChE (Kandiah y col., 2017). Ejerce su acción inhibitoria en el SNC, con mínima acción periférica. Fue aprobado en Europa en el año 1999. En la actualidad, el tratamiento oral se ha sustituido por el uso de parches transdérmicos con el fin de reducir sus efectos adversos gastrointestinales (Winblad y col., 2007). En este caso cabe destacar su naturaleza semisintética derivada del alcaloide fisostigmina (Russo y col., 2013).
- **Galantamina** es un inhibidor reversible, competitivo y selectivo frente a la enzima AChE, con actividad leve frente a la enzima BuChE (Colovic y col., 2013). Además, tiene un efecto dual puesto que actúa como modulador alostérico del receptor nAChRs, facilitando su apertura y potenciando el efecto de la ACh (Maelicke y col., 2001). Fue aprobada en el año 2000. Este fármaco es el único de origen natural; es un alcaloide isoquinolínico extraído de plantas de la familia de las *Amaryllidaceae*, aislado en el año 1956 de los bulbos de *Galanthus nivalis* L. En la actualidad se obtiene de los bulbos de *Galanthus woronowi* Losinsk y *Galanthus alpines* Sosn o mediante síntesis química (Tewari y col., 2018).

En cuanto a sus reacciones adversas se relacionan con sus efectos colinérgicos a nivel periférico. Las más frecuentes se producen a nivel gastrointestinal, como náuseas, vómitos, diarrea, anorexia y dolor abdominal. Asimismo, se pueden presentar mareos, calambres musculares, bradicardia o síncope.

Muchos de los pacientes abandonan su tratamiento o alteran las pautas de administración debido a estos efectos adversos. Además, los beneficios son temporales y no son útiles en tratamientos prolongados (Courtney y col., 2004). La búsqueda de nuevos inhibidores más selectivos, más potentes y de acción prolongada es una importante línea de investigación actual.

Inhibidores naturales de las enzimas colinesterasas

El origen natural o semisintético de los compuestos presentes en el mercado manifiesta la importancia de los productos naturales como fuente de IChEs. Se han identificado diversos compuestos de origen natural con propiedades anticolinesterásicas como alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanos, polifenoles, poliquétidos o terpenos, entre otros. En la **Tabla 1** se recoge información relativa al tipo de compuesto natural y origen, tipo de inhibición y selectividad por las enzimas.

Tabla 1. Compuestos naturales con propiedades anticolinesterásicas (Tabla extraída y modificada de Smyrska-Wieleba y Mroczek, 2023).

COMPUESTO	ORIGEN BOTÁNICO	INHIBICIÓN	IC ₅₀ (μM)
ALCALOIDES			
Alborina	<i>Papaver setiferum</i> Goldblatt	Inhibidor BuChE Inhibidor selectivo AChE	IC ₅₀ (BuChE): 63.1 IC ₅₀ (AChE): 6.8
Angustidina	<i>Nauclea officinalis</i> (Pierre ex Pitard) Merr.)	Inhibidor selectivo BuChE Inhibidor AChE	IC ₅₀ (BuChE): 1.03 IC ₅₀ (AChE): 21.72
Berberina	<i>Mahonia bealei</i> (Fortune)Carr.	Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 0.52
Lappaconitina	<i>Aconitum laeve</i> Royle	Inhibidor BuChE Inhibidor AChE	IC ₅₀ (BuChE):11.24 IC ₅₀ (AChE): 6.13
Sanguinina	<i>Hieronymiella marginata</i> Hunz	Inhibidor BuChE Inhibidor selectivo AChE	IC ₅₀ (BuChE): 21.5 IC ₅₀ (AChE): 0.10
Vincosamida	<i>Uncaria rhynchophylla</i> Miq. ex Havil Rubiaceae	Inhibidor BuChE Inhibidor AChE	IC ₅₀ (BuChE): 23.18 IC ₅₀ (AChE): 12.4
CUMARINAS			
Imperatorina	<i>Archangelicae officinalis</i> L	Inhibidor selectivo BuChE Inhibidor AChE	IC ₅₀ (BuChE): 14.4 IC ₅₀ (AChE): 156
Mesuagenina A	<i>Mesua elegans</i> Kosterm.	Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 1.06

TERPENOS			
Ácido asiático	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 15.05
Ácido betulínico	<i>Garcinia hombroniana</i> Pierre	Inhibidor BuChE	IC ₅₀ (BuChE):19.1
		Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 24.2
Ácido ganodérico E	<i>Ganoderma lucidum</i> Karst.	Inhibidor BuChE	IC ₅₀ (BuChE):200
		Inhibidor selectivo AChE	IC ₅₀ (AChE): 18.35
Amberina	<i>Amberboa ramosa</i> Jafri	Inhibidor BuChE	IC ₅₀ (BuChE):2.7
Criptotansinona	<i>Salvia miltiorhiza</i> Bunge	Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 7
Dihidrotansinona	<i>Salvia miltiorhiza</i> Bunge	Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 1
FLAVONOIDES			
Bilobetina	<i>Selaginella doederleinii</i> Hieron	Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 5.76
Kaempferol	<i>Spiranthes sinensis</i> Ames	Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 12.64
Quercetina	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 19.8
ESTEROLES			
Leucisterol	<i>Leucas urticifolia</i> Vahl.	Inhibidor selectivo BuChE	IC ₅₀ (BuChE):3.2
		Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 83.6
POLÍQUETIDOS			
Ácido astérico	<i>Talaromyces aurantiacus</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Samson, Yilmaz & Frisvad	Inhibidor BuChE	IC ₅₀ (BuChE):100
		Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 66.7
Aspilactonol I	<i>Phaeospaeria</i> sp.	Inhibidor AChE	IC ₅₀ (AChE): 6.26

1.3.3 Estrategia neuroregeneradora frente al daño neuronal

1.3.3.1 Pérdida estructural y funcional de neuronas en enfermedades neurodegenerativas

Una de las características principales que comparten las enfermedades neurodegenerativas es la muerte neuronal (Gorman, 2008). Esta muerte puede ser desencadenada por diversas causas, como el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria o la disfunción mitocondrial que llevan a la activación de vías inductoras de muerte. Sin embargo, previo a este evento, las neuronas sufren toda una serie de cambios a nivel estructural (retracción de neuritas y pérdida de sinapsis) o a nivel funcional (déficits electrofisiológicos y activación de vías de estrés celular) (Bredesen y col., 2006). La alteración de la actividad neuronal se produce a nivel molecular (alterando las cascadas de señalización), a nivel sináptico y neuronal (afectando a su integridad y función) e incluso a niveles superiores afectando a circuitos locales y redes neuronales superiores. De hecho, los enfermos que padecen de enfermedades neurodegenerativas sufren fluctuaciones a lo largo del mismo día o semanas, lo que puede explicarse por el ajuste de estas funciones (Palop y col., 2006).

En este contexto es importante definir el concepto de **plasticidad neuronal** como la habilidad del sistema nervioso para reorganizar su estructura, sus funciones y conexiones en respuesta a estímulos intrínsecos y extrínsecos (Puderbaugh y Emmady, 2023). Entre los mecanismos de neuroplasticidad se encuentra la **plasticidad sináptica**, referida como la capacidad de las neuronas para modificar la eficacia y fuerza de las conexiones sinápticas y por tanto la transmisión. La plasticidad sináptica incluye la potenciación a largo plazo (LTP), intensificando la transmisión de las señales y la depresión a largo plazo (LTD), reduciendo su eficacia. Se relacionan con el aprendizaje y la memoria. Paralelamente se observan cambios estructurales a nivel axonal y dendrítico como es el aumento del tamaño de las espinas dendríticas durante la LTP (Mateos-Aparicio y Rodríguez- Moreno, 2019). Por otro lado, la **sinaptogénesis** se define como la formación de sinapsis y su mantenimiento y eliminación dependiente de la actividad (Cohen-Cory, 2002). Está estrechamente relacionada con el crecimiento neurítico, axonal y dendrítico.

En la EA es característica la pérdida de las sinapsis en etapas tempranas de la enfermedad (Arendt, 2001). La función sináptica está estrechamente relacionada con la cognición, siendo la pérdida de la misma uno de los signos más claros del deterioro cognitivo (Colom-Cadena y col., 2020). A su vez, en la EP, los agregados de la proteína α -sinucleína se depositan en las neuronas presinápticas y son responsables de la degeneración axonal y sináptica (Belluci y col., 2016). En la EH, previo a la degeneración de las neuronas de proyecciones espinosas (SPN), se produce una alteración de la transmisión y de la plasticidad sináptica, incluso antes de la aparición de la enfermedad (Smith-Dijak, 2019). Asimismo, se han detectado alteraciones estructurales y funcionales de las sinapsis en pacientes y modelos experimentales de ELA (Gulino, 2023).

Otro de los mecanismos esenciales de la plasticidad neuronal es la **neurogénesis adulta**, proceso que comprende la proliferación celular, la diferenciación y la migración a partir de células precursoras adultas. Esta capacidad está restringida a unas áreas concretas del cerebro: la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales que migran integrándose en el bulbo olfatorio (Ming y Song, 2011). En las enfermedades neurodegenerativas este proceso se encuentra comprometido, perdiendo esta capacidad regenerativa endógena. Cabe señalar, la relación entre los síntomas tempranos de estas enfermedades como la disfunción olfativa o ansiedad y las regiones del hipocampo y bulbo olfativo, responsables de esta neurogénesis (Winner y Winkler, 2015).

A la hora de evaluar el estado de estos procesos durante el proceso neurodegenerativo o el efecto modulador de los tratamientos neurofarmacológicos es necesario establecer biomarcadores

validados. Entre los marcadores neuronales de diferenciación, propios de neuronas maduras, podemos destacar (Reddy y Abeygunaratne, 2022):

- Antígeno Neuronal Nuclear (**NeuN**) implicado en el desarrollo del tejido neuronal, en la diferenciación neuronal y en la regulación de las funciones cerebrales adultas. Esta proteína se expresa abundantemente en el núcleo de células diferenciadas. Se utiliza para detectar la pérdida neuronal frente al daño.
- β -tubulina de clase III específica de neuronas (**TuJ1**) se asocia con la diferenciación neuronal y el crecimiento neurítico.
- La Proteína **tau**, que está implicada en el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos con la tubulina. Durante la neurogénesis adulta, este proceso es requerido para el crecimiento de los axones (Fuster-Matanzo y col., 2012).
- Proteína de densidad postsináptica de 95 kDa (PSD95) implicada en los procesos de plasticidad sináptica y sinaptogénesis.
- Proteína 43 asociada al crecimiento recombinante (**GAP43**) relacionada con la plasticidad neuronal, el crecimiento axonal, la neurogénesis y el crecimiento neuronal presináptico. Participa en la polimerización de la actina induciendo la formación del cono de crecimiento, favoreciendo la motilidad y por tanto el crecimiento axonal (Chung y col., 2020)
- **Sinaptofisina** se encarga de regular la formación de las sinapsis. Es una proteína presente en las vesículas presinápticas.

Se ha visto que en determinadas regiones cerebrales de pacientes que sufren de la EA, la EH, la EP y la ELA, la expresión de estos marcadores se encuentra disminuida (Chung y col., 2020).

Por último, cabe mencionar la implicación de numerosas vías de transducción de señales implicadas en la neurogénesis adulta y en la diferenciación entre las que se destacan BDNF-TrkB, PI3K/Akt, CREB y MAPK/ERK1/ERK2 (Zhu y col., 2022).

1.3.3.2. Modulación terapéutica de la neurogénesis adulta y la plasticidad sináptica

Los estudios disponibles en la literatura científica sobre las propiedades estimuladoras de la neuroplasticidad de diversos fármacos y productos de origen natural como estrategia neuroregeneradora son múltiples (Carrillo-Mora y col., 2017). Estos efectos neuromoduladores se han evaluado en modelos celulares de células madre/células madre progenitoras (NS/PCs), células madre mesenquimales (MSCs) y en líneas inmortalizadas como las células PC-12 o SH-SY5Y (An y col., 2018).

Entre los productos naturales, algunos flavonoides como la wogonina o la baicalina inducen la diferenciación neuronal y el crecimiento neurítico en células NS/PCs (Lim y col., 2010; Li y col., 2012b). Otros polifenoles como el resveratrol promueven la diferenciación neuronal vía activación SIRT1 en células MSCs mientras que la curcumina aumenta la neuritogénesis vía MAPK/ERK en células PC-12 (Joe y col., 2015; Liao y col., 2013). Por último, alcaloides como la tetrametilpirazina activa la migración en células NPCs e induce la diferenciación en células MSCs y SH-SY5Y activando la vía PI3K/Akt (Kong y col., 2016; Nan y col., 2016; Yan y col., 2015).

Además de los estudios *in vitro* con modelos celulares, los efectos neuroprotectores de determinados compuestos de origen natural a través de la neuromodulación han sido investigados en modelos *in vivo* de neurodegeneración. El ácido geniposídico, glicósido de *Gardenia jasminoides* J. Ellis ha demostrado reducir el daño cognitivo, la acumulación del péptido β -amiloide, la apoptosis neuronal y el daño axonal mediante la sobreexpresión de GAP43 vía PI3K/Akt en modelos de ratones transgénicos mPrP-APP^{swe}/PS1^{De9} (Chen y col., 2022b). De la misma manera, el ácido rosmarínico y el ácido ursólico, aislados de *Rosmarinus officinalis* L., han demostrado revertir el déficit cognitivo y las deficiencias en la neurogénesis adulta y en la sinaptogénesis inducidas por el péptido A β ₁₋₄₂ en ratones BALB/c. Esto queda evidenciado con la sobreexpresión de marcadores neurogénicos como NeuN y sinápticos como sinaptofisina o PSD-95 (Mirza y col., 2021).

Muchos de los modelos de estudio que analizan las propiedades neurorestaurativas de los productos naturales están basados en modelos de daño isquémico. Así, la saponina astragalósido IV ha demostrado aumentar la neurogénesis vía BDNF/TrkB en un modelo de rata MCAO/r con isquemia cerebral (Ni y col., 2020). El flavonoide baicalina ejerce sus efectos sobre el crecimiento neurítico vía BDNF/TrkB/PI3K/Akt y vía MAPK/ERK1/ERK2 en modelos de daño inducido por privación de oxígeno y glucosa/reperfusión (OGD/R) en astrocitos (Li y col., 2021). Asimismo, en el grupo de los polifenoles, el resveratrol induce la neuritogénesis y sinaptogénesis en neuronas primarias corticales tras OGD/R (Tang y col., 2017).

1.4. Compuestos naturales y neuroprotección

Como ha quedado patente a lo largo de esta introducción, es evidente el papel de los productos naturales como compuestos activos para el tratamiento de la neurodegeneración desde diferentes enfoques. De igual manera se ha observado que la principal fuente de estos compuestos bioactivos se encuentra en vegetales superiores.

Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral se han centrado en otros organismos de origen natural, con características especiales dada su naturaleza simbiótica: los **líquenes**. En las últimas décadas el interés terapéutico de sus compuestos bioactivos ha crecido notablemente. Esta segunda parte de Introducción recoge información sobre su morfología, distribución, composición química, taxonomía, filogenia, usos y aplicaciones, así como sus propiedades antioxidantes y neuroprotectoras investigadas hasta el momento.

2. Líquenes

2.1 Líquenes

2.1.1 Características generales

Las relaciones simbióticas constituyen una de las interacciones biológicas más interesantes de la naturaleza. El término “simbiosis” procede del griego *συμβίωσις* “*symbiōsis*” y puede traducirse como “vida en común” (RAE). Dentro de esta forma de asociación de vida, encontramos a los líquenes. De acuerdo con su definición tradicional, son organismos constituidos por la coexistencia de un organismo micobionte heterótrofo (hongo) y un organismo fotobionte autótrofo, comúnmente alga o cianobacteria (Hawksworth y Honegger, 1994). Esta definición probablemente deriva del estudio del organismo mediante métodos de microscopía clásicos. Sin embargo, los avances en técnicas metagenómicas han revelado una dimensión más amplia en cuanto a su composición, llegando a hablar del concepto “microbioma del líquen” (Spribille y col., 2022). El resultado de la simbiosis entre los dos organismos dominantes es el de una estructura estable y compleja que permite la asociación con otras especies fúngicas, llamadas hongos liquenícolas, o con comunidades bacterianas. (Grube y Wedin, 2016).

Aproximadamente el 21% de especies fúngicas pueden actuar como hongos formadores de líquenes (Song y col., 2022). El 98% de ellos pertenece a la clase Ascomycota y sólo un 0,3% son basidiomicetes. A nivel celular, la estructura de su pared celular no presenta diferencias importantes entre hongos liquenizados y no liquenizados (Honegger, 2009). En cuanto al organismo fotobionte, se han identificado más de 40 géneros de algas y cianobacterias. Los más comunes, son los géneros de algas verdes *Trebouxia* y *Trentepohlia* y de cianobacterias el género *Nostoc*. En la mayoría de los líquenes será más frecuente un alga verde como fotobionte (Friedl y Budel, 2008).

Estos organismos simbióticos son notables por sus características distintivas en términos de distribución, composición química y capacidad de sobrevivir en entornos adversos. Estas cualidades se deben a las funciones que desempeña cada participante en la simbiosis. La evolución de la simbiosis ha permitido su supervivencia durante millones de años, como lo

demuestran los informes de fósiles de al menos 415 millones de años (Devónico inferior) (Honegger y col, 2012).

El fotobionte, gracias a la fotosíntesis permite que el micobionte asimile los nutrientes necesarios para su desarrollo. Los modelos desarrollados sobre este proceso han sido tres: el modelo nutricional, el anhidrobiótico y el híbrido. El primero explica que el carbono fijado por el alga (en forma de polirol) o por cianobacterias (en forma de glucosa) y almacenado en forma de manitol, sólo es usado para la respiración y el crecimiento. El modelo anhidrobiótico defiende que este carbono sólo es utilizado para la protección de la función celular durante la desecación y es el carbono orgánico asimilado por el hongo el que se utiliza para la respiración y crecimiento. Finalmente, el modelo híbrido propone que el propio hongo compartimenta el carbono fijado por el autótrofo y dedica parte a la respiración y crecimiento y parte a la protección frente a la desecación (Spribille y col., 2022). Por otro lado, la capacidad de las cianobacterias para fijar nitrógeno es importante en ambientes pobres nutricionalmente (Friedl y Budel, 2008). En esta relación de beneficio mutuo, el micobionte también juega su papel. La parte fúngica exohabitante es la dominante en la simbiosis y la responsable de la morfología del líquen y de su reproducción, proporcionando estructura, soporte y protección tanto al fotobionte como al microbioma bacteriano (Honegger y col., 1996; Grimm y col., 2021)

Mientras los hongos liquenícolas establecen una relación parasitaria o comensal, bien dañando al líquen o simplemente utilizando sus estructuras, las comunidades bacterianas se consideran un elemento más de esta simbiosis, siendo la clase Alphaproteobacteria la más común (Aschenbrenner y col., 2016). Estudios del genoma y proteoma del microbioma bacteriano presente en el líquen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. mostraron la importancia de estas bacterias a nivel nutricional (fijación de nitrógeno), en la síntesis de vitaminas y hormonas, en la protección frente al estrés abiótico (temperatura, irradiación, salinidad) y biótico (insectos, plantas, bacterias patógenas), en la detoxificación y en la degradación de partes viejas del líquen (Grube y col., 2015).

2.1.2 Morfología y anatomía del líquen

Fruto de la simbiosis, el líquen desarrolla un cuerpo vegetativo que recibe el nombre de talo liquénico (holobionte). Son estructuras de lento crecimiento, pero larga vida (Asplund y Wardle, 2016). En la mayoría de los casos, es el hongo el que determina la estructura, aunque altamente influenciada por el fotobionte. Según el tipo de talo liquénico podemos hablar de tres grupos morfológicos: crustáceo, foliáceo y fruticuloso (**Figura 8**). Los líquenes crustáceos se encuentran fuertemente adheridos al sustrato (suelo, rocas y corteza de árboles) y son capaces de soportar

condiciones extremas de desecación (especies del género *Rhizocarpum* como *Rhizocarpum geographicum* (L.) DC.). Existen, a su vez, diversos subtipos tales como leproso, escumuloso, endolítico, etc. Los talos foliosos, tienen formas más diversas, presentan aspecto de hoja aplanada con lóbulos y ramificaciones. Se encuentran parcialmente adheridos al sustrato por su parte inferior (ej. especies del género *Parmelia*). Finalmente, los talos fruticulosos tiene aspecto de arbusto, con numerosas ramificaciones y unidos al sustrato por una zona estrecha (ej. especies del género *Usnea*) (Jahns, 1973; Budel y Scheidegger, 2008).



Figura 8. Tipos morfológicos del talo liquénico (crustáceo, foliáceo y fruticuloso). (Recuperado de www.pexels.com)

Desde el punto de vista anatómico, el fotobionte puede distribuirse a lo largo de toda la estructura del talo, de manera indiferenciada (homómero) (ej. *Collema*) o presentar capas estratificadas y diferenciadas (heterómero), tipo de estructura dominante entre los líquenes. Estos últimos, de manera general, presentan cuatro capas: córtex superior, capa algal, médula y córtex inferior (Jahns, 1973).

2.1.3 Distribución geográfica

Los líquenes colonizan ecosistemas diversos, desde regiones polares a climas desérticos, en todo rango de altitudes, estando presentes en el 8% de la superficie terrestre (Nash, 2008). De hecho, en la Península Antártica, los líquenes constituyen la población botánica dominante (Convey, 2013), si bien en la actualidad su estudio está limitado a zonas accesibles. Nuevos métodos basados en tecnología satélite permiten la evaluación de estas poblaciones y sus alteraciones (Casanovas y col., 2015).

Se han encontrado líquenes cosmopolitas en todos los continentes y en islas. Asimismo, existen patrones de distribución más restrictivos como el bipolar (ambos polos), circumboreal (eurosiberiana) o circumpolar. No obstante, existen líquenes restringidos a un área endémica específica (Randlane y col., 2007). Estos patrones de distribución se verán en profundidad para las especies del clado cetrarioide, objeto del estudio de la presente Tesis Doctoral.

Entre las características que les han permitido habitar regiones y climas extremos, destacan su tolerancia a la desecación y a la radiación ultravioleta. Estos organismos son poiquilohidricos, ya que, al no presentar mecanismos activos de regulación de captación y pérdida de agua, la almacenan (200-300% de su peso, incluso 2000% en ciertos cianolíquenes) o liberan (hasta 10%-20%), en función de la disponibilidad en el ambiente (Porada y Giordani, 2021; Kranner y col., 2009). En períodos o zonas de escasez hídrica, son capaces de tolerar la desecación a través de cambios en la pared celular, en la composición lipídica de su membrana, en la vitrificación del citoplasma o en la liberación de óxido nítrico para reducir el estrés oxidativo (Gasulla y col., 2021). Con relación a la temperatura, los líquenes, poiquilotermos, son capaces de mantener su metabolismo activo a -20°C, recobrando su actividad en casos de fríos extremos (Kappen y col., 1996) y tolerar temperaturas de hasta 60°C en estados de desecación (Gasulla y col., 2021). En cuanto a la exposición a radiación UV, se ha observado un aumento en la producción de pigmentos y compuestos fenólicos que reducen la penetración de UVB (Trest y col., 2015).

Alteraciones en los patrones de distribución de los líquenes permitirán analizar los efectos del cambio climático y la influencia negativa de los asentamientos humanos (Gombert y col., 2004; Matos y col., 2017; Sancho y col., 2019).

2.1.4 Composición química

2.1.4.1 Características generales

La naturaleza simbiótica de los líquenes modula su composición química particular y compleja. Los compuestos liquénicos pueden clasificarse en dos grandes grupos: metabolitos primarios, que son compuestos inespecíficos tales como vitaminas, polisacáridos, aminoácidos, polioles, carotenoides o proteínas, sintetizados bien por el hongo o por el alga; y metabolitos secundarios, en su mayoría compuestos orgánicos y sintetizados por el micobionte (Elix y Stocker Worgotter, 2008).

Los metabolitos primarios tienen como función asegurar el crecimiento, desarrollo y reproducción del líquen. Se encuentran en el protoplasto y en las paredes celulares. Dada su solubilidad, se extraen con agua hirviendo (Goga y col., 2019). Datos procedentes de la literatura científica indican que los polisacáridos representan del 3 al 5% del peso seco del talo liquénico, los compuestos nitrogenados desde un 1,6% hasta un 11,4% y los carotenoides entre 1,5 y 24 mg/g de peso seco. (Hale, 1983; Culberson, 1970).

Los metabolitos secundarios desempeñan funciones esenciales en el líquen. Son compuestos extracelulares, ya que una vez sintetizados quedan depositados en la superficie de las hifas fúngicas, en el córtex o en la médula. Constituyen entre el 0,1%-10% del peso seco del talo, llegando en algunos casos hasta un 30% (Galun y Shomer-Ilan, 1988). Los precursores de estos compuestos orgánicos son sintetizados en forma de poliol o glucosa gracias al proceso fotosintético del simbionte autótrofo. Si bien ciertos metabolitos secundarios han sido identificados en las formas de vida libre de los conformantes del líquen y en plantas superiores, la mayoría de ellos son específicos y únicos, puesto que las interacciones y comunicación entre los simbiontes influye en su producción (Calcott y col., 2018; Brunauer y col., 2007). Algunos tipos de dépsidos, como el ácido rosmarínico, han sido identificados en plantas superiores, especialmente de la familia Lamiaceae, concretamente en *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha* spp. o *Melissa officinalis* L. (Amoah y col., 2016).

La primera clasificación de la composición química de los líquenes fue establecida en el año 1954 por Asahina y Shibata, organizada en función de las rutas biosintéticas conocidas hasta entonces. Años más tarde, Culberson y Elix, en el año 1989 modificarían esta clasificación, estableciendo una clara separación en tres grupos principales: compuestos sintetizados a través la ruta del acetato-polimalonato, a través de la ruta del ácido mevalónico o a través de ruta del ácido shikímico (Elix y Stocker-Worgotter, 2008).

Los avances en las técnicas para la identificación y caracterización fitoquímica han permitido ampliar el número de metabolitos secundarios conocidos, alcanzando, en la actualidad, un número superior a 1000. Encontramos desde los primeros métodos basados en reacciones colorimétricas con soluciones de yodo, hidróxido de potasio (K) e hipoclorito de calcio (C) (Nylander, 1866) o las técnicas de microcristalización (Asahina y Shibata, 1954) hasta el desarrollo de técnicas cromatográficas, espectroscópicas y microscópicas de gran calibre. Sería en la segunda mitad del siglo XX cuando se introduciría la técnica de cromatografía en capa fina (TLC), que pasaría a ser el método preferente, posteriormente sería estandarizado y acoplado a bases de datos computarizadas (Elix y col., 1988). La verdadera revolución llegaría con la introducción de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) ya que permite, tanto la identificación de los metabolitos mayoritarios como la identificación y cuantificación de muestras de pequeño volumen y compuestos traza. Además, acoplado a métodos como la espectrometría de masas (LC-MS), la resonancia magnética nuclear de protón o ^{13}C ($^1\text{H-RMN}$ o $^{13}\text{C-RMN}$) o la cristalografía de rayos X permite el análisis estructural del metabolito (Elix y Stocker-Worgotter, 2008).

2.1.4.2 Metabolitos secundarios y su ruta biosintética

Siguiendo la clasificación inicial de Culberson y Elix hasta las últimas versiones propuestas por Muller (2001) y Stocker Worgotter (2014), y sumado a la incorporación de los metabolitos identificados en estos últimos cincuenta años, la clasificación actual sería la siguiente:

Derivados de la vía del acetato-polimalonato

Constituyen el grupo mayoritario de metabolitos secundarios. Como se indicará de manera más extensa en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, esta ruta es la responsable de la síntesis de los metabolitos secundarios liquénicos más representativos y peculiares de los líquenes, ya que algunos de ellos sólo están presentes en estas especies; estos compuestos reciben el nombre de poliquétidos. Partiendo de esta vía de síntesis podemos distinguir una serie alifática de compuestos tales como el ácido caperático o protoliquesterénico (**ácidos alifáticos** formados por una unidad de acetyl-CoA y sucesivas unidades de malonil-CoA) y una serie dominante de compuestos aromáticos. Entre estos últimos destacan las depsidonas, los dépsidos, los tridépsidos, los dibenzofuranos y el ácido úsnico y sus derivados. Además, otros compuestos aromáticos, no exclusivos de líquenes y presentes en otras especies fúngicas o vegetales tales como las antraquinonas, xantonas, cromonas o naptoquinonas son sintetizados también a través de esta ruta.

En términos generales, la condensación de unidades de acetyl-CoA y malonil-CoA, y su posterior ciclación por la acción de las poliquétido sintasas (PKSs) dará lugar a la formación del ácido orselínico o β -orselínico (precursor de dépsidos, tridépsidos, depsidonas y dibenzofuranos) (Culberson, 1964) y a la metilfloroacetofenona (precursor de ácido úsnico) (Calcott y col., 2018). El primero de ellos se sintetizará por condensación aldólica mientras que en el segundo caso tendrá lugar una reacción de condensación de Claisen (Goga y col, 2018). Estas rutas biosintéticas se analizarán en profundidad en las **publicaciones 1 y 2 del capítulo 1** dado que estos grupos de compuestos desempeñan importantes actividades farmacológicas.

Atendiendo a la descripción de su estructura química se incluyen (**Figura 9**):

Los **dépsidos y tridépsidos** están formados por la condensación de dos o más unidades de orcinol y/o β -orscinol, mediante enlace éster. Esta condensación puede dar lugar a diversas estructuras: paradépsidos, metadépsidos, β -orscinol paradépsidos, β -orscinol metadépsidos o orcinol- β -orscinol dépsidos, que posteriormente sufrirán una serie de variaciones en el grado de metilación de sus grupos -OH, -COOH, en su grado de oxidación o en la longitud de sus cadenas alquílicas. Estas variaciones serán las responsables de que este grupo de metabolitos secundarios,

que incluye más de 100 estructuras, sea uno de los más abundantes (Ibrahim y col., 2021). Destacamos dépsidos como la atranorina, el ácido lecanórico, el ácido girofórico y el ácido evérnico, entre otros.

Las **depsidonas** son poliquétidos sintetizados por ciclación intramolecular entre un radical fenoxilo y uno arilo de un paradépsido mediante enlace éter. Se ha propuesto la hidroxilación, la migración del grupo acilo, el reordenamiento SMILES y la esterificación como pasos claves en su biosíntesis (Stocker-Wörgötter, 2014). En este grupo de sustancias líquénicas encontramos el ácido alectorónico, el ácido protocetrárico, el ácido estíctico o el ácido constíctico, entre otros.

Por otro lado, los **dibenzofuranos**, como el ácido didímico o isotrepsílico, se sintetizan a partir de orcinol o β -orcinol, como las estructuras ya presentadas, mientras que el **ácido úsnico**, que en ocasiones se engloba dentro del grupo de los dibenzofuranos, debido a su estructura química, está constituido por la condensación entre dos unidades metilfloroacetofenona (Millot y col., 2016).

Por último, entre los derivados de esta ruta, no exclusivos de especies líquénicas destacamos las **quinonas**, pigmentos producidos por las hifas del córtex superior y que desarrollan una función fotoprotectora para el líquen. Encontramos antraquinonas (ej. averantina identificada en *Solorina crocea* (L.) Ach.), xantonas (ej. ácido secalónico en *Pseudoparmelia* sp), antronas (ej. crisofanol en *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad.), o naptoquinonas (ej. hibocapona en *Lecanora hypercarpa* (Tuck.) Brodo) (Elix y Nash, 1997; Stocker-Wörgötter, 2014).

Derivados de la vía del ácido mevalónico

Esta vía es la responsable de la síntesis de terpenos y esteroides. Utilizando acetyl-CoA como iniciador, y tras una serie de reacciones sucesivas de condensación y reducción, da lugar al ácido mevalónico, a partir del cual se sintetizarán los precursores de los **terpenos**, los ésteres difosfato (dimetilalil pirofosfato e isopentenil pirofosfato). Estos precursores serán responsables de la síntesis de monoterpenos como el limoneno en *Evernia prunastri* (L.) Ach, diterpenos como el fitol, o triterpenos como la zeorina presente en especies del género *Lecanora* spp. (en niveles de 1,32 mg/mg de peso seco), considerado el terpeno principal y más abundante entre las especies líquénicas (Goga y col., 2019; Sato y col., 2011).

Con relación a los **esteroides** se han identificado diversas moléculas como el ergosterol o liquesterol, siendo el primero el más abundante (Goga y col., 2019).

Derivados de la vía del ácido shikímico

Finalmente, el último grupo mayoritario de metabolitos secundarios deriva de la vía del ácido shikímico. Si bien las rutas anteriores tenían como inicio una molécula de acetil-CoA, en este caso será a través del acoplamiento entre el fosfoenolpiruvato y la D-eritrosa 4 fosfato. Además, en su síntesis se requiere de aminoácidos como la fenilalanina o el triptófano. Recibe este nombre ya que la ruta tiene como intermediario el ácido shikímico. Finalmente, a través de una serie de reacciones secuenciales se sintetizarán las **terfenilquinonas** (como el ácido polipórico) y los **derivados del ácido pulvínico**. En este último grupo encontramos compuestos tales como el ácido vulpínico en *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai. o el ácido rizocárpico, característico de especies del género *Rhizocarpon* (Stocker-Worgotter y col., 2014).

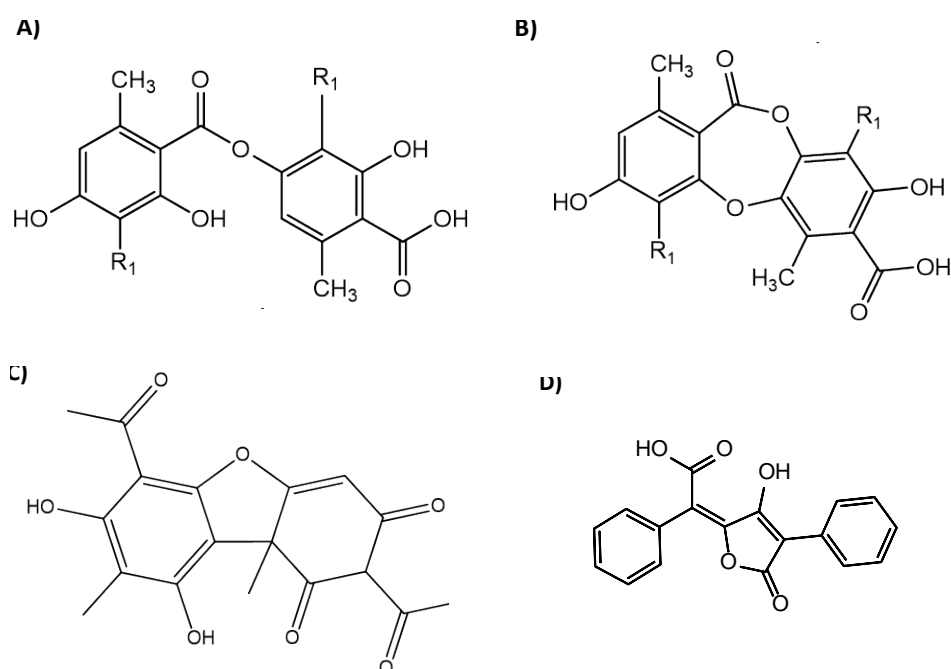


Figura 9. Estructuras químicas de los principales grupos de metabolitos liquénicos secundarios: A) dépsidos, B) depsidonas, C) tipo dibenzofurano, D) ácido pulvínico

2.1.4.3 Enzimas poliquétido sintasas (PKS)

A pesar del elevado número de compuestos específicos sintetizados por los líquenes, su velocidad de crecimiento máxima es muy lenta, con valores, dependiendo de la especie de 0,5 a 8 mm al año (Hale, 1973). Además, su ratio de crecimiento máximo varía, dependiendo de factores como la temperatura, la humedad, y el clima, ya que determinarán el periodo fotosintéticamente más activo (Seminara y col., 2018). Por ello, en el estudio del potencial farmacológico de estas moléculas existen obstáculos técnicos y biológicos relacionados con el

nivel de producción de estos metabolitos prometedores. La aplicación de técnicas metagenómicas y el estudio de las enzimas encargadas de su síntesis y de los genes que las codifican permiten avanzar en el descubrimiento de nuevos metabolitos liquénicos y aumentar su producción vía heteróloga, en organismos de rápido crecimiento (ej. producción del dépsido ácido lecanórico en *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen) (Kealey y col., 2021).

El grupo más estudiado de compuestos pertenece a aquellos derivados de la vía del acetato-polimalonato, los poliquétidos, y las enzimas encargadas de su síntesis reciben el nombre de poliquétido sintasas.

Los genes que participan en la síntesis de los metabolitos secundarios se encuentran habitualmente de manera secuencial en un tramo del genoma constituyendo lo que se conoce como clúster de genes biosintéticos (BCG). El clúster está constituido por un gen central y una serie de genes accesorios. Así, el gen que codifica la enzima poliquétido sintasa será el gen central del clúster PKS, mientras que los genes accesorios codificarán para enzimas responsables de modificaciones, regulación o transporte de la molécula (Singh, 2023).

Las poliquétido sintasas son enzimas multidominio y se dividen en PKS no reductoras (NRPKS), parcialmente reductoras (PRPKS) o reductoras (HRPKS) según los dominios presentes. En todas ellas encontramos los dominios esenciales para la síntesis de poliquétidos, que son el quetoacil sintasa (KS), acil-transferasa (AT), y la proteína transportadora de acilos (ACP), responsables de la condensación descarboxilativa y la formación del intermediario β -quetoacil-ACP. En el caso de las HRPKS se encuentran además dominios reductores como cetorreductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoilreductasa (EnR), responsables de la versatilidad química de estas moléculas (Sabatini y col., 2018; Stocker-Worgotter, 2008). Los compuestos liquénicos se sintetizan a través de PKS no reductoras clasificadas en grupos (del grupo I derivados del orcinol, del grupo VI derivados de dibenzofurano (ácido úsnico) y del grupo IX derivados del β -orcinol) (Lui y col., 2015; Singh, 2023).

El estudio de los genes que codifican PKS, ha permitido, no sólo avanzar en la expresión heteróloga de PKS fúngicas en otros organismos, sino que además estas secuencias génicas han sido utilizadas en estudios filogenéticos debido a que el dominio KS es altamente conservado (Grube y Blaha, 2003). Recientemente se ha propuesto una filogenia basada en PKS fúngicas, con 624 secuencias, confirmando que los genes PKS existentes superan en número a los metabolitos secundarios conocidos (Gerasimova y col., 2022).

2.1.5. Taxonomía y filogenia

Para establecer un marco organizativo que permita comprender y clasificar el gran número de especies liquénicas, que oscila entre 17.000 y 20.000, la taxonomía desempeña un papel esencial. En el año 1753, Linneo incluyó en su clasificación botánica 80 líquenes, que formarían el género *Lichen* (Linneaus, 1753). Más tarde, Acharius, considerado el padre de la liquenología, se encargaría de ampliar esta clasificación describiendo nuevas especies y reorganizándolas en 40 géneros diferentes (Acharius, 1814). El descubrimiento, en el año 1867, de la naturaleza dual de este organismo haría replantearse el sistema de clasificación y nomenclatura, apareciendo dos corrientes (Nageli y Schwendener, 1867). Por un lado, la escuela centroeuropea mantenía los líquenes como grupo separado de los hongos mientras que la escuela americana instaba a integrar a los líquenes en la clasificación fúngica, aunque en ambos casos el liquen recibiría el nombre del organismo micobionte (Lucking y col., 2021). Actualmente, la clasificación taxonómica y filogenética del liquen está integrada en la clasificación de los hongos.

Los métodos tradicionales han permitido la descripción y clasificación de especies durante más de 250 años. Además, los líquenes presentan una compleja historia evolutiva, ya que en algunos casos no comparten un origen común (grupo monofilético), sino que presentan hasta cinco orígenes diferentes (Gargas y col., 1995). Con la entrada de técnicas moleculares del DNA *barcoding* (código de barras molecular) el concepto de clasificación clásico basado en criterios morfológicos, fisiológicos y anatómicos ha pasado a un segundo plano. Ambos abordajes presentan sus ventajas y desventajas, y es por ello por lo que en los últimos años se aboga por una forma de taxonomía y filogenia integrativa (Sheth y Thaker, 2017), donde las técnicas moleculares tienen un peso fundamental.

Mientras que en muchos casos las técnicas del DNA *barcoding* han confirmado la hipótesis planteada a través de la taxonomía basada en el fenotipo, la existencia de familias liquénicas como *Parmeliaceae* o *Graphidaceae* con un alto número de las llamadas “especies crípticas” ha generado clasificaciones erróneas que sólo han sido visibles con el uso de estas técnicas moleculares (Sohrabi y col., 2014). En algunos casos, organismos con formas morfológicas distintas pero pertenecientes a la misma especie habían sido clasificados como diferentes, o bien especies parecidas a nivel morfológico habían sido englobadas en un mismo individuo (Divakar y col., 2015).

La herramienta de identificación de especies conocida como DNA *barcoding* utiliza una secuencia de ADN una región del genoma que abarca uno o varios genes específicos, presentes en todos los organismos, para proporcionar información a nivel de especie (Kress y Erickson,

2008). Tras amplificar, mediante el uso de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), las secuencias diana y su posterior secuenciación, estas se compararán con bases de datos de referencia, como es el caso del Genbank (Kelly y col., 2011). Entre las secuencias nucleotídicas utilizadas en estudios de taxonomía y filogenia de líquenes se destacan por un lado la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande del ADN ribosomal, las cuales al ser regiones conservadas en hongos permiten la identificación y clasificación a niveles taxonómicos superiores (familia o/y superiores). Por otro lado, se encuentran las regiones del espaciador transcrito interno (ITS), las cuales son variables en hongos y permiten evaluar la filogenia a nivel de género y especie y, finalmente las regiones PKS, antes mencionadas (Ihlen y Ekman, 2002; Kelly y col, 2011; Thell y col., 2002; Shishido y col., 2021).

Estudios comparativos realizados por Schoch y colaboradores destacaron la región ITS como el marcador más efectivo, proponiéndolo como principal marcador fúngico al “Consortium for the Barcode of Life” (Schoch y col., 2012). Desde ese momento hasta la actualidad la región ITS ha sido aceptada como el marcador de código de barras estándar para hongos. Además, en los últimos años la comunidad científica ha aumentado considerablemente el número de especies identificadas utilizando esta región del genoma, existiendo bases de datos con un extenso volumen de información (Badotti y col., 2017).

2.2. Líquenes del clado cetrarioide

2.2.1. Familia Parmeliaceae

Las especies líquénicas utilizadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral pertenecen al clado cetrarioide, uno de los siete linajes monofiléticos que constituyen la familia Parmeliaceae. (Crespo y col., 2007).

Entre los aproximadamente 60 órdenes de líquenes de la división Ascomycota, la familia de líquenes parmeliáceos pertenece al orden Lecanorales. Esta familia es la más numerosa englobando unas 2.800 especies en alrededor 80 géneros diferentes (Crespo y col., 2011). La familia Parmeliaceae se caracteriza por presentar una distribución geográfica cosmopolita encontrando especies en los dos hemisferios, desde regiones templadas a zonas polares (Divakar y col., 2019). De manera primigenia se establece la distribución de esta familia en regiones del hemisferio sur, en zonas del sur de África, de América y de Australia. Con el aumento del estudio y de las expediciones de recolección se han encontrado especies en regiones templadas y tropicales (Thell y col., 2012).

En la actualidad, a través de estudios filogenéticos se pretende comprender qué eventos climáticos y geológicos fueron los responsables de los actuales patrones de distribución (Divakar y col., 2019). Además, esta familia presenta una elevada diversidad de formas de crecimiento y un linaje más joven. Estudios moleculares sitúan el origen de esta familia hace 102 millones de años con un crecimiento notable de especiación hace 20-25 millones de años, coincidiendo con el aumento de temperaturas en el Oligoceno tardío (Kraichak y col., 2015).

La búsqueda del origen y la diversificación de los distintos clados se encuentra con el hándicap de la escasez de muestras fósiles de especies líquénicas (Amo de Paz y col., 2011). Hasta el momento se han establecido siete clados principales: parmelioides (con mayor número de representantes), usneoide, hipogimnioide, alectorioides, psiloparmelioides, anzioides y el cetrarioide. Se puede inferir de los distintos estudios que los periodos clave para la diversificación de los linajes principales de Parmeliaceae fueron el Paleoceno, el Eoceno y el Oligoceno, mientras que la especiación subsiguiente ocurrió principalmente durante el Oligoceno y el Mioceno. La diversificación del clado parmelioides (el mayor y más estudiado) está establecido hace aproximadamente 60 millones de años, mientras que el origen del clado cetrarioide data de hace 37 millones de años, con la división inicial de los géneros *Melanelia* y *Esslingeriana* (Divakar y col., 2015; Abbas y Guo, 2015; Amo de Paz y col., 2011).

Atendiendo a la morfología, esta familia presenta formas de crecimiento muy heterogéneas encontrando líquenes crustáceos, foliosos o fruticulosos. Las similitudes en términos morfológicos se encuentran a nivel microscópico, ya que presentan una ontogenia (morfogénesis) común del ascoma (cuerpo fructífero que contiene ascos o esporangios) así como la anatomía característica del mismo (Crespo y col., 2007). A nivel de clado, los líquenes alectorioides presentan formas fruticosas con hifas dispuestas de manera paralela, y ascoporas pigmentadas (Esslinger, 1989). Los líquenes anzioides tienen un talo folioso con ascos poliesporados y ascoesporas curvadas (Poelt, 1973) y los líquenes hipogimnioides presentan talos foliosos sin presencia de rizinas. Por otro lado, los líquenes parmeliáceos se caracterizan por presentar un talo folioso con picnidios y apotecios laminales (de Priest, 1999) mientras que los líquenes del clado usneoide tienen un talo fruticuloso. Por último, los líquenes cetrarioides, clado objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, presentan talos de folioso a subfruticulosos con picnidios y apotecios marginales (Karnefelt y col., 1992).

Cabe mencionar que, además, la diversidad química de esta familia ha permitido que los líquenes parmeliáceos sean una de las fuentes de metabolitos secundarios más importantes con notables actividades farmacológicas, como se podrá observar en el **capítulo 1** de este trabajo.

El análisis de los principales compuestos liquénicos identificados en estos líquenes estará enfocado en el clado cetrarioide.

2.2.2. Clado cetrarioide

El clado cetrarioide ha estado sujeto a numerosos estudios taxonómicos en los últimos años, resultando de notable dificultad una resolución filogenética definitiva. El número de géneros tiene una tendencia a la baja, pero los ajustes basados principalmente en estudios moleculares siguen y seguirán variando la estructura general del clado (Thell y col., 2009; Nelsen, 2011; Divakar y col., 2017). Algunos géneros con morfología cetrarioide han sido posicionados fuera del clado tras estudios filogenéticos.

En la actualidad se mantiene que el clado cetrarioide está formado por diecisiete géneros y aproximadamente 90 especies de líquenes: *Ahtiana*, *Allocetraria*, *Arctocetraria*, *Cetraria*, *Cetrariella*, *Cetrelia*, *Cetreliaopsis*, *Dactylina*, *Esslingeriana*, *Flavocetraria*, *Kaernefeltia*, *Masonhalea*, *Melanelia*, *Nephromopsis*, *Tuckermanella*, *Tuckermannopsis*, *Usnocetraria* y *Vulpicida* (Thell y col., 2012; Thell y col., 2009) (Figura 10).

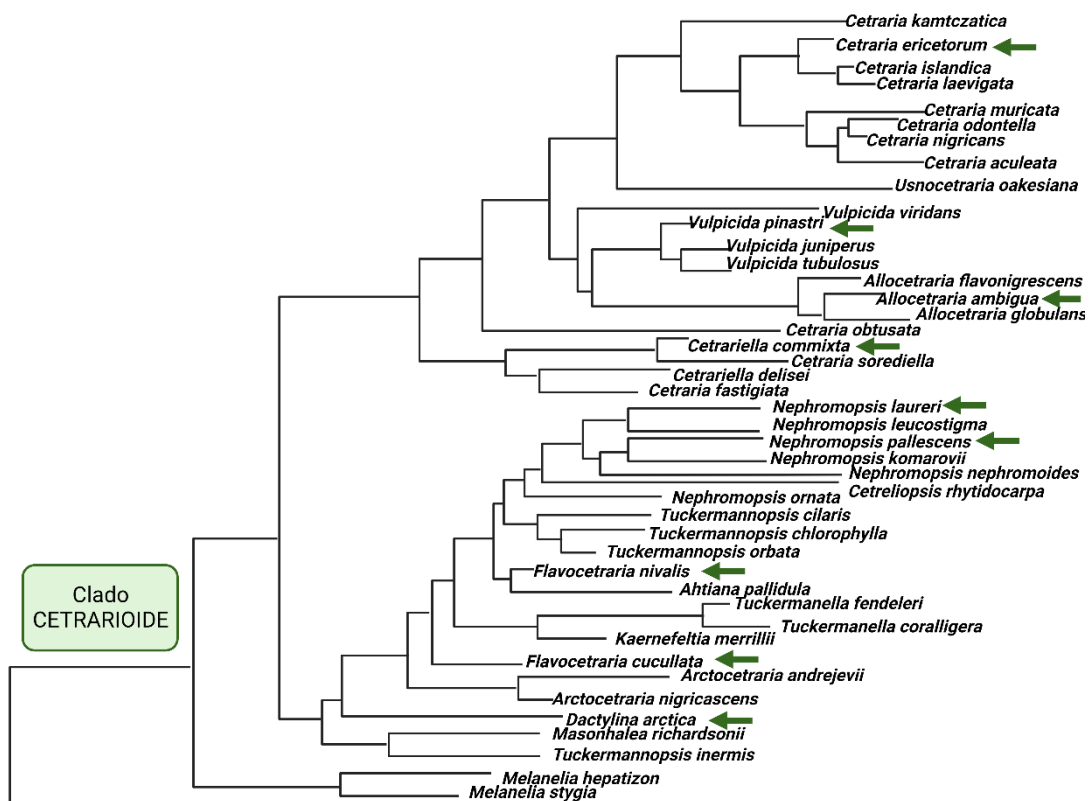


Figura 10. Adaptación de la clasificación filogenética propuesta por Thell y colaboradores (2012) a través del estudio molecular de representantes de los diversos géneros conformantes del clado cetrarioide. Las flechas verdes hacen referencia a nueve de las catorce especies liquénicas utilizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. (Imagen creada con BioRender.com)

Estos géneros se han clasificado en cinco subclados: *Esslingeriana*, *Dactylina*, *Melanelia*, *Cetraria* y *Nephromopsis*, siendo estos últimos los más antiguos y de mayor tamaño (Thell y col., 2012). Estudios recientes propusieron reunificar todos los géneros y dividirlos en estos dos grandes subclados (Divakar y col., 2017).

A nivel morfológico y geográfico, estos dos grandes grupos presentan diferencias. La mayoría de las especies del subclado *Cetraria* presentan un talo liquénico folioso o subfruticuloso marrón o amarillo verdoso, dorsiventral con apotecios y picnidios marginales, ascosporas elipsoides, encontrando especialmente ejemplares en Europa e Himalaya. Por otro lado, el subclado *Nephromopsis* engloba ejemplares con talo folioso de color amarillo, o amarillo grisáceo, dorsiventral con apotecios y picnidios marginales, con ascosporas globosas o subglobosas, con especial representación en regiones occidentales de América del Norte y del este de Asia (Divakar y col., 2017).

En términos de fitoquímica, se han revisado los diferentes géneros constituyentes del clado, identificando representantes de metabolitos secundarios de los grandes grupos de compuestos. Ácidos alifáticos tales como el ácido caperático o los ácidos liquesterénico y protoliquesterénico están presentes en la mayoría de los géneros. En algunas especies del género *Nephromopsis* se han identificado ácidos alifáticos propios como el nefrosterínico o isonefrosterínico. Dépsidos como el ácido fumarprotocetrárico, protocetrárico (*Cetraria*, *Allocetraria*, *Cetrelia*), o tridépsidos, como el ácido girofórico (*Dactylina* y *Cetrariella*). Depsidonas como el ácido alectorónico y colatólico (*Tuckermannopsis* y *Masonhalea*) o derivados de la ruta del ácido shikímico como el ácido pinástrico y vulpínico (género *Vulpicida*). El ácido úsnico, de estructura tipo dibenzofurano y el compuesto más estudiado desde el punto de vista farmacológico, está presente en muchos de los géneros de este clado (*Ahtiana*, *Allocetraria*, *Dactylina*, *Nephromopsis*, etc) (Tabla 2).

Tabla 2. Metabolitos secundarios identificados en especies de los distintos géneros del clado cetrarioide.

Géneros	Metabolitos secundarios	REF
<i>Ahtiana</i>	Ácidos caperático, liquesterénico, protoliquesterénico y úsnico.	Thell y col.,1995
<i>Allocetraria</i> #	Ácidos caperático, liquesterénico, protoliquesterénico y úsnico. Ácidos fumarprotocetrárico* y protocetrárico*	Wang y col.,2015 Rai y col.,2013
<i>Artocetraria</i>	Ácidos norrangifórmico y rangifórmico.	Xu y col., 2016 Brodo, 2016
<i>Cetraria</i> #	Ácidos liquesterénico, protoliquesterénico y fumarprotocetrárico* y protocetrárico*	Rai y col.,2013
<i>Dactylina</i> #	Ácidos girofórico, úsnico, barbático y fisódico	Thomson y Bird, 1978

<i>Esslingeriana</i>	Atranorina	Thell y col.,2012 Øvstedal y col.,2009
<i>Flavocetraria</i>#	Ácidos úsnico, liquesterénico*, protoliquesterénico*, baeomicésico* salazínico* y escuamático*.	Xu y col., 2016 Shrestha y col.,2014 Bjerke y col 2004 Nguyen y col 2014
<i>Cetrariella</i>#	Ácidos girofórico e hiascico o ácidos alectorónico y colatólico	Thell y col.,2009 Øvstedal y col.,2009 Szczepańska,2017
<i>Cetrellopsis</i>	Ácidos liquesterénico, protoliquesterénico, úsnico, salazínico, fumarprotocetrárico* y protocetrárico	Thell y col.,2009
<i>Kaemefeltia</i>	Ácidos liquesterénico y protoliquesterénico	Thell y col.,2009
<i>Melanelia</i>	Atranorina, cloroatranorina, ácidos caperático, constíctico, estíctico, norstíctico, criptostíctico, menegazziaico o ácidos perlatólico y estenospórico	Xu y col., 2016 Shrestha y col.,2014 Hale y col.1989
<i>Masonhalea</i>	Ácidos alectorónico o ácidos liquesterénico y protoliquesterénico	Thell y col.,2009 Hale y col.1989
<i>Nephromopsis</i>#	Ácidos liquesterénico, protoliquesterénico y úsnico. Ácidos constíctico*, estíctico*, isonefrosterínico* nefrosterínico*. fumarprotocetrárico* anziaico*, olivetólico*, caperático* alectorónico* y α -collatólico*.	Xu y col., 2016 Shrestha y col.,2014 Mishra y Upreti, 2015 Wang y col.2018
<i>Tuckermanella</i>	Ácidos caperático y alectorónico*.	Xu y col., 2016
<i>Tuckermannopsis</i> #	Ácidos alectorónico, colatólico, olivetólico*, liquesterénico, y protoliquesterénico	Xu y col., 2016 Shrestha y col.,2014 Mishra y Upreti, 2015
<i>Usnocetraria</i>	Ácidos caperático, liquesterénico, protoliquesterénico, secalónico y úsnico.	Klepsland y Timdal, 2010 Thell y col.,2009
<i>Vulpicida</i>#	Ácidos pinástrico, vulpínico y úsnico.	Fernández Moriano y col. 2015 Thell y col.,2009

Leyenda. El símbolo # se ha utilizado para indicar los géneros de las especies incluidas en esta Tesis Doctoral. El símbolo * se ha utilizado para indicar que la presencia de ese compuesto varía según la especie.

2.2.3 Especies líquénicas utilizadas en el desarrollo de la Tesis Doctoral

El interés por el uso de líquenes para diversos fines ha crecido en las últimas décadas. Además de líquenes frescos recolectados en zonas determinadas, muchos estudios utilizan muestras líquénicas conservadas en herbarios. Diversos estudios han confirmado que los especímenes de herbario no presentan una pérdida significativa de metabolitos secundarios, puesto que una vez formados, los cristales de estos compuestos son muy estables (Goga y col., 2018).

Resulta relevante destacar que las continuas fluctuaciones en los ámbitos de la taxonomía y la filogenia han ocasionado una significativa cantidad de modificaciones nominales, lo cual se

traduce en la existencia de diversas referencias bibliográficas que aluden a una misma especie con diferentes denominaciones, fenómeno conocido como sinonimia. En el marco del clado cetrarioide, las especies elegidas exhiben rasgos distintivos que se describen a continuación:

Allocetraria ambigua (C. Bab.) Kurok & M.J.Lai. Presenta un talo liquénico folioso de suberecto a erecto, amarillo pálido, de superficie lisa o ligeramente rugosa con ricinas escasas. Destaca por la anchura de sus lóbulos cóncavos (hasta 3 mm). Presenta pseudocifelas, apotecios y picnidios marginales, ascos clavados y ascosporas elipsoides. El córtex superior mide aproximadamente 30 μm y la médula 120-160 μm . Presenta ácido úsnico en el córtex y ácidos liquesterénico y protoliquesterénico en la médula. Es un líquen endémico de la región del Himalaya (Randlane y Saag, 1993; Thell y col., 1995).

Asahinea scholanderi (Llano), que también recibe el nombre de *Cetraria scholanderi* (Llano). Presenta un talo liquénico folioso con lóbulos de 12 mm de ancho en forma de roseta, parte superior de color blanquecino moteado en negro e inferior de color negro. Carece de pseudocifelas, apotecios y ricinas. Picnidios de pequeño tamaño, conidios de morfología curvada. El córtex superior mide entre 18-26 μm , la médula entre 65-240 μm y el córtex inferior entre 16-26 μm . Las ascosporas tienen forma subgloboide-ovalada. Presenta ácido alectorónico, α -colatólico y atranorina. Crece sobre rocas y suelo, en zonas alpinas de regiones del norte de América y Siberia (Thomson, 1984; Goward y col. 1994).

Cetraria commixta (Nyl.) Th. Fr. También conocida como *Cetrariella commixta* (Nyl.) A. Thell & Kärnefelt. Este líquen folioso dorsiventral adopta forma de rosetas de gran tamaño (hasta 15 cm). Sus lóbulos alargados presentan forma convexa. De color marrón a marrón negruzco, con pseudocifelas de pequeño tamaño, ricinas dispersas, apotecios situados en la punta de los lóbulos y conidios cilíndricos. Esta especie presenta ascosporas elipsoides. Contiene ácido alectorónico y colatólico. Es un líquen circumpolar que crece sobre rocas, especialmente en zonas frías y húmedas de América del Norte (Thomson, 1984).

Cetraria crespoae (Barreno & Vázquez) Karnefelt. Presenta talo liquénico fruticuloso, erecto y rígido, de color marrón oliva con ramificaciones dicotómicas y abundantes espinas. Tiene pseudocifelas abundantes y ovales, apotecios terminales ligeramente convexos, ascos de 8 esporas, cilíndrico-clavados con ascosporas unicelulares globosas o subglobosas, conidios de forma oval o cilíndrica y picnidios inmersos en las espinas. No se ha reportado información sobre sus metabolitos secundarios. Crece sobre arbustos, especialmente en las ramas de coníferas en regiones de la Península Ibérica, sur de Francia y Cerdeña (Barreno y Vázquez, 1993).

Cetraria cucullata (Bell.) Ach. Esta especie con el uso de técnicas moleculares fue clasificada como *Flavocetraria cucullata* (Bell.) Karnefelt & Thell, del género *Flavocetraria*. Presenta un talo liquénico fruticuloso de color amarillo verdoso, de aspecto rugoso con conidios bifusiformes. Sus ascosporas son elipsoidales. Como metabolitos secundarios, presenta ácido protoliquesterénico y ácido úsnico. Crece en suelo, detritos, hojas y musgos en regiones del hemisferio norte (Lai y col., 2009).

Cetraria ericetorum (Opiz). Esta especie tiene un talo fruticuloso de color marrón con base rojiza y lóbulos de 0,5 a 8 mm de ancho, de forma redondeada a fusiforme. Presenta abundantes pseudocifelas en los márgenes, apotecios frecuentes, picnidios laminares o marginales y conidios sésiles. Sus ascosporas son elipsoides. Entre sus metabolitos secundarios se destacan los ácidos protoliquesterénico y liquesterénico. Crece sobre el suelo y sobre musgo en regiones templadas de América del Norte, tanto en altitudes bajas como en zonas alpinas. (Nash y col., 2002).

Cetraria nivalis (L.) Ach. Esta especie con el uso de técnicas moleculares fue clasificada como *Flavocetraria nivalis* (L.) Karnefelt & Thell, del género *Flavocetraria*. Presenta un talo liquénico fruticuloso de color amarillo verdoso, de aspecto liso (principal diferencia con *C. cucullata*) con conidios bifusiformes. Sus ascosporas son elipsoides. Comparte metabolitos secundarios y distribución geográfica con *C. cucullata* (Lai y col., 2009; Kärnefelt y Thell. 1994).

Dactylina arctica (Hook) Nyl. Presenta un talo fruticuloso de color amarillo pálido, con ramificaciones abundantes. Debido a su característica morfología en forma de dedo recibe el nombre de liquen “dactilar”. Tiene un talo secundario prominente denominado podentia. Entre sus metabolitos secundarios se destaca el ácido úsnico y el ácido girofórico. Es un liquen ártico que crece en zonas de tundra, en musgos y en zonas circumpolares, desde Alaska hasta Washington (Thomson y Bird, 2011; Walker y col., 1989).

Nephromopsis laureri (Kremp. Kurok). Esta especie liquénica presenta un talo folioso dorsiventral sorediado con soredios marginales e isidios ausentes. Su superficie superior es de color verde amarillento y su superficie inferior va de blanco a marrón pálido. Presenta pseudocifelas redondeadas y blancas y ricinas bifurcadas. La presencia de apotecios es infrecuente. Sus ascos están clavados y sus ascosporas unicelulares son subglobosas. A nivel fitoquímico se han identificado ácidos grasos como liquesterénico y protoliquesterénico en la médula y ácido úsnico en el córtex. Crece en cortezas de árboles de zonas montañosas de regiones de Centroeuropa, Asia y América central y del Sur (Randlane y Saag, 2007; Thell y col., 2005).

Nephromopsis pallescens (Schaer.) Y.S. Park. Presenta un talo dorsiventral con lóbulos anchos de 8 a 15 mm, de color amarillo verdoso en su cara superior, y blanquecino en la inferior. En esta especie las pseudocifelas se encuentran en la cara inferior y presenta apotecios laminales pequeños y numerosos. Contiene ácido úsnico en el córtex y ácidos alectorónico, liquesterénico y protoliquesterénico en la médula. Crece en las cortezas de los árboles de bosques montañosos de altitudes medias y elevadas. Se encuentra especialmente en el continente asiático, en zonas meridionales (China, India, Japón, Rusia y Tailandia) (Randlane y col., 1995; Randlane y Saag, 2007).

Nephromopsis stracheyi (C.Bab.) Müll. Arg. Este líquen presenta un talo folioso grueso con lóbulos de unos 3 cm de ancho. De color verdoso o gris amarillento en su cara superior y marrónáceo en su cara inferior. Tiene pseudocifelas ovales o redondeadas. Además, presenta ricinas simples y escasas, picnidios poco habituales y marginales, picnoconidios bifusiformes y apotecios marginales, de gran tamaño. Sus ascosporas son elipsoides. Respecto a sus metabolitos secundarios, presenta ácido úsnico en el córtex y según su quimiotipo, ácido olivetórico (quimiotipo I) y ácido anziaico (quimitipo II). Crece en las cortezas de los árboles en regiones meridionales de Asia (India, Taiwan, China y Nepal). (Randlane y Saag, 1998; Randlane y Saag, 2007).

Tuckermannopsis americana (Spreng) Hale. Su talo liquénico es folioso con lóbulos de entre 1 y 4 mm de ancho, de color marrón pálido o verdoso. Presenta pseudocifelas dispersas y carece de soledios. Sus picnoconidios tienen forma bifusiforme. Sus ascosporas son globosas. Presenta ácido alectorónico y colatólico en la médula y en ocasiones atranorina en el córtex. Crece en bosques de coníferas en regiones orientales de Norte América. También ha sido recolectado en Europa y zonas del norte de Asia (Lai y col., 2009; Esslinger y Egan, 1995).

Tuckneraria ahtii (Randlane & Saag). Actualmente su nombre aceptado es *Nephromopsis ahtii* (Randlane & Saag) Randlane & Saag. Líquen folioso de color pálido o marrón amarillento con lóbulos de redondeados a elongados. Apotecios marginales, ascosporas subglobosas, picnidios marginales y numerosos y picnoconidios bifusiformes. Puede presentar ácido úsnico en el córtex y ácidos liquesterénico, protoliquesterénico y en ocasiones caperático en la médula. Crece en cortezas de coníferas en regiones meridionales y orientales de Asia. (Randlane y col., 1994).

Vulpicida pinastri (Scoop) Mattsson & M. J. Lai. Presenta un talo liquénico foliáceo con lóbulos de 1,5 mm de ancho formando rosetas, de color amarillo verdoso o amarillo y de aspecto liso. Carece de pseudocifelas y escasas ricinas. Los apotecios y picnidios son de presencia rara.

Los ascos son clavados y las ascosporas son casi esféricas. En términos de su fitoquímica presenta ácido úsnico en el córtex y ácidos vulpínicos y pinástricos, así como triterpenos (zeorina) en la médula. Crece en las cortezas de los árboles de regiones montañosas continentales del hemisferio norte (Lai y col., 2009; Nash y col., 2002).

Las imágenes de cada una de estas especies líquénicas del clado cetrarioide empleadas en la presente Tesis Doctoral y procedentes del Herbario de la Facultad de Farmacia se mostrarán en el **capítulo 2** de este trabajo.

2.3. Usos y aplicaciones de los líquenes para el ser humano

2.3.1. Ecología: bioindicadores de contaminación y cambio climático

La presencia de estos organismos en múltiples regiones unido a su capacidad de bioacumular metales y otros contaminantes al no presentar cutícula externa les convierte en eficaces bioindicadores de contaminación y cambio climático (Sancho y col., 2019). Desde la utilización por primera vez de los líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en el año 1866 (Nylander, 1866) hasta la actualidad, los líquenes se han convertido en los organismos más utilizados para este fin (Abas, 2021).

Uno de los parámetros analizados es el análisis de elementos traza relacionados con actividades humanas e industriales (Giordani y col., 2019). La bioacumulación de elementos como Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Sb, Pb y V ha sido analizada en diversos líquenes como por ejemplo *Xanthoria parietina* (L.) Th., *Pseudoevernia furfuracea* (L.) Zopf., *Cetraria islandica* (L.) Ach. y *Parmelia caperata* (L.) Ach. (Nimis y col., 2000; Saib y col., 2023; Cercasov y col., 2002). Asimismo, los líquenes también han sido utilizados como herramienta de biomonitorización radiactiva, encontrándose números estudios comparativos de niveles de cesio en las regiones próximas a Chernóbil (Seaward y col., 1988) o de presencia de urano y cesio en la región norte de Siberia, zona coincidente con ensayos nucleares (Malikova y col., 2019). Otro de los parámetros analizados son los niveles de azufre o nitrógeno producidos por la actividad humana; esto sólo es asumible por ciertas especies de líquenes acidófilos y nitrófilos (Abas y Din, 2021).

La biomonitorización también se enfoca desde el estudio de los cambios de diversidad en poblaciones líquénicas. Las comunidades de líquenes se clasifican en especies sensibles, moderadas o tolerantes (Abas, 2021). Por ejemplo, el cambio climático y la consiguiente alteración en la temperatura hace que las poblaciones de líquenes epífitos aumenten mientras que las poblaciones de los líquenes terrícolas que son más sensibles disminuyan (Aptroot y van Herk, 2007).

El estudio de las alteraciones a nivel fisiológico o morfológico en el líquen también aporta información a nivel ecológico (Abas, 2021).

2.3.2. Industria alimentaria y cosmética

Desde la Antigüedad, una de las características más valoradas en relación con la calidad de un producto es su color. La aparición de colorantes sintéticos en el siglo XIX tuvo un importante impacto en las industrias textiles, cosméticas y alimentarias. Ante los efectos nocivos de ciertos colorantes sintéticos, en los últimos años se ha incrementado la búsqueda de colorantes de origen natural. La identificación de nuevos pigmentos procedentes del micobionte del líquen como la tripefelonamida A (de color amarillo), o la grafisquinona (de color rojo) aislados de *Graphis desquamescens* (Fée) Zahlbr. y *Trypethelium eluteriae* Spreng. abren nuevas vías de obtención de compuestos para este fin (Kalra y col., 2020).

También se ha reportado el uso de extractos procedente de *Evernia prunastri* (L.) Ach. y de *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf para la creación de fragancias (Joulain y Tabacchi, 2009).

Desde el punto de vista alimentario, algunos líquenes han sido utilizados de manera tradicional como alimento en forma de ensaladas, sopas, especias, fritos o guisos, en regiones de China, India y Oriente Medio (Zhao y col., 2021). Además, en periodos de hambrunas se ha reportado el uso de *Cetraria islandica* (L.) Ach como ingrediente del pan en países como República Checa, Noruega o Estonia (Pawera y col., 2017).

2.3.3. Medicina tradicional

El uso de líquenes como remedios naturales para el tratamiento de diversas afecciones se extiende a lo largo de los siglos y en diversas culturas alrededor del mundo. Se han publicado estudios etnobotánicos y etnofarmacológicos sobre su uso en regiones de África, Europa, Asia, América del Norte y América del Sur (Crawford, 2019).

Hipócrates en los siglos cuarto y tercero a.C. ya reportaba el uso de líquenes en la medicina tradicional (Lebail, 1853). Dioscórides, Galeno o Pablo de Egina incluían en sus respectivos escritos el uso de un líquen fruticoso "*splachnon*", que posiblemente se tratase de especies del género *Usnea*. Sería en el siglo XV, con la recuperación del conocimiento griego cuando la fitoterapia recobró su importancia en Europa Occidental. Entre los líquenes más utilizados a principios de la Edad Moderna se encuentran *Cetraria islandica* (L.) Ach, *Cladonia pyxidata* Hoffm. (L.), *Peltigera aptosa* (L.) Willd., *Usnea* spp., *Evernia prunastri* (L.) Ach. y *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. Entre estos, sólo *Cetraria islandica* (L.) Ach continua en uso (Crawford, 2019).

En cuanto a las formas de uso y las patologías más habituales, los líquenes se han aplicado de manera tópica, en forma de emplastos; o por vía oral, a través de decocciones o tónicos. Los síndromes tratados incluyen afecciones dermatológicas (heridas, infecciones y llagas), digestivas (dispepsia, diarrea y disentería), pulmonares (tisis, catarro y asma) y ginecológicas (Illana-Esteban, 2012).

En relación con el clado cetrarioide se han comunicado usos medicinales de diversidad de especies de líquenes como *Flavocetraria cucullata* (Bell.) Karnefelt & Thell y *Flavocetraria nivalis* (L.) Karnefelt & Thell en forma de té para el tratamiento de asma o mareos, en regiones de España o Bolivia, respectivamente (Agelet y Vallés, 2003; Bastien, 1983). Especies del género *Vulpicida*, especies como *Vulpicida canadensis* (Räsänen) J.-E. Mattsson & M. J. Lai y *Vulpicida juniperus* (L.) J.-E. Mattsson & M. J. Lai han sido utilizadas tradicionalmente para resfriados e ictericia (Hebda y col., 1996; Regnault, 1802). En China ha referido el uso de *Vulpicida pinastri* (Scoop) Mattsson & M. J. Lai y *Cetrelia pseudolivectorum* (Asahina) W.L. Culb. para diversos síndromes, desde afecciones pulmonares hasta heridas, hemorragias uterinas, infecciones de la piel, cáncer o espasmos (Crawford, 2019).

Cabe destacar que la solidez del uso tradicional de *Cetraria islandica* (L.) Ach hace que en la actualidad se encuentren comercializados numerosos productos y preparaciones que lo contienen. En diversas regiones españolas se ha utilizado tradicionalmente para el tratamiento del asma, la inflamación, la congestión y la tuberculosis (Agelet y Vallet, 2003). Además, se ha notificado su uso para el tratamiento de resfriados, bronquitis y neumonía en regiones del norte de Italia (Bellia y Peroni, 2015). Estudios etnobotánicos en diferentes regiones europeas (Estonia, Bulgaria, Suecia y Lituania) confirman su uso para el tratamiento de enfermedades pulmonares. En algunas zonas también se ha identificado su utilización para tratar enfermedades digestivas y la curación de heridas (Crawford, 2019).

Por todo ello, el uso medicinal de *Cetraria islandica* (L.) Ach se encuentra en Farmacopeas desde el año 1906 (en la Farmacopea Austriaca) hasta la actualidad, en la Farmacopea Europea. La monografía de esta última propone a este líquen como medicamento a base de plantas basado en su uso tradicional. Se utiliza, en forma de infusión y en formas sólidas o líquidas, por vía oral o para su aplicación sobre la mucosa oral. En el mercado se encuentran preparaciones que contienen extractos de este líquen en combinación con otras plantas medicinales. El Comité de Medicamentos a base de plantas de la Agencia Europea del Medicamento (HMPC/EMA) establece dos indicaciones principales: como demulcente para el tratamiento de la irritación de boca y garganta y la tos seca asociada y para la pérdida de apetito (EMA/HMPC/36866/2014).

Así pues, en base a su uso tradicional, el estudio de las actividades biológicas y aplicaciones farmacológicas de los líquenes ha adquirido una renovada importancia. Esta atención no sólo se enfoca en la validación de este uso tradicional, sino también se centra en la búsqueda de extractos liquénicos y metabolitos secundarios activos frente a nuevas patologías, demostrando un amplio rango de actividades de interés farmacológico.

2.3.4. Propiedades farmacológicas de compuestos liquénicos

A medida que los procesos de identificación y aislamiento de los metabolitos secundarios liquénicos han avanzado, se ha producido un aumento en la disponibilidad de estos compuestos, lo que ha permitido la realización de estudios más exhaustivos sobre sus actividades biológicas, antes sólo dirigidos al estudio del ácido úsnico (compuesto más estudiado gracias a que fue el primero disponible comercialmente). Una vez revisada la composición química de los metabolitos secundarios presentes en las especies liquénicas del clado cetrarioide se llevó a cabo una revisión del estado actual del conocimiento sobre las actividades farmacológicas de los tres grupos de metabolitos secundarios de líquenes más predominantes: depsidonas, dépsidos y dibenzofuranos incluyendo el ácido úsnico (cuya búsqueda se restringió entre los años 2010 y 2021, debido a la ya existencia de numerosos trabajos en la literatura científica). Esta información se recoge en el capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral.

Con el fin de destacar ciertos datos clave, las actividades más destacadas en los tres grupos químicos fueron su actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica. De manera aislada, otras actividades como antidiabética, antiinflamatoria, analgésica o cicatrizante también fueron demostradas.

2.4. Actividades antioxidantes y neuroprotectoras de los líquenes

Desde el enfoque que se plantea este trabajo, es importante poner en antecedentes el efecto antioxidante y neuroprotector ya demostrado en la literatura científica de diversos extractos liquénicos y sus metabolitos secundarios.

2.4.1 Actividad antioxidante de los líquenes del clado cetrarioide

Ciertos líquenes son capaces de habitar en climas en los que los niveles de desecación e irradiación son extremos. Mientras que estos organismos en sus formas de vida libre no son capaces de tolerar estas situaciones de estrés oxidativo, el líquen parece responder de manera más favorable, recuperando sus niveles de GSH y reestableciendo su equilibrio redox (Kranner y Birtic, 2005). Mientras que la acción protectora ejercida por los sistemas antioxidantes intrínsecos del líquen como barreras físicas, sistemas enzimáticos (SOD, CAT, GR) o contenido en glutatión

o tocoferol está demostrada, el papel de los metabolitos secundarios en su protección se encuentra en discusión. Estos metabolitos se encuentran en forma de depósitos extracelulares por lo que tendrían un efecto limitado a nivel del metabolismo liquénico (Lohézic-Le Dévehat y col., 2014; Kranner y col., 2008). Por el contrario, al encontrarse en su mayoría en la parte superior de la médula o córtex, presentan acción fotoprotectora actuando como filtros UVB (Nguyen y col., 2013).

El carácter polifenólico de los poliquétidos y dibenzofuranos les convierte en prometedores antioxidantes por sus actividades tanto como captadores de radicales y como quelantes de metales (Bay, 2020; Hoa, 2020; Le Roux, 2011).

Partiendo de esta premisa, el mayor número de trabajos publicados ahondan en la actividad antioxidante de extractos y metabolitos secundarios a través del uso de técnicas *in vitro* como ORAC, FRAP o DPPH. También se ha estudiado su efecto sobre los niveles de moléculas no enzimáticas implicadas en la respuesta antioxidante y sobre la actividad y la expresión de enzimas antioxidantes. Entre los líquenes cetrarioides, se han encontrado diversos estudios relativos a la actividad antioxidante de especies del género *Cetraria*. Extractos acuosos y metanólicos de *Cetraria islandica* (L.) Ach han demostrado potencial antioxidante en diversos estudios *in vitro* con valores de inhibición del 96% de la peroxidación lipídica del sistema del ácido linoléico, aumento de su capacidad captadora del radical superóxido y poder reductor (0,05-0,45 µg/mL) (Grujicic y col., 2014; Gulcin y col., 2002; Stadnytska y col., 2020).

El potencial antioxidante también se ha observado en modelos *in vivo* (ratas Sprague-Dawley) de diabetes mellitus tipo 1, en los cuales el aumento de la actividad de enzimas como SOD, CAT y GPx así como la disminución de los niveles de malondialdehído (MDA) mejoraron el estado de estrés oxidativo inducido en la diabetes y previnieron frente al daño en células pancreáticas y renales (Bakir y col., 2015; Colak y col., 2013; Colak y col., 2014).

Por su parte, Tomovic y colaboradores (2015) demostraron el carácter antioxidante de *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr con valores óptimos DPPH (IC₅₀ 51,6 µg/mL), de inhibición de peroxidación lipídica (IC₅₀ 45,5 µg/mL), o quelante de ion ferroso ((IC₅₀ 50,4 µg/mL). Este líquen también incrementó la actividad de las enzimas del sistema antioxidante como SOD y GPx en linfocitos humanos (Tomovic y col., 2015).

En relación con las especies del género *Vulpicida*, la capacidad antioxidante de *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E. Mattsson & M. J. Lai se demostró mediante los ensayos de DPPH y NBT con valores de IC₅₀ 75,6 y 65 µg/mL, respectivamente (Legouin y col., 2017). Estudios de nuestro grupo

de investigación también determinaron el potencial antioxidante de *Vulpicida canadensis* (Räsänen) J.-E. Mattsson & M. J. Lai. (Fernández Moriano y col., 2015). Otras especies englobadas en el clado cetrarioide han demostrado actividad antioxidante como *Melanelia subaurifera* (Nyl.) Essl. (DPPH IC₅₀ 165,1 µg/ml), *Melanelia fuliginosa* (Fr. ex Duby) Essl. (DPPH IC₅₀ 266,3 µg/ml) o *Flavocetraria nivalis* (L.) Karnefelt & Thell (TEAC de 7,9 mM) (Ristic y col., 2016; Singh y col., 2011).

Con relación a los géneros cetrarioides *Ahtiana*, *Allocetraria*, *Arctocetraria*, *Cetrariella*, *Cetrellopsis*, *Dactylina*, *Esslingeriana*, *Kaernefeltia*, *Masonhalea*, *Nephromopsis*, *Tuckermanella*, *Tuckermannopsis* y *Usnocetraria* no se ha encontrado información relativa a su actividad antioxidante en la literatura científica, abriendo un nuevo campo de estudio.

En cuanto a los metabolitos secundarios, se presenta información detallada sobre su actividad en el **capítulo 1** de esta Tesis Doctoral.

2.4.2 Actividad neuroprotectora de líquenes y metabolitos secundarios

Como se ha podido constatar en la primera parte de esta introducción, las enfermedades neurodegenerativas y el daño neurológico constituyen un importante problema de salud pública en la sociedad moderna y la falta de tratamientos eficaces impulsa la búsqueda de nuevas moléculas. Los productos naturales, y en este caso, los líquenes, son una valiosa fuente de estas.

Basados, en la mayoría de los casos, en sus propiedades antioxidantes, se encuentran en la literatura numerosos trabajos que describen el potencial neuroprotector de los líquenes. La mayoría de ellos se han realizado en modelos celulares *in vitro*, siendo escasos los realizados *in vivo*.

En esta línea de investigación nuestro grupo ha liderado los estudios de neuroprotección con extractos liquénicos y sus metabolitos aislados demostrando efectos protectores en modelos de estrés oxidativo inducidos por el reactivo de Fenton y por el peróxido de hidrógeno en células de astrocitoma humano (U373 MG) y en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. *Xanthoparmelia conspersa* (Ehrh. ex Ach.) Hale, *Xanthoparmelia camtschadalis* (Ach.), *Cetraria islandica* (L.) Ach. Cast, *Vulpicida canadensis* (Räsänen) J.-E. Mattsson & M. J. Lai, e *Hypotrachyna formosana* (Zahlbr.) Hale han demostrado capacidad para reducir la producción de especies reactivas de oxígeno y los niveles de peroxidación lipídica, así como para aumentar los niveles de glutatión reducido y la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx y GR (de Paz y col., 2010; Fernández-Moriano y col., 2015; Sieteiglesias y col., 2019). Además, también se ha demostrado que los líquenes *Hypotrachyna formosana* (Zahlbr.) Hale y *Cladonia uncialis* (L.) Weber

ex F. H. Wigg son capaces de inhibir de forma moderada a las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) (Sieteiglesias y col., 2019).

En relación a los metabolitos secundarios, Fernández-Moriano y colaboradores (2017), demostraron que el ácido fumarprotocetrárico, el ácido evérnico y el ácido úsnico, previenen la disfunción mitocondrial y la alteración de la homeostasis del calcio inducidas por el peróxido de hidrógeno, reducen la muerte celular por apoptosis y aumentan la expresión de enzimas antioxidantes señalando como mecanismo de acción la activación de la vía Nrf2 (Fernández-Moriano y col., 2017a; Fernández-Moriano y col., 2017b).

Investigadores de otros grupos también han llevado a cabo estudios *in vitro* con interesantes resultados. Los efectos neuroprotectores del ácido evérnico fueron corroborados en un modelo de la enfermedad de Parkinson inducido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) en cultivo primario de neuronas, reduciendo la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la activación de la microglía (Lee y col., 2021). Otros compuestos liquénicos, como el ácido isolecanórico también se evaluaron en modelos *in vitro* de la enfermedad de Parkinson y de la esclerosis lateral amiotrófica inducidos respectivamente por rotenona y L-BMAA en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, observándose reducción de la disfunción mitocondrial, del estrés oxidativo y del estado apoptótico, así como inhibición de las proteínas GSK3 β y caseína quinasa 1 (CK1) (de Pedro y col., 2016)

Mapari y colaboradores (2021) demostraron la capacidad neuroprotectora en modelos de estrés oxidativo en células de neuroblastoma de ratón (N2a) de los compuestos ácido protocetrárico, ácido lecanórico y zeorina aislados de las especies de líquenes *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale y *Heterodermia leucomelos* (L.) Poelt así como su actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE, destacando el triterpeno zeorina (Mapari y col., 2021). Además, la biruloquinona, aislada del líquen *Cladonia macilenta* Hoffm, mostró efectos multidiana frente a la enfermedad del Alzheimer al reducir el daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno y por el péptido β -amiloide en modelos de cultivos de células de feocromocitoma adrenal de rata (PC12) así como inhibir la actividad de la enzima AChE ($IC_{50}=27,1$ μ g/mL) (Luo y col., 2013). Asimismo, Reddy y colaboradores (2016) estudiaron el carácter neuroprotector de la depsidona ácido fisódico y de los dépsidos atranorina y ácido perlatólico al presentar actividad neurogénica y neurotrófica en células de neuroblastoma de ratón Neuro2A (modelo *in vitro*) y en cultivos primarios de hipocampo de ratón (modelo *ex vivo*) mediante la modulación de la expresión génica de BDNF Y NGF (Reddy y col., 2016).

Studzińska-Sroka y colaboradores (2021) enfocaron el estudio neuroprotector de los líquenes frente a una de las neoplasias cerebrales más difíciles de tratar, el glioblastoma multiforme demostrando que los ácidos úsnico, evérnico y fisódico presentan citotoxicidad frente a dos líneas celulares de glioblastoma humano A-172 y T98G, mejorando el estado inflamatorio y el estado de inmunosupresión mediante la inhibición de las enzimas IDO1, COX-2 e hialorunidasasa. Además, mediante la metodología PAMPA para la predicción del paso a través de la barrera hematoencefálica (PAMPA-BHE) comprobaron que estos compuestos eran capaces de atravesarla (Studzińska-Sroka y col., 2021a; Studzińska-Sroka y col., 2021b.).

Por último, en los últimos años también se ha estudiado el papel neuroprotector de los líquenes empleando modelos *in vivo*. El ácido úsnico ha sido estudiado en un modelo de la enfermedad de Parkinson en ratones inducido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), demostrando actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de NF- κ B (Lee y col., 2020). Asimismo, este dibenzofurano demostró efectos neuroprotectores en un modelo de la enfermedad de Alzheimer inducido por el péptido A β ₁₋₄₂ en ratones, reduciendo el estrés oxidativo, la inflamación, y mejorando el aprendizaje y memoria (Cazarin y col., 2020). Este compuesto también ha sido estudiado en modelos de daño cerebral de rata causado por isquemia, mejorando la memoria espacial, disminuyendo la actividad antiapoptótica, el desbalance redox (reduciendo los niveles de peroxidación lipídica y aumentando la actividad del sistema antioxidante endógeno) y el proceso inflamatorio (Erfani y col., 2020). Finalmente, el dépsido ácido evérnico también ha sido estudiado en el modelo de la enfermedad de Parkinson antes comentado en ratones C57BL/6, reduciendo la disfunción motora y la pérdida neuronal dopaminérgica y la neuroinflamación (Lee y col., 2021).

El estudio de la actividad neuroprotectora de los líquenes continúa avanzando. Asimismo, cabe destacar que solamente se han estudiado un número de moléculas limitadas de entre los más de mil metabolitos secundarios liquénicos identificados hasta el momento, existiendo un importante potencial para el descubrimiento de nuevas moléculas con interesantes actividades farmacológicas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Existe evidencia sobre la capacidad de los productos naturales para ejercer un efecto neuroprotector a través de diferentes mecanismos, en estudios llevados a cabo en distintos modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas. Los compuestos liquénicos tienen estructuras privilegiadas que les otorgan propiedades antioxidantes, neuroregeneradoras e inhibidoras enzimáticas; sin embargo, su capacidad neuroprotectora ha sido escasamente investigada. Teniendo en cuenta esta hipótesis, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral es evaluar la actividad neuroprotectora de los extractos liquénicos y metabolitos secundarios de especies del clado cetrarioide, determinando su efecto sobre los diversos mecanismos implicados en enfermedades neurodegenerativas.

Para ello, se establecen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Revisar el estado actual del conocimiento sobre las actividades farmacológicas de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los líquenes, que nos permita abordar en profundidad el estudio de su actividad neuroprotectora.
2. Realizar un cribado o *screening* farmacológico para seleccionar los géneros más activos del clado cetrarioide basándonos en sus propiedades antioxidantes e inhibidoras de enzimas.
3. Caracterizar desde el punto de vista fitoquímico los extractos liquénicos más activos mediante HPLC, identificando sus metabolitos secundarios, potenciales responsables de su actividad terapéutica.
4. Estudiar la capacidad de inhibición *in vitro* de extractos liquénicos del clado cetrarioide y de sus metabolitos secundarios frente a las enzimas colinesterasas en modelos *in silico* mediante estudios de acoplamiento o *Docking* molecular y en un modelo *in vitro* de cultivo celular de neuronas.
5. Evaluar la actividad protectora de los extractos liquénicos del clado cetrarioide seleccionados en un modelo experimental de estrés oxidativo neuronal y profundizar en sus mecanismos de acción, con el fin de identificar la especie más activa.
6. Estudiar la actividad neuroprotectora del metabolito/s secundario/s liquénico más activo, responsable de la actividad del líquen.

Para ello, se establecen tres objetivos concretos:

- a. Evaluar la actividad protectora y los mecanismos implicados en la misma en un modelo experimental de estrés oxidativo neuronal.

- b. Determinar sus propiedades neurorestaurativas analizando biomarcadores neuronales propios de los procesos de sinaptogénesis, crecimiento axonal, diferenciación y neurogénesis.
- c. Predecir el paso a través de la BHE en modelos celulares *in vitro*, así como sus propiedades farmacocinéticas ADMET *in silico* mediante estudios computacionales.

RESULTADOS

Capítulo 1

Revisión del estado actual del conocimiento sobre las actividades farmacológicas de los grupos de metabolitos secundarios líquénicos predominantes

Publicaciones incluidas

Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP. Lichen Depsidones with Biological Interest.

Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP. Dibenzofurans from lichens - a pharmacological overview

Ureña-Vacas, I.; González-Burgos, E.; Divakar, P.K.; Gómez-Serranillos, M.P. Lichen Depsides and Tridepsides: Progress in Pharmacological Approaches.

Lichen Depsidones with Biological Interest.

Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP.

Planta Medica 2022 Sep;88(11):855-880.

<https://doi.org/10.1055/a-1482-6381>

Lichen Depsidones with Biological Interest

Authors

Isabel Ureña-Vacas, Elena González-Burgos, Pradeep Kumar Divakar, M. Pilar Gómez-Serranillos

Affiliation

Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany,
Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid
(Spain)

Key words

secondary metabolites, natural products, pharmacology,
antioxidants, antimicrobial, cytotoxic

received March 9, 2021
accepted after revision April 13, 2021
published online May 25, 2021

Bibliography

Planta Med 2022; 88: 855–880

DOI 10.1055/a-1482-6381

ISSN 0032-0943

© 2021. Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany

Correspondence

Dr. Elena González Burgos
Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany,
Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid
(Spain)
Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain
Phone: + 34 9 13 94 22 76, Fax: + 34 9 13 94 16 24
elenagon@ucm.es

ABSTRACT

Depsidones are some of the most abundant secondary metabolites produced by lichens. These compounds have aroused great pharmacological interest due to their activities as antioxidants, antimicrobial, and cytotoxic agents. Hence, this paper aims to provide up-to-date knowledge including an overview of the potential biological interest of lichen depsidones. So far, the most studied depsidones are fumarprotocetraric acid, lobaric acid, norstictic acid, physodic acid, salazinic acid, and stictic acid. Their pharmacological activities have been mainly investigated in *in vitro* studies and, to a lesser extent, in *in vivo* studies. No clinical trials have been performed yet. Depsidones are promising cytotoxic agents that act against different cell lines of animal and human origin. Moreover, these compounds have shown antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi, mainly *Candida* spp. Furthermore, depsidones have antioxidant properties as revealed in oxidative stress *in vitro* and *in vivo* models. Future research should be focused on further investigating the mechanism of action of depsidones and in evaluating new potential actions as well as other depsidones that have not been studied yet from a pharmacological perspective. Likewise, more *in vivo* studies are prerequisite, and clinical trials for the most promising depsidones are encouraged.

Introduction

Lichens are a unique symbiosis between a fungus belonging to Ascomycota and Basidiomycota phylum (mycobiont) and a chlorophyll-containing partner (photobiont), which is an alga or a cyanobacterium. Moreover, recent studies have identified specific bacterial microbiomes as the third component of lichen [1,2]. Lichens have been traditionally used for their medicinal value as healing (i.e., *Heterodermia diademata* [Taylor] D.D. Awasthi) and cold (i.e., *Everniastrum cirrhatum* [Fr.] Hale ex Sipman.), for their culinary value for preparing tea, curry, soup, pickle, and sausages (i.e., *Everniastrum nepalense* [Taylor] Hale ex Sipman; *Cladonia rangiferina* [L.] Weber ex F.H. Wigg.), and for their ritual, spiritual, and aesthetic values (i.e., *Thamnomia vermicularis* [Sw.] Ach. ex Schaer.) [3–5].

Lichens produce unique and diverse secondary metabolites. So far, over 1000 compounds have been identified, including depsi-

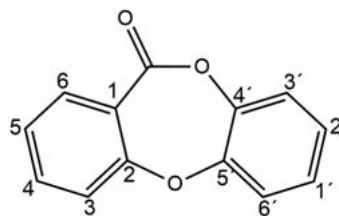
done, depsides, dibenzofurans, and xanthenes, which are synthesized via the acetate-malonate pathway, pulvinic acid derivatives formed in the shikimic acid pathway, and terpenes and steroids via the mevalonic acid pathway. The amount of these secondary metabolites may vary from 0.1% to 30% of the dry weight of the thallus, and they are deposited in both the cortex and the medullary layers. Hence, depsides and dibenzofurans, such as usnic acid (major) and atranorin (trace) in *Flavoparmelia caperata* L. (Hale) and atranorin and chloroatranorin in *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., are found in the cortex, whereas depsidones, such as physodic acid, 3-hydroxyphysodic acid, and physodalic acid as major compounds in *H. physodes* (L.) Nyl., norstictic acid in *Parmotrema perforatum* (Jacq.) A. Massal., and salazinic acid (major) and consalazinic acids (minor) in *Parmelia saxatilis* (L.) Ach., are found in the medullary layer [6–9]. These secondary metabolites play a key role in chemotaxonomy and systematics [6]. Moreover, they exert diverse biological functions including protection against

ABBREVIATIONS

8-OH-dG	8-Oxo-2'-deoxyguanosine
Axin2	axis inhibition protein 2
Bax	Bcl-2 associated X-protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
COX	cyclooxygenase
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil
FabZ	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase
FAS	fatty acid biosynthesis
GSH	reduced glutathione
HGF	hepatocyte growth factor
Hsp70	70 kD heat shock proteins
HSV	herpes simplex virus
IL-1	interleukin-1
JAK/STAT	janus kinase/signal transducers and activators of transcription
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MIC	minimum inhibitory concentration
MMP7	matrix metalloproteinase-7
MPP1	M-Phase Phosphoprotein 1
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NF- κ B	nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGF	nerve growth factor
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
NOS	nitric oxide synthase
Nrf2	nuclear factor E2-related factor 2
nsP1	nonstructural protein 1
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
PAR2	proteinase-activated receptor-2
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PF-UVA	protection Factor-ultraviolet A
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKS	polyketide synthase
Plk1	polo-like kinase-1
PTP1B	protein tyrosine phosphatase 1B
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
SLIGKV-NH ₂	Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val-amide
SOR	scavenging superoxide radicals
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Trp-P-2	tryptophan pyrolysis product-2

pathogens, herbivores, and UV irradiation [7]. Furthermore, these secondary metabolites of lichens arouse great pharmacological interest due to their activities, mainly as antioxidants, antimicrobials, and cytotoxic agents [10–12].

Some of the most abundant groups of secondary metabolites in lichens are depsidones (around 100) [13]. Structurally, depsi-



► Fig. 1 General structure of depsidones.

ones consist of a polycyclic system linked through an ether group and an ester group, giving the rigid 11H-dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-11-one ring (► Fig. 1) [14–16]. The biosynthesis of depsidones occurs via the acetate-malonate pathway, with acetyl-Coenzyme A as the precursor and PKS as the responsible enzyme (► Fig. 2) [17]. Several bioactive depsidones such as stictic acid, salazinic acid, and psomoric acid have been identified [18–20]. The chemical structures of different depsidones of lichens are depicted in ► Fig. 3.

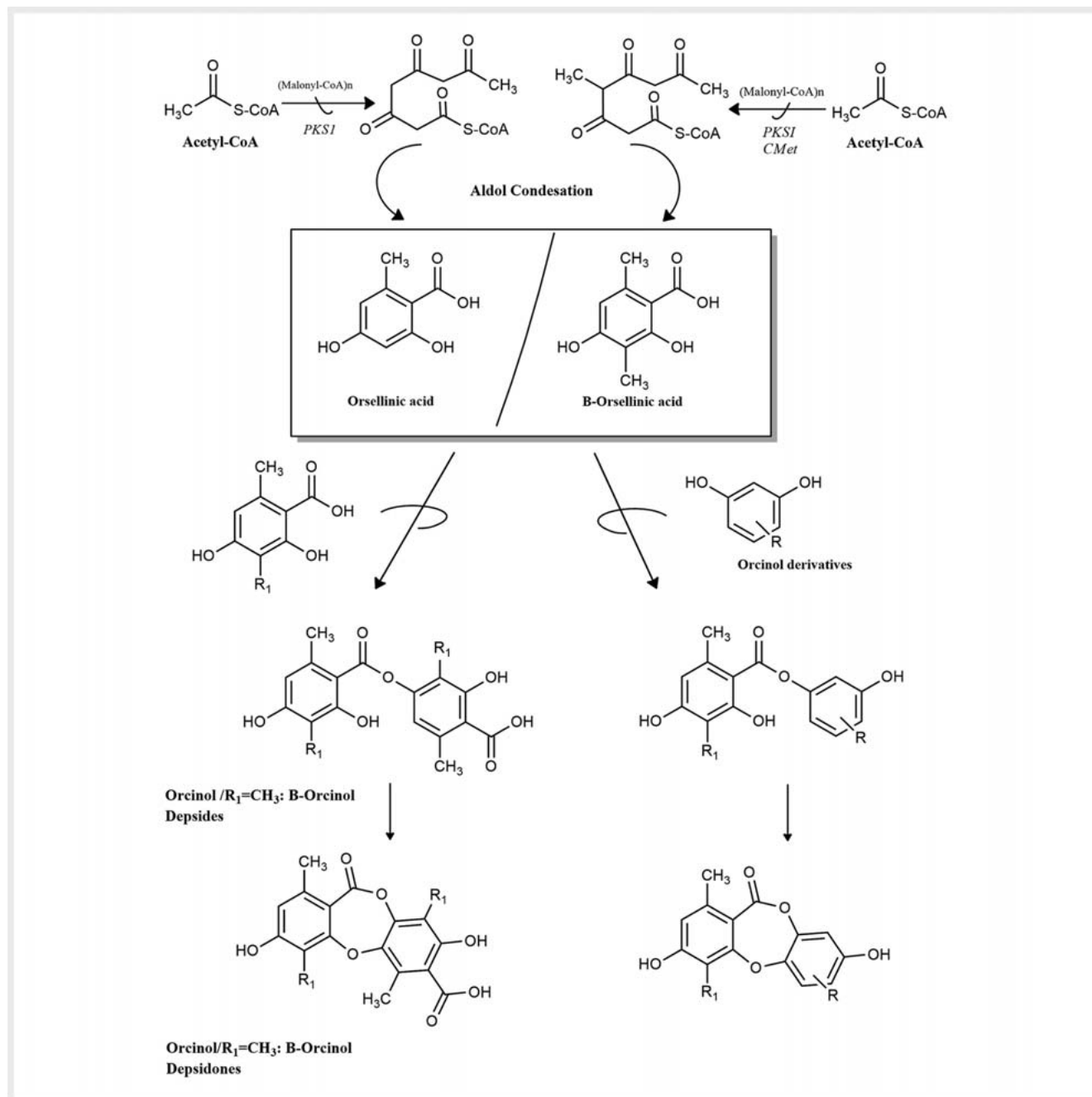
This paper aims to provide up-to-date knowledge and an overview of the biological interest of lichen depsidones. This review includes pharmacological information for those depsidones that have been investigated with potential bioactivity. Original papers published in English in PubMed/Medline and Scholar Google without date restriction were included. Those articles with lichen extracts rich in depsidones were excluded from this review. It is important to emphasize that more depsidones have been identified, such as notatic acid, nortotatic acid, and diploicin, but their pharmacological activities have not been investigated yet.

Chemistry and Biochemical Origin

The depsidones and the majority of other secondary metabolites in lichens are produced by lichen-forming fungi and are deposited on the outer surface of the hyphal cell walls in the medullary layer of the lichen thallus (► Fig. 4) [21]. The interactions between the mycobiont and photobiont affect the production of secondary metabolites in lichens. For example, several studies have shown that mycobionts within the lichen thallus produce a variety of secondary metabolites in contrast with axenic mycobiont cultures [22–24]. The production of secondary metabolites in the lichen thallus has also been found to be affected by environmental factors (i.e., UV-radiation, climatic conditions, habitats, and presence of non-photosynthetic bacteria and other fungi in lichen thallus) [25–30].

Depsidones consist of 2 or rarely 3 aromatic rings joined by ester linkages and an ether linkage between the rings. The rings are based on the structure of orsellinic acid. Depsidones are grouped in an orcinol or B-orcinol series, depending on the presence of a CH₃ on the C3 carbon of their rings (► Fig. 1) [31–33].

Acetate and malonate units are condensed to form orsellinic acid or B-orsellinic acid that is a precursor for the biosynthesis of several secondary metabolites in lichens and fungi in general (► Fig. 2). Depsidones are produced by the condensation of 2 or

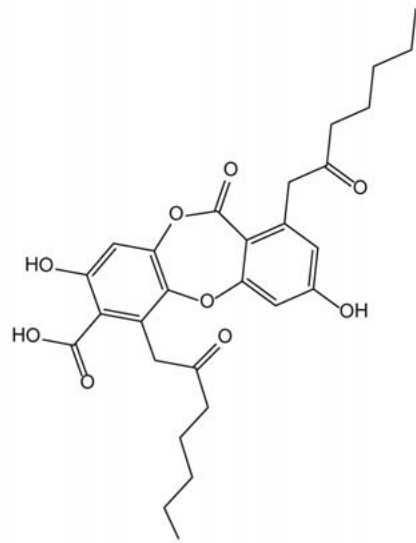
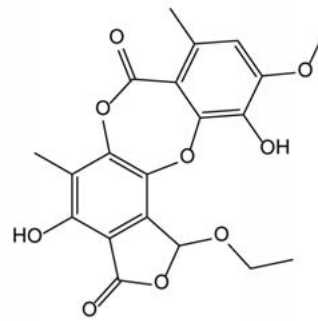


► **Fig. 2** Biosynthesis of depsidones.

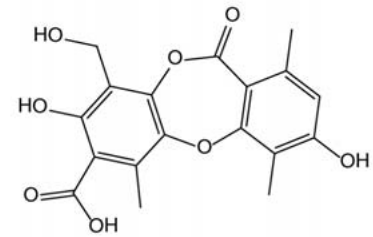
more hydroxybenzoic acids through which the carboxyl group of 1 molecule is esterified with a phenolic hydroxyl group of a second molecule. Depsides are precursors for the biosynthesis of depsidones [34]. It is widely accepted that the depsidones are formed from depsides by a loss of hydrogen in an oxidative cyclization process (► **Fig. 2**) [35,36]. Several depside-depsidone pairs are found in lichens, for example, *Pseudevernia furfuracea* contains the depside-depsidone pair (i.e., olivetoric acid and physodic acid) [37]. O-methylation (methylation of oxygen) is a common process and the cause of chemical variation in depsidones in lichens [36]. However, from chemical synthesis producing high yields of several

depsidones, it is proposed that depsidones are biosynthesized in 4 steps: by hydroxylation, acyl group migration, Smiles rearrangement, and esterification [38].

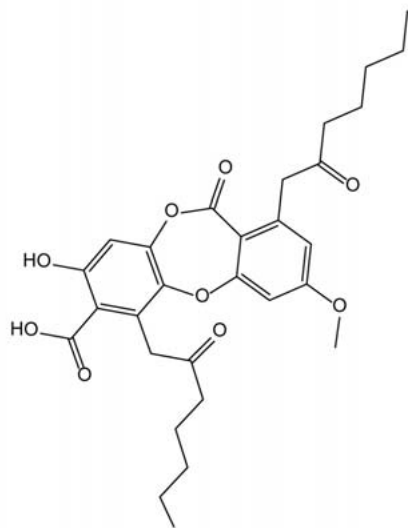
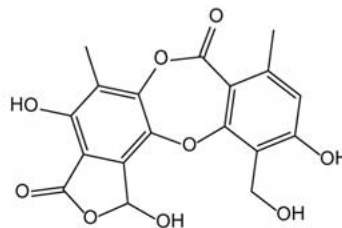
Both the depside and depsidones are products of a nonreducing PKS encoded in the genome of the mycobiont [26,39]. Therefore, the phylogenetic studies of PKS domains, sequencing of complete PKS gene clusters, and the availability of whole-genome sequence data have enabled a more detailed study of the biosynthetic origin of the nonreducing polyketides in lichens [40–44].

 α -alectoronic acid

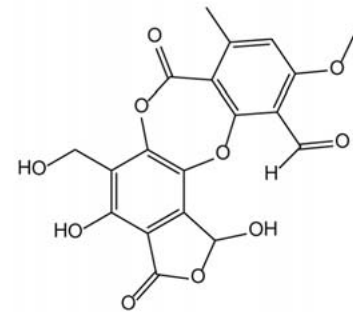
Ceratinalone



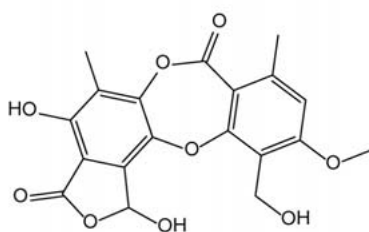
Conhyprotocetraric

 α -Collatolic acid

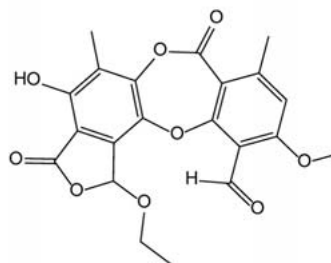
Connorstictic acid



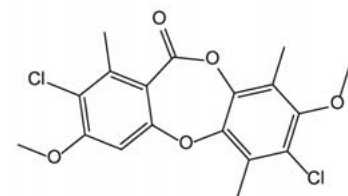
Constictic acid



Cryptostictic acid



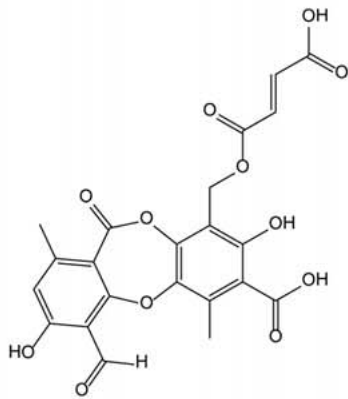
8'-O-ethylstictic



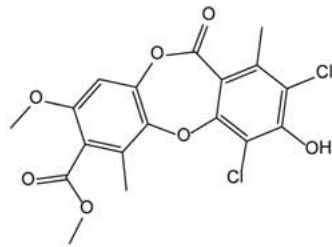
Flavicansone

► Fig. 3 Chemical structure of different depsidones of lichens.

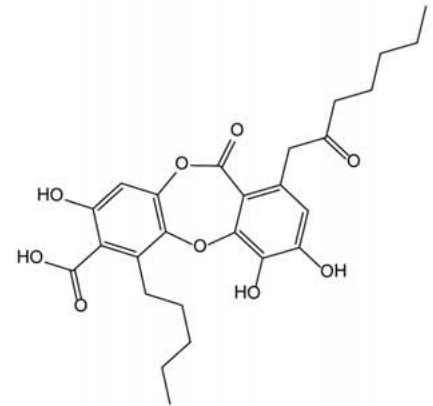
continued



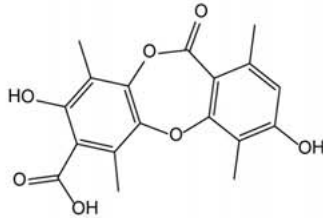
Fumarprotocetraric acid



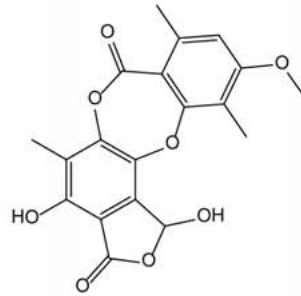
Gangaleoidin



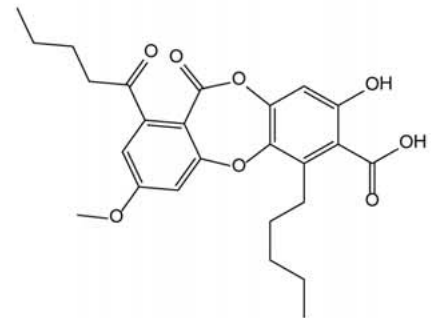
3-hydroxyphysodic acid



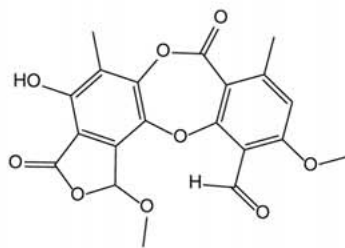
Hypoprotocetraric acid



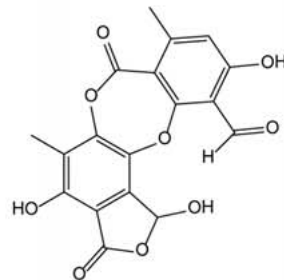
Hypostictic acid



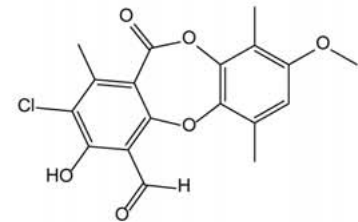
Lobaric acid



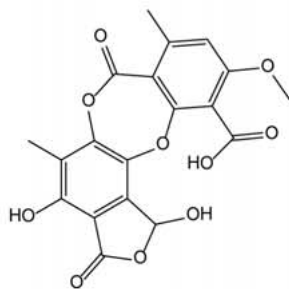
8'-O-methylstictic acid



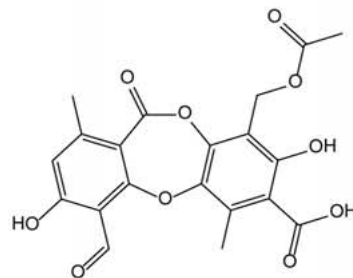
Norstictic acid



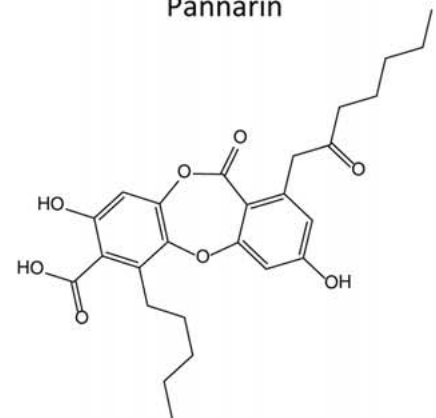
Pannarin



Peristictic acid

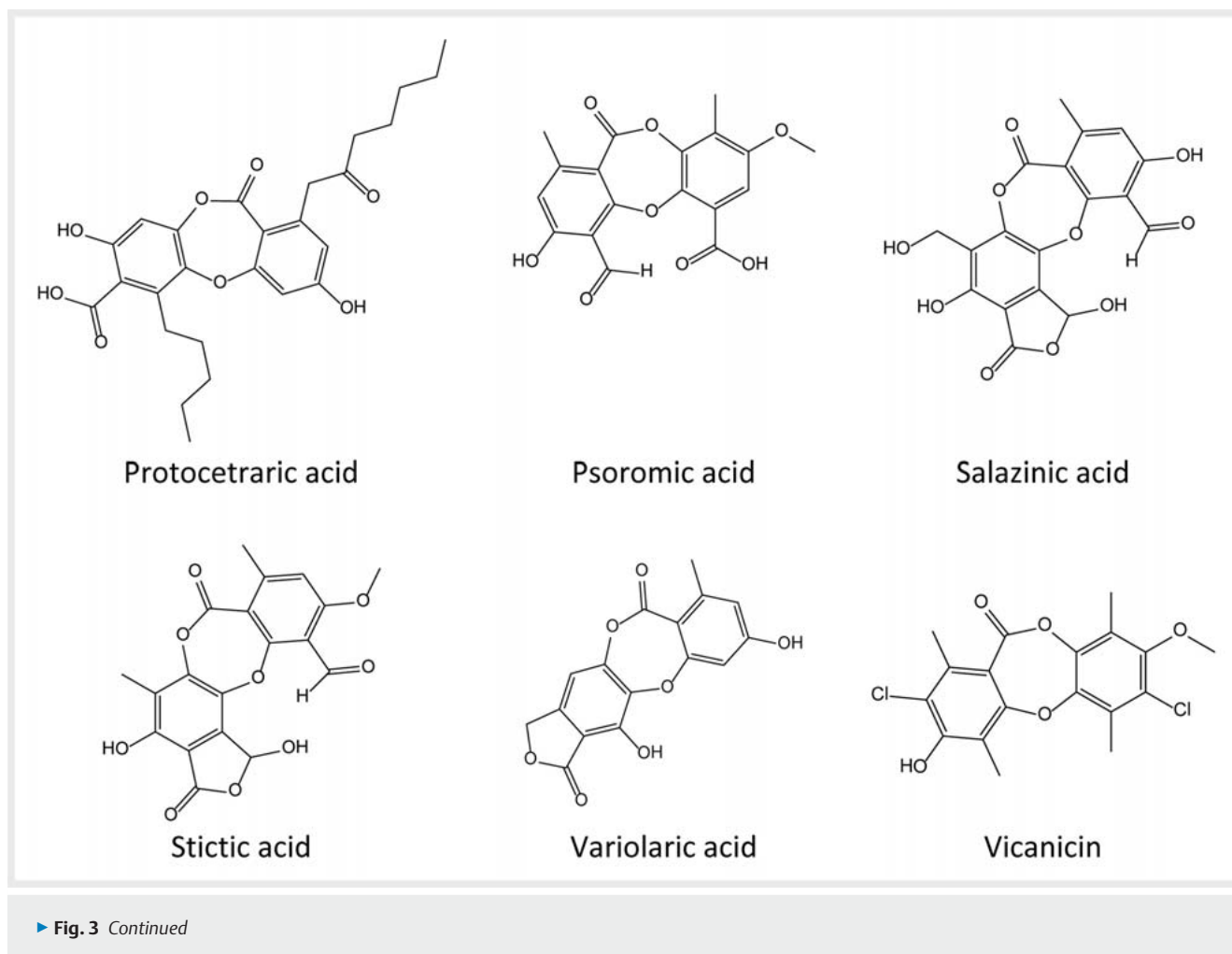


Physodalic acid



Physodic acid

► Fig. 3 Continued

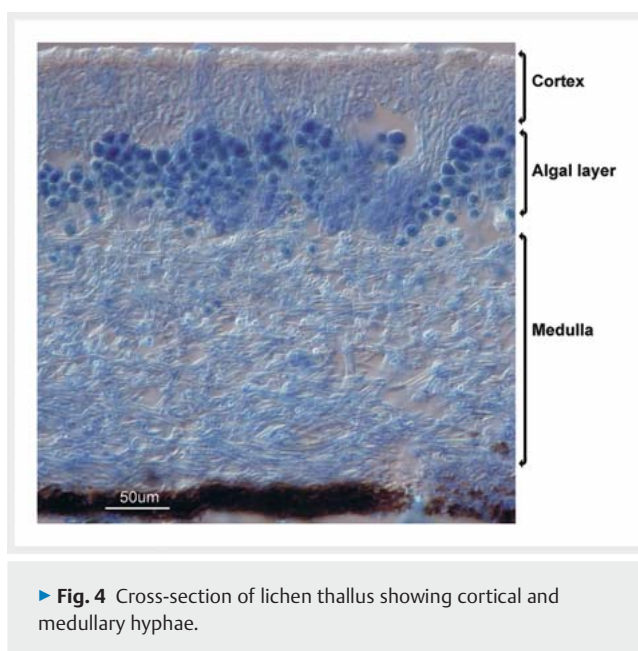


Molecular Mechanism of Action of Lichen Depsidones

Little is known about the molecular mechanisms through which depsidones exhibit their activities. This review presents some examples; however, further studies are needed to elucidate the diverse properties of this group of secondary metabolites in lichens.

One of the most investigated activities in lichens is their antioxidant activity. Depsidones have been demonstrated to act as antioxidants by directly scavenging ROS and RNS and by modulating redox enzyme activity and expression (i.e., superoxide dismutase and catalase) and transcription factors expression (i.e., Nrf2) [45]. Depsidones can incorporate into cellular lipid microdomains that make them more efficient as antioxidants than other lichen secondary metabolites [46].

Depsidones have also shown cytotoxic activity against diverse cancer cell lines (i.e., melanoma, breast, and colon). These bioactive compounds exert cytotoxic effects through diverse signaling pathways. Hence, depsidones can attenuate cell tumor growth by acting as selective inhibitors of Plk1 activity. Plk1 is a serine/threonine kinase that is overexpressed in human tumors, and it is related to invasive potential and lower cancer-related survival [47]. In addition, depsidones also directly target antiapoptotic Bcl-2



family proteins [48]. High expression of antiapoptotic Bcl-2 family proteins (i.e., Bcl-2) contributes to the expansion of malignant cells and reduces the therapeutic efficacy of cytotoxic drugs [49]. Moreover, these secondary metabolites are promising cytotoxic agents via oxidative stress induction; the overproduction of ROS disrupts redox homeostasis and leads to severe structural and functional injury in cancer cells [50]. Furthermore, depsidones inhibit lipoxygenases, which are involved in cell viability and proliferation, and migration, invasion, and metastasis of cancer cells [51]. Besides, depsidones can suppress carcinomas by targeting the HGF-c-Met signaling pathway [52]. c-Met is a receptor tyrosine kinase, and HGF is the ligand for this receptor. Dysregulation of the HGF-c-Met signaling pathway promotes tumor progression and metastasis by stimulating different signaling pathways as JAK/STAT and PI3K/AKT [53]. Finally, other depsidones act as cytotoxic agents by targeting the aberrant Wnt/ β -catenin signaling [20].

Depsidones have also antimicrobial properties against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, and fungi. Particularly, some depsidones are RecA inhibitors, which potentiate bactericidal activity and reduce antibiotic resistance [54]. Moreover, depsidones have also targeted the β -hydroxyacyl-acyl carrier protein FabZ of the bacterial system for FAS [55]. Furthermore, depsidones have proven to be promising antiviral agents against alphaviruses via nsP1 GTP binding and guanylation inhibition. These RNA viruses need a 5' cap structure in whose formation viral protein nsP1 participates and which is necessary to avoid viral RNA degradation [56].

Other depsidones are reported for pharmacological inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B (involved in insulin resistance) [57]. Moreover, these compounds act in other signal transduction pathways such as epidermal growth factor receptor, integrin signaling pathways, and cell cycle regulation [58]. Furthermore, they have anti-inflammatory properties by inhibiting cytokine expression and NO production through NF- κ B/MAPK and inflammasome NLRP3 pathways [59, 60].

Pharmacological Activity of Lichen Depsidones

Pharmacological activities of lichen depsidones are summarized in

► **Table 1.**

Alectoronic acid

Alectoronic acid has been shown to have cytotoxic activity against the B16 murine melanoma cell line. It reduced cancer cell viability with a higher potency than the reference compound cisplatin (IC₅₀ of 10.3 μ M for alectoronic acid and IC₅₀ of 30.3 μ M for cisplatin) [61].

Collatolic acid

Collatolic acid showed antimicrobial properties against methicillin-resistant clinical isolates strains of *Staphylococcus aureus* with an MIC₉₀ value of 128 μ g/mL. Moreover, combinations of collatolic acid and gentamicin led to a synergistic antimicrobial effect, whereas antagonism occurred when collatolic acid and levofloxacin were associated [62]. Additional antimicrobial action against *Escherichia coli* RecA protein has been reported for collatolic acid. This compound exhibited a percentage of RecA inhibition of

103.4%, and it acted as a noncompetitive inhibitor for ATP binding site [63].

Fumarprotocetraric acid

Fumarprotocetraric acid has been mainly investigated for its antimicrobial properties. Hence, this compound showed antimicrobial action against Gram-positive bacteria (especially *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* with MIC values of 4.6 μ g/mL), Gram-negative bacteria (especially, *Listeria monocytogenes* with MIC value of 4.6 μ g/mL), and fungi (*Candida albicans* and *Candida glabrata* with MIC values of 18.7 μ g/mL) in the disk diffusion method [64]. In another study, this depsidone was more active against bacteria than fungi, and its action against *Klebsiella pneumoniae* (MIC value of 0.031 mg/mL) was particularly remarkable [65]. However, fumarprotocetraric acid has resulted to be ineffective towards MRSA strains [66]. Apart from its antibacterial activity, fumarprotocetraric acid showed antitrypanosomal activity against *Trypanosoma brucei brucei* [67].

In addition to antimicrobial properties, fumarprotocetraric acid is a promising antioxidant compound. The neuroprotection exerted in neuroblastoma and astrocytoma cell lines by fumarprotocetraric acid has been related to its ability to reduce ROS formation, lipid peroxidation, and GSH depletion [68]. Moreover, fumarprotocetraric acid demonstrated *in vivo* expectorant and antioxidant properties in an albino Swiss mice model at 25 and 50 mg/kg as evidenced in an increase of excretions and a reduction of lipid peroxidation in lung tissue [69].

Finally, fumarprotocetraric acid did not show photoprotective properties (SPF value [1.91] and PF-UVA value [1.75]) [70].

3-Hydroxyphysodic acid

This compound induced cytotoxicity against rat thymocytes and diminished their proliferation via antioxidant/oxidant imbalance [71]. In addition, 3-hydroxyphysodic showed antimicrobial activities. It acted as a larvicidal agent against second and third instar larvae of the mosquito *Culiseta longiareolata* (LC₅₀ values 0.97 ppm) as well as antibacterial and antifungal agent with MIC values from 0.08 to 2.57 mM against *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, and *C. albicans* [72, 73].

Lobaric acid

The *in vitro* cytotoxic activity of lobaric acid has been tested in many different cancer cell lines such as human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, human colon carcinoma HCT-116 cells, and human malignant glioma U87MG cells [48, 50, 74–77]. Lobaric acid effectively reduced cancer cell viability and proliferation, targeting the anti-apoptotic Bcl-2 protein and the cleaved form of the PARP [48]. This depsidone also exerted cytotoxic action via oxidative stress induction as evidenced in high levels of 8-OH-dG (DNA damage) [50]. Further, lobaric acid reduced cancer cell growth through the inhibition of 5-lipoxygenase and 12-lipoxygenase [74, 75, 77]. Furthermore, this compound inhibited the polymerization of tubulin in a concentration-dependent manner, and this activity is structurally related to hydroxyl groups at C-1' and C-2' and carboxylic acid [78]. Finally, lobaric acid also inhibited mitochondrial thioredoxin reductase in rat lungs [79].

► **Table 1** Pharmacological activity of lichen depsidones.

Depsidone	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References
α -Alectoronic acid	<i>Ochrolechia parella</i> (L.) Massal	<i>In vitro</i>	Mouse melanoma B16 cell line	Cytotoxic	Cytotoxic activity (IC ₅₀ = 10.3 μ M)	[61]
Ceratinalone	<i>Usnea ceratina</i> Ach.	<i>In vitro</i>	Human epithelial carcinoma HeLa, Human lung cancer NCI-H46, Liver hepatocellular carcinoma HepG2, Human breast cancer MCF-7 cell lines	Cytotoxic	Moderate activity	[133]
α -Collatolic acid	<i>Lecanora atra</i> (Huds.) Ach.	<i>In vitro</i>	<i>Escherichia coli</i> RecA protein	Antimicrobial	High RecA inhibition (103.4%) Uncompetitive inhibitors for ATP binding	[63]
	<i>Lecanora atra</i> (Huds.) Ach.	<i>In vitro</i>	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> strains	Antimicrobial	Antimicrobial activity (MIC ₉₀ = 128 μ g/mL) Synergism with gentamicin	[62]
Conhyprotocetraric acid	<i>Ramalina</i> genus	<i>In silico</i>	Computational studies	Antioxidant	Hydroxyl and superoxide anion radical scavengers in polar environments	[131]
Connorstic acid	<i>Ramalina</i> genus	<i>In silico</i>	Computational studies	Antioxidant	Hydroxyl and superoxide anion radical scavengers in polar environments	[131]
Cryptostictic acid	<i>Ramalina</i> genus	<i>In silico</i>	Computational studies	Antioxidant	Hydroxyl and superoxide anion radical scavengers in polar environments	[131]
Deoxyctic acid	<i>Hypotrachyna revoluta</i> (Flörke) Hale.	<i>In vitro</i>	Radical scavenging activity	Antioxidant	↑ scavenger (13.176 Trolox equivalents)	[126]
8'-O-ethylstictic	<i>Usnea ceratina</i> Ach.	<i>In vitro</i>	Human epithelial carcinoma HeLa cell line Human lung cancer NCI-H460 cell line Hepatocellular carcinoma HepG2 cell line Human breast cancer MCF-7 cell line	Cytotoxic	Moderate cytotoxicity against all cancer lines	[133]
Flavicansone	<i>Teloschistes flavicans</i> (Sw.) Norman.	<i>In vitro</i>	Human promyelocytic leukemia HL 60 cell line	Cytotoxic	Moderate activity (IC ₅₀ value of 58.18 μ M)	[130]
Fumarprotocetraric acid	<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	<i>In vitro</i>	<i>T. brucei brucei</i>	Antimicrobial	Antitrypanosomal activity	[67]
	–	<i>In vitro</i>	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> strains	Antimicrobial	No activity	[66]
	<i>Cladonia foliacea</i> (Huds.) Willd.	<i>In vitro</i>	Gram-positive bacteria: <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. faecali</i> Gram-negative bacteria: <i>P. vulgaris</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>A. hydrophila</i> Fungi: <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	Antimicrobial	Antimicrobial activity against all microorganisms	[64]

continued

▶ Table 1 Continued						
Depsidone	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References
	<i>Cladonia furcata</i> (Hudson) Schrade	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>B. mycoides</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> Gram-negative bacteria: <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> Fungi: <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. albicans</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>M. mucedo</i> , <i>P. variotii</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>T. harsianum</i>	Antimicrobial	More activity against bacteria than fungi The lowest MIC value (0.031 mg/mL) against <i>K. pneumoniae</i>	[65]
	<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	In vitro	Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line Human U373 MG astrocytoma cell line Hydrogen peroxide-induced oxidative stress model	Antioxidant	↑ Cell viability ↓ ROS formation, lipid peroxidation, and GSH depletion ↓ Apoptosis, ↓ caspase-3 activity, and expression; ↓ Bax and ↑ Bcl-2 proteins levels ↑ CAT, SOD-1, and HO-1 expression	[68]
	<i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr.	In vivo	Albino Swiss mice	Antioxidant Expectorant	↑ Expectorant activity ↓ Lipid peroxidation	[69]
	<i>Lasallia pustulata</i> (L.) Mérat	In vitro	Sun protection factor (SPF) protection Factor-UVA (PF-UVA)	Photoprotection	SPF value: 1.91 (commercial filters ranged 3.91 to 11.16) PF-UVA value: 1.75. Commercial filter: 2.76	[70]
Gangaleoidin	<i>Ramalina</i> genus	In silico	Computational studies	Antioxidant	Hydroxyl and superoxide anion radical scavengers in polar environments	[131]
3-Hydroxyphysodic acid	<i>Hypogymnia tubulosa</i> (Schaer.) Hav.	In vitro	Second and third instar larvae of the mosquito <i>Culiseta longiareolata</i>	Antimicrobial	Larvicidal activity (LC ₅₀ values 0.97 ppm)	[72]
	<i>Hypogymnia tubulosa</i> (Schaerer) Hav.	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> Fungi: <i>Candida albicans</i>	Antimicrobial	MIC values from 0.08 to 2.57 mM	[73]
	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	In vitro	Rat thymocytes	Cytotoxic	↑ cytotoxicity ↓ proliferation No effects on MMP and ROSA	[71]
Hypoprotocetraric	<i>Ramalina</i> genus	In silico	Computational studies	Antioxidant	Hydroxyl and superoxide anion radical scavengers in polar environments	[131]
Hypostictic acid	<i>Pseudoparmelia sphaerospora</i> (Nyl.) Hale.	In vitro	<i>M. tuberculosis</i>	Antimicrobial	Antitubercular activity Moderate inhibitory activity (MIC = 94.0 µg/mL)	[93]

continued

► Table 1 Continued

Depsidone	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References
Lobaric acid	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	Human breast adenocarcinoma MCF-7 Human cervix adenocarcinoma HeLa Human colon carcinoma HCT-116 cell lines	Cytotoxic	↓ HeLa and HCT-116 cell viability	[76]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	Peripheral venous blood	Cytotoxic	Potent 12(S)-LOX inhibitor (93.4%)	[75]
	<i>Usnea longissima</i> Ach.	<i>In vitro</i>	Papillary renal cell carcinoma cell line Human malignant glioma U87MG cell line	Cytotoxic	↑ LDH and 8-oxo-dG levels PRCC cells (IC ₅₀ = 9.08 mg/L) U87MG (IC ₅₀ = 5.77 mg/L)	[50]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	Pancreas cell cancer (Capan-1, Capan-2) Breast cell cancer (T47-D) Prostate cell cancer (PC-3) Lung cell cancer (NCI-H1417) Ovary cell cancer (NIH: OVCA9-3) Stomach cell cancer (AGS) Colorectal cell cancer (WIDr) Blood cell cancer (HL-60, K-562) cell lines	Cytotoxic	5-LOX and 12-LOX inhibitory activity ↑ Inhibitory effect against all cell lines (EC ₅₀ = 15.2–65.5 µg/mL)	[77]
	<i>Stereocaulon paschale</i> (L.) Hoffm.	<i>In vitro</i>	LPS-stimulated macrophages	Anti-inflammatory	↓ NF-κB activation ↓ IL-1β and TNF-α secretion	[59]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	Porcine leucocytes	Anti-inflammatory	Inhibitory effects on 5-LOX (IC 50 7.3 µM)	[84]
	–	<i>In vitro</i>	Human HaCaT keratinocytes cell line	Anti-inflammatory	Block trypsin-induced and SLICKV-NH2-induced PAR2 activation ↓ mobilization of intracellular Ca ²⁺ ↓ expression of IL-8 PAR2 antagonist	[82]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	TNF-α-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells	Anti-inflammatory	↓ VCAM-1 and TNF-R1 expression	[83]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	LPS-stimulated macrophages	Anti-inflammatory	↓ NO production, COX-2 expression, and PG2 expression ↓ TNF-α, IL-1, β IL-6, and IL-18 production Inhibition of NLRP3 inflammasome activation Downregulating NF-κB/MAPK pathways	[60]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	<i>E. coli</i> RecA protein	Antimicrobial	High RecA inhibition (96.8%)	[63]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> strains	Antimicrobial	Antimicrobial activity (MIC ₅₀ = 32 µg/mL MIC ₉₀ = 64 µg/mL) Synergic only for gentamicin	[62]

continued

► **Table 1** Continued

Depsidone	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References
	-	<i>In vitro</i>	Baby hamster kidney BHK17 cell line Monkey Vero E6 cell line Human liver Huh7 cell line Sindbis virus and Chikungunya virus	Antimicrobial	Anti-alphaviral ↓ CHIKV nsP1 GTP-binding and guanylation activities ↓ virus growth	[56]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	<i>M. aurum</i>	Antimicrobial	Antimycobacterial activity (MIC values ≥ 125 µg/mL)	[85]
	-	<i>In silico</i>	Drug-binding studies on the structure of Nsp1 from SARS-CoV-2	Antimicrobial	Lobaric acid bind to Nsp1 Potential inhibitor blocking viral RNA binding	[86]
	<i>Cladonia</i> sp.	<i>In vitro</i>	SOR assay, NO assay, DPPH assay	Antioxidant	SOR (IC ₅₀ = 97.9 µmol) No DPPH activity	[87]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	Human cervix adenocarcinoma HeLa cell line Colon carcinoma HCT116 cell line	Cytotoxic	↓ HeLa and HCT116 cells proliferation ↑ Apoptosis ↓ Bcl-2 ↑ PARP	[48]
	<i>Stereocaulon sasakii</i> Zahlbr.	<i>In vitro</i>	Tubulin protein	Cytotoxic	Inhibition tubulin polymerization (IC ₅₀ = 100 µM)	[78]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	Breast cell cancer (T-47D and ZR-75-1) Erythro-leukemia cell cancer (K-562) Normal skin fibroblasts Peripheral blood lymphocytes	Cytotoxic	↓ DNA synthesis in malignant cells ↑ Cell death in malignant cells 5-LOX inhibitory activity	[74]
	-	<i>In vitro</i>	Mitochondrial TrxR purified from rat lung	Cytotoxic	↑ Inhibitory effect	[79]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	PTP1B inhibition assay	Enzyme inhibition	PTP1B inhibitory activity	[81]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vitro</i>	PTP1B inhibition assay	Enzyme inhibition	Potent PTP1B inhibitory activity (IC ₅₀ = 0.87 µM)	[80]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	<i>In vivo</i>	<i>T. coli</i> from guinea pigs	Muscle relaxant	↓ Spontaneous muscle contractile activity	[88]
8'-O-methylstictic	<i>Hypotrachyna revoluta</i> (Flörke) Hale.	<i>In vitro</i>	Radical scavenging activity	Antioxidant	(61.85) Trolox® equivalents	[126]
	<i>Hypotrachyna caraccensis</i> (Taylor) Hale	<i>In vitro</i>	DPPH assay	Antioxidant	Low-moderate scavenging activity	[132]
Norstictic acid	<i>Ramalina</i> sp.	<i>In vitro</i>	<i>M. tuberculosis</i>	Antimicrobial	Antitubercular activity (MIC = 62.5 µg/mL)	[93]
	<i>Toninia candida</i> (Weber) Th.Fr.	<i>In vitro</i>	Gram-positive bacteria: <i>B. mycoides</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> Gram-negative bacteria: <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> Fungi: <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. verrucosum</i>	Antimicrobial	Moderate antimicrobial activity (MIC value = 0.25 to 1 mg/mL)	[90]
						continued

▶ Table 1 Continued

Depsidone	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References
	<i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach.	<i>In vitro</i>	Gram-positive bacteria: <i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> Gram-negative bacteria: <i>A. hydrophila</i> Fungi: <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	Antimicrobial	Low antimicrobial activity	[92]
	<i>Rhizoplaca aspidophora</i> (Vain.) Redón	<i>In vitro</i>	<i>E. coli</i> RecA protein	Antimicrobial	Low RecA inhibition (18.2%)	[63]
	<i>Stereocaulon montagneanum</i> I.M. Lamb.	<i>In vitro</i>	DPPH assay SOR assay	Antioxidant	Low DPPH radical scavenging activity High SOR scavenging activity	[91]
	<i>Toninia candida</i> (Weber) Th.Fr.	<i>In vitro</i>	DPPH assay SOR assay	Antioxidant	High antioxidant activity (DPPH IC ₅₀ = 102.65 µg/ml and SOR IC ₅₀ = 133.46 µg/ml)	[90]
	<i>Ramalina</i> sp.	<i>In vitro</i>	Human melanoma UACC-62 cell line Mouse melanoma B16-F10 cell line Mouse 3T3 normal cells	Cytotoxic	↑ Stronger activity against UACC-62 melanoma cells Selective action against malignant cells	[89]
	<i>Usnea strigosa</i> (Ach.)	<i>In vitro</i>	Human breast cancer (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, T-47D, BT-474, SK-BR-3) cell lines Human mammary epithelial (MCF-10A) cell line Female athymic nude mice	Cytotoxic	↓ MDA-MB-231 cell proliferation, migration, and invasion ↓ Tumor size and tumor weight ↑ Tolerability	[52]
	<i>Stereocaulon montagneanum</i> I.M. Lamb.	<i>In vitro</i>	Murine melanocytes B16 cell line Human keratinocyte HaCaT cell line UV-model	Cytotoxic	No cytotoxic No sunscreen action	[91]
	<i>Toninia candida</i> (Weber) Th.Fr.	<i>In vitro</i>	Human melanoma FemX cell line Human colon carcinoma LS174 cell line	Cytotoxic	High cytotoxic activity ↑ Number of cells in sub-G1 phase	[90]
Pannarin	<i>Psoroma</i> sp.	<i>In vitro</i>	<i>E. coli</i> RecA protein	Antimicrobial	Low RecA inhibition (13.1%)	[63]
	<i>Psoroma</i> spp.	<i>In vitro</i>	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	Antimicrobial	Bactericidal (MIC ₅₀ = 4 µg/ml; MIC ₉₀ = 8 µg/ml)	[97]
	<i>Psoroma pallidum</i> Nyl.	<i>In vitro</i>	Promastigotes forms of <i>Leishmania</i> spp	Antimicrobial	Total lysis of parasites (50 µg/ml)	[98]
	<i>Psoroma</i> spp.	<i>In vitro</i>	pBR322 plasmid DNA model SOR assay	Antioxidant	↓ NO-induced DNA damage Dose-dependent SOR scavenging effect	[95]
	<i>Psoroma</i> spp.	<i>In vitro</i>	Human PBMC cell line	Cytotoxic	Moderate cytotoxic effect	[97]
	<i>Psoroma</i> spp.	<i>In vitro</i>	Red blood cells	Cytotoxic	Significant hemolytic capacity	[96]
	<i>Psoroma</i> spp.	<i>In vitro</i>	Normal human prostatic epithelial DU-145 cell line	Cytotoxic	↓ Cell growth ↑ LDH release at 50 mM ↑ DNA fragmentation ↑ ROS	[94]

► **Table 1** Continued

Depside	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References
Peristictic acid	<i>Psoroma</i> spp.	<i>In vitro</i>	Human melanoma M14 cell line	Cytotoxic	↓ Cell growth ↑ LDH release at 50 mM ↑ DNA fragmentation ↑ ROS	[95]
	<i>Psoroma</i> spp.	<i>In vitro</i>	8-MOP-human serum albumin photobinding	Photoprotection	Inhibition of photobinding (35.2%)	[99]
Physodic acid	<i>Stereocaulon montagneum</i> I. M. Lamb.	<i>In vitro</i>	DPPH assay SOR assay	Antioxidant	DPPH scavenging activity (10%) High SOR scavenging activity	[91]
	<i>Stereocaulon montagneum</i> I. M. Lamb.	<i>In vitro</i>	Murine melanocytes B16 cell line Human keratinocyte HaCaT cell line UV-model	Cytotoxic	No cytotoxic No sunscreens action	[91]
Physodic acid	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	<i>In silico</i> <i>In vitro</i>	Virtual screening using validated pharmacophore models Microsomal fraction IL-1 β -stimulated A549 cells	Anti-inflammatory	Potential inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase 1 Inhibitors of mPGES-1 (IC50 = 0.4 μ M)	[107]
	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	Gram-positive bacteria: <i>B. mycoides</i> , <i>B. subtilis</i> ; Gram-negative bacteria: <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> Fungi: <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. verrucosum</i>	Antimicrobial	Antimicrobial activity (especially against <i>B. subtilis</i> and <i>B. mycoides</i> with MIC values of 0.0008 and 0.0016 mg/mL, respectively)	[101]
Physodic acid	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	<i>In vitro</i>	Cultured human amnion fibroblasts	Antioxidant	< 50 mg/L no oxidative stress and genotoxicity	[108]
	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	<i>In vitro</i>	Cultured Human lymphocytes (HLs)	Antioxidant	↑ Total antioxidant capacity (0.5–10 mg/L)	[109]
Physodic acid	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	DPPH assay SOR assay Reducing power	Antioxidant	High DPPH radical scavenging activity (IC50 69.11 μ g/mL) High SOR scavenging activity (IC50 = 118.17 μ g/mL) High reducing power	[101]
	<i>Hypogymnia lugubris</i> (Pers.) Krog	<i>In vitro</i>	A375 melanoma cancer cell line	Cytotoxic	Apoptosis ↓ Hsp70 expression	[100]
Physodic acid	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	<i>In vitro</i>	Human U87MG-GBM cell lines Primary rat cerebral cortex (PRCC) cells	Cytotoxic	↓ Cell viability (IC50 values of 698.19 mg/l for PRCC cells and 410.72 mg/L for U87MG cells) ↑ 8-OH-dG levels	[103]
	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	Human melanoma FemX cell line Human colon carcinoma LS174 cell line	Cytotoxic	Cytotoxic activity (IC50 = 19.52 μ g/mL for FemX, IC50 = 17.89 μ g/mL for LS174) ↑ Number cells in sub-G1 phase ↓ Number cells in S phase and G2/M phase	[101]
Physodic acid	<i>Hypogymnia enteromorpha</i> (Ach.) Nyl.	<i>In vitro</i>	<i>S. typhimurium</i> TA 98	Cytotoxic	Inhibition of reactive metabolites formation	[111]

continued

▶ Table 1 Continued

Depsidone	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References
Physodic acid	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	Colorectal cancer cell lines (HCT116 and DLD-1) Human keratinocytes HaCaT cell line	Cytotoxic	↓ Axin2 expression (especially in HCT116 cells) ↓ Survivin and MMP7 expression	[20]
	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	Isolated rat thymocytes	Cytotoxic	↓ Thymocytes proliferation ↑ Cytotoxicity ↑ ROS production ↓ MMP	[71]
Physodalic acid	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	Human cancer HeLa cell lines	Cytotoxic	↓ Cell viability: IC ₅₀ (24 h incubation) of 171 µg/mL and IC ₅₀ (72 h incubation) of 63 µg/mL	[105]
	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	Peripheral human lymphocytes	Cytotoxic	↓ Frequency of MN (28.2%)	[104]
Protocetraric acid	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	Breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7, and T-47D) Nontumorigenic MCF-10A cell line	Cytotoxic	Cytotoxic activity (IC ₅₀ 46.0–93.9 µM)	[102]
	–	<i>In vitro</i>	Human colon cancer HCT116 cell line Human leukemic K562 cell line Bladder cancer J82 and UM-UC-3 cell lines Human primary pancreatic adenocarcinoma BxPC-3 cell line	Cytotoxic	Inhibition of M-Phase Phosphoprotein 1 (MPP1) ATPase activity Weak cancer cell inhibitor (EC ₅₀ values ≈ 30 µM)	[106]
Physodalic acid	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i>	Murine neuroblastoma Neuro2A cells Murine hippocampal primary cultures	Neuroprotection	No cytotoxic effects Neurotrophic and neurogenic activity Modulation gene expression of BDNF and NGF	[110]
	<i>Hypogymnia enteromorpha</i> (Ach.) Nyl.	<i>In vitro</i>	<i>S. typhimurium</i> TA 98	Cytotoxic	Inhibition mutagenicity of a heterocyclic amine, Trp-P-2	[111]
Physodalic acid	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	Isolated rat thymocytes	Cytotoxic	↓ Thymocytes proliferation ↑ Cytotoxicity ↑ ROS production ↓ MMP	[71]
	<i>Hypogymnia enteromorpha</i> (Ach.) Nyl.	<i>In vitro</i>	<i>S. typhimurium</i> strain TA 100	Cytotoxic	↑ Mutagenicity	[111]
Protocetraric acid	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	Human cancer HeLa cell lines	Cytotoxic	↓ Cell viability: IC ₅₀ (24 h incubation) of 964 µg/mL and IC ₅₀ (72 h incubation) of 283 µg/mL	[105]
	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	<i>In vitro</i>	Peripheral human lymphocytes	Cytotoxic	↓ Frequency of MN (30.3%)	[104]
Protocetraric acid	<i>Hypogymnia lugubris</i> (Pers.) Krog	<i>In vitro</i>	<i>E. coli</i> RecA protein	Antimicrobial	Low RecA inhibition (11.5%)	[63]
	<i>Flavoparmelia caperata</i> L.	<i>In vitro</i>	<i>S. aureus</i>	Antimicrobial	Antibacterial activity (MIC 12.5 µg/mL)	[113]

continued

► Table 1 Continued						
Depsidone	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References
	<i>Usnea albob punctata</i> Nyl.	<i>In vitro</i>	Gram-positive bacteria: <i>B. subtilis</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>M. smegmatis</i> Gram-negative bacteria: <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhi</i> Fungi: <i>A. flavus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. gastrii</i> , <i>T. rubrum</i>	Antimicrobial	High activity against <i>S. typhi</i> (MIC value = 0.5 mg/mL), <i>K. pneumoniae</i> (MIC value = 1 mg/mL) and <i>T. rubrum</i> (MIC value = 1 mg/mL)	[112]
	<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	<i>In vitro</i>	<i>T. brucei brucei</i>	Antimicrobial	Antitrypanosomal activity	[67]
	<i>Parmelia caperata</i> (Ehrh. ex Ach.) Ach	<i>In vitro</i>	Gram-positive bacteria: <i>B. mycoides</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> Gram-negative bacteria: <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> Fungi: <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. verrucosum</i>	Antimicrobial	↑ Antibacterial activity than antifungal activity. High activity against <i>B. mycoides</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>S. aureus</i> (MIC value = 0.015 mg/mL)	[19]
	<i>Parmotrema dilatatum</i> (Vain.) Hale.	<i>In vitro</i>	<i>M. tuberculosis</i>	Antimicrobial	Antitubercular activity (MIC value = 125 µg/mL)	[93]
	<i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach.	<i>In vitro</i>	Gram-positive bacteria: <i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. faecalis</i> Gram-negative bacteria: <i>A. hydrophila</i> , <i>P. vulgaris</i> Fungi: <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	Antimicrobial	Active against <i>C. albicans</i> and <i>C. glabrata</i>	[92]
	<i>Parmelia caperata</i> (Ehrh. ex Ach.) Ach	<i>In vitro</i>	DPPH assay SOR assay	Antioxidant	Strong antioxidant activity (IC ₅₀ = 119.10 µg/mL for DPPH and 177.60 µg/mL for SOR)	[19]
	<i>Parmotrema dilatatum</i> (Vain.) Hale.	<i>In vitro</i>	Human melanoma UACC-62 cell line Mouse melanoma B16-F10 cell line Mouse 3T3 normal cells	Cytotoxic	↑ Stronger activity against UACC-62 melanoma cells Selective action against malignant cells	[89]
	<i>Parmelia caperata</i> (Ehrh. ex Ach.) Ach	<i>In vitro</i>	Human melanoma FemX cell line Human colon carcinoma LS174 cell line	Cytotoxic	Cytotoxic activity (IC ₅₀ = 58.68 µg/mL for FemX, IC ₅₀ = 60.18 µg/mL for LS174) ↑ Number cells in sub-G1 phase ↓ Number cells in S phase	[19]
Psoromic acid	–	<i>In vitro</i>	Monkey kidney epithelial Vero cell line HSV-1 and HSV-2 models of infection	Antimicrobial	Antitherpetic activity HSV-1 replication inhibition (IC ₅₀ = 1.9 µM) HSV-2 replication inhibition (IC ₅₀ = 2.7 µM) HSV-1 DNA polymerase inactivation (IC ₅₀ = 0.7 µM)	[116]
	<i>Squamaria cartilaginea</i> (With.) P. James	<i>In vitro</i>	<i>S. gordonii</i> , <i>P. gingivalis</i>	Antimicrobial	Antibacterial activity against <i>S. gordonii</i> (MIC value = 11.72 µg/mL) and <i>P. gingivalis</i> (MIC value = 5.86 µg/mL)	[117]
						continued

► Table 1 Continued

Depsidone	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References
	-	<i>In vitro</i>	<i>M. tuberculosis</i> strains	Antimicrobial	Antituberculosis activity (MIC values = 3.2–4.1 µM) Remarkable inhibition UGM (85.8%) and TBNAT (77.4%)	[118]
	-	<i>In vitro</i>	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>P. berghei</i> liver stage (LS) parasites <i>P. falciparum</i> blood-stage (BS) parasites	Antimicrobial	Antibacterial/Antimycobacterial Activity ↓ Growth bacterial Antiplasmodial activity Moderate LS activity (IC ₅₀ = 31.6 µM), high BS potential (IC ₅₀ = 29.2 µM) Plasmodial FAS-II enzyme (PffabI, PffabG, and PffabZ) inhibition	[119]
	<i>Usnea complanata</i> (Müll. Arg.) Motyka.	<i>In vivo</i>	FRSA assay NORSA assay LPI assay HMGR inhibitory activity ACE inhibitory activity	Antioxidant	Moderate-to-strong antioxidant activity (IC ₅₀ values 0.174–0.271 mg/mL) Competitive type of HMGR inhibition and mixed type of ACE inhibition	[120]
	-	<i>In vitro</i>	Fluorometric Assay	Cytotoxic	↑ RabGTPase inhibition (IC ₅₀ = 1.3 µM)	[114]
	-	<i>In vitro</i>	Splicing assay	Cytotoxic	Pre-mRNA splicing inhibitor	[115]
	-	<i>In vitro</i>	Primary cultures of rat hepatocytes	Cytotoxic	↑ Caspase 3 activity ↑ Subdiploid nuclei %	[18]
	<i>Usnea</i> sp	<i>In vitro</i>	Human melanoma UACC-62 cell line Mouse melanoma B16-F10 cell line Mouse 3T3 normal cells	Cytotoxic	↑ Stronger activity against UACC-62 melanoma cells Selective action against malignant cells	[89]
	-	<i>In vivo</i>	Zebrafish embryos (<i>B. rerio</i>) model	Toxicity	Hepatotoxicity (≥ 40%)	[119]
Salazinic acid	<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach	<i>In vitro</i>	<i>E. coli</i> RecA protein	Antimicrobial	Low RecA inhibition (8.4%)	[63]
	<i>Parmelia sulcata</i> Taylor	<i>In vitro</i>	Gram-positive bacteria: <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. faecalis</i> Gram-negative bacteria: <i>A. hydrophila</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i> Fungi: <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>P. notatum</i>	Antimicrobial	Antimicrobial activity specially against <i>B. cereus</i> (MIC values = 63 µg/mL)	[121]
	<i>Parmelia reticulata</i> Taylor.	<i>In vitro</i>	Fungi: <i>S. roffisii</i> , <i>R. solani</i> , <i>R. bataticola</i> , <i>F. udum</i> , <i>P. aphanidermatum</i> , <i>P. debaryanum</i>	Antimicrobial	Moderate active against <i>F. udum</i> (IC ₅₀ = 88.20 µg/mL)	[122]

continued

▶ Table 1 Continued						
Depsidone	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References
	<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach.	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>B. mycoides</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> Gram-negative bacteria: <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> Fungi: <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. verrucosum</i>	Antimicrobial	↑ Antibacterial activity than antifungal activity	[19]
	<i>Parmelia sulcata</i> Taylor					
	<i>Xanthoparmelia camtschadalis</i> (Ach.) Hale.	In vitro	ORAC assay Human U373 MG astrocytoma cell line Hydrogen peroxide-induced oxidative stress model	Antioxidant	ORAC value (2.74 μmol Trolox equivalents per milligram) ↑ Cell viability ↓ ROS production	[124]
	<i>Everniastrum cirrhatum</i> (Fr.) Hale ex Sipman <i>Rimelia cetrata</i> (Ach.) Hale & Fletcher	In vitro	DPPH assay Anti-linoleic acid peroxidation assay Trolox-equivalent antioxidant capacity assay	Antioxidant	Antioxidant activity (46.4 to 57.2%)	[123]
	–	In vitro	DPPH assay NBT assay Human keratinocytes HaCaT cell line	Antioxidant	Superoxide anion scavenger Good PF-UVA candidate (PF-UVA > 2)	[70]
	<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach.	In vitro	DPPH assay SOR assay	Antioxidant	Strong antioxidant activity (IC ₅₀ = 91.57 for DPPH and 138.23 μg/mL for SOR)	[19]
	<i>Parmelia sulcata</i> Taylor					
	–	In vitro	Primary cultures of rat hepatocytes	Cytotoxic	↑ Caspase 3 activity ↑ Subdiploid nuclei %	[18]
	<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach.	In vitro	Human melanoma FemX cell line Human colon carcinoma LS174 cell line	Cytotoxic	Cytotoxic activity (IC ₅₀ = 39.02 μg/mL for FemX and IC ₅₀ = 5.67 μg/mL for LS174) ↑ Number cells in sub-G1 phase ↓ Number cells in S phase	[19]
	<i>Parmelia sulcata</i> Taylor					
	<i>Parmelia sulcata</i> Taylor	In vitro	Colorectal cancer HCT116 and DLD-1 cell lines.	Cytotoxic	Moderate cytotoxic effects (100 μM)	[20]
	<i>Everniastrum cirrhatum</i> (Fr.) Hale ex Sipman	In vitro	<i>L. casei</i>	Probiotic	Moderate growth stimulating activity	[123]
	<i>Rimelia cetrata</i> (Ach.) Hale & Fletcher					
	<i>Xanthoparmelia somloensis</i> (Gyeln.) Hale	In vitro	Malignant mesothelioma MM98 cell line Vulvar carcinoma A431 cell line Human keratinocyte HaCaT cell line	Wound healing	Intermediate wound closure	[125]
						continued

► Table 1 Continued

Depsidone	Botanical origin	Type of study	Experimental model	Activities	Results	References	
Stictic acid	<i>Rhizoplaca aspidophora</i> (Vain) Redon	In vitro	<i>E. coli</i> RecA protein	Antimicrobial	Low RecA inhibition (16.7%)	[63]	
	–	In vitro	<i>F. tularensis</i> , <i>Y. pestis</i>	Antimicrobial	Inhibition of FabZ (<i>F. tularensis</i> , IC ₅₀ = 13.0 μM and <i>Y. pestis</i> , IC ₅₀ = 27.8 μM)	[55]	
	<i>Xanthoparmelia camtschadalis</i> (Ach.) Hale.	In vitro	ORAC assay Human U373 MG astrocytoma cell line Hydrogen peroxide-induced oxidative stress model	Antioxidant	ORAC value (2.32 μmol Trolox equivalents per milligram) ↑ Cell viability ↓ ROS production	[124]	
	<i>Stereocaulon montagnanum</i> I. M. Lamb.	In vitro	DPPH assay SOR assay Murine melanocytes B16 cell line Human HaCaT keratinocyte cell lines	Antioxidant	Low DPPH radical scavenging activity ↑ SOR scavenging activity	[91]	
	<i>Hypotrachyna revoluta</i> (Flörke) Hale.	In vitro	Hydroxyl radical scavenging assay	Antioxidant	Noteworthy antioxidant activity	[126]	
	–	In vitro	Primary cultures of rat hepatocytes	Cytotoxic	↑ Caspase 3 activity ↑ Subdiploid nuclei %	[18]	
	–	In silico	Docking studies	Cytotoxic	p53 activator ↓ Toxic adverse effects	[128]	
	–	In vitro In silico	Human Saos-2 cells expressing cancer mutant R175H Docking studies	Cytotoxic	p53 activity restoration Cell cycle inhibitor p21 inducer	[127]	
	Variolaric acid	<i>Ochrolechia deceptionis</i> (Hue) Darb	In vitro	<i>E. coli</i> RecA protein	Antimicrobial	Low RecA inhibition (3.2%)	[63]
		<i>Ochrolechia deceptionis</i> (Hue) Darb.	In vitro	Human breast adenocarcinoma MCF-7 cell line Human cervix adenocarcinoma HeLa cell line Human colon carcinoma HCT-116 cell line	Cytotoxic	No effect	[76]
Vicianin	<i>Psoroma pallidum</i> Nyl., <i>P. pulchrum</i> Malme	In vitro	<i>E. coli</i> RecA protein	Antimicrobial	Moderate RecA inhibition (73.7% inhibition)	[63]	
	<i>Psoroma pallidum</i> Nyl. <i>P. pulchrum</i> Malme	In vitro	Human breast adenocarcinoma MCF-7 cell line Human cervix adenocarcinoma HeLa cell line Human colon carcinoma HCT-116 cell line	Cytotoxic	↓ Cell viability (HeLa, IC ₅₀ = 67 μM and HCT-116, IC ₅₀ = 40.5 μM)	[76]	
	<i>Psoroma dimorphum</i> Malme	In vitro	Androgen-sensitive LNCaP and androgen-insensitive DU-145 human prostate cancer cells	Cytotoxic	↓ Cell viability ↑ Apoptosis	[129]	
	<i>Teloschistes flavicans</i> (Sw.) Norman.	In vitro	HL-60 cells	Cytotoxic	Higher cytotoxicity against HL-60 cells	[130]	

Lobaric acid showed high inhibition of PTP1B with an IC_{50} value of $0.87 \mu\text{M}$ [80, 81]. Tyrosine phosphatase protein is overexpressed in insulin-resistant states [80]. Indeed, Klamann et al. showed that PTP-1B regulates energy balance, insulin sensitivity, and body fat stores in *in vivo* studies [58].

Lobaric acid could inhibit inflammation in LPS-activated macrophages through regulation of NF- κ B/MAPK pathways, NLRP3 inflammasome activation, proinflammatory cytokines suppression (TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-18), and NO production inhibition [59, 60]. Moreover, lobaric acid reduced IL-8 expression and targeted PAR2 in an *in vitro* SLIGKV-NH₂-induced atopic dermatitis model in HaCaT keratinocytes [82]. Additionally, lobaric acid exerted anti-inflammatory activity by inhibiting NF- κ B and MAPK signaling pathways in TNF- α -stimulated mouse vascular smooth muscle cells [83]. Furthermore, lobaric acid turned out to be a potent arachidonate-5-lipoxygenase inhibitor (IC_{50} value of $7.3 \mu\text{M}$) [84].

Lobaric acid also showed antimicrobial activity against bacteria and viruses. Thus, this depsidone inhibited RecA from *E. coli* by noncompetitively binding the ATP site [63]. While it showed moderate activity against *Mycobacterium aurum* [85], the activity against methicillin-resistant clinical isolates strains of *S. aureus* with an MIC_{90} value of $64 \mu\text{g/mL}$ was good [62]. Moreover, lobaric acid showed anti-alphaviral activity against *Chikungunya* virus via Nsp1 GTP binding and guanylation inhibition in hamster BHK21 and human Huh 7 cell lines [56]. Furthermore, binding studies of Nsp1 from SARS-CoV-2, a nonstructural protein 1 related to viral processes as viral replication and translation regulation, showed greater binding affinities with lobaric acid [86].

Other assayed activities were its antioxidant activity (superoxide radical scavenging action with IC_{50} value of $97.9 \mu\text{mol}$) [87] and muscle relaxant as evidenced in the reduction of spontaneous muscle contractile activity in guinea-pig taenia coli [88].

Norstictic acid

The cytotoxic and antitumor role of norstictic acid has been evaluated in diverse *in vitro* (using different cancer cell lines) and *in vivo* models. Therefore, this compound has been shown to be effective for breast cancer treatment and prevention by targeting the c-Met signaling pathway and by suppressing the MDA-MB-231/GFP tumor growth in mammary cancer cells and breast cancer xenograft models in athymic nude mice [52]. Moreover, norstictic acid exerted a noticeable cytotoxic effect against different human melanoma cell lines (FemX, UACC-62, and B16-F10) [89, 90] by increasing apoptotic cells in the sub-G1 phase [89]. Contrary, other studies reported that norstictic acid was not cytotoxic for melanocyte cells [91].

Concerning its antimicrobial activity, norstictic acid showed low to moderate antibacterial and antifungal action against a wide range of Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, and fungi [63, 90, 92, 93]. For instance, norstictic acid inhibited *Mycobacterium tuberculosis* growth with a MIC value of $62.5 \mu\text{g/mL}$ [93] and *E. coli* with a value of $18.2 \mu\text{g/mL}$ [63].

Norstictic acid has also been shown to be a promising antioxidant agent against superoxide anion. On the other hand, its DPPH radical scavenging activity is not entirely clear, since its activity is contradictory in published works [90, 91].

Pannarin

Pannarin was able to inhibit the growth of the human melanoma M14 cell line and the human prostatic epithelial DU-145 cell line. Its cytotoxic activity has been related to oxidative stress induction as evidenced in ROS overproduction and DNA fragmentation [94, 95]. Moreover, pannarin showed cytotoxic activity against blood cells through a mechanism of hemolysis [96, 97].

Regarding antimicrobial activity, pannarin acted as bactericidal against methicillin-resistant *S. aureus*, and it also had a low capacity to inhibit *E. coli* RecA protein [63, 97]. Moreover, pannarin was effective as an antiparasitic agent against promastigote forms of *Leishmania* spp [98].

Pannarin also showed antioxidant properties as evidenced in its superoxide radical scavenging capacity and NO-induced DNA damage [95], and it has photoprotector capacity (35.2%) [99].

Physodic acid

There are several studies on the cytotoxic activity of physodic acid against different cancer and nontumorigenic cell lines from diverse origins (human or animal). Against A375 melanoma cancer cell line, physodic acid exhibited good cytotoxicity via apoptosis with a concentration-response relationship (range $6.25\text{--}50 \mu\text{M}$), showing inhibition of Hsp70 expression [100]. Other studies on FemX and LS174 cell lines revealed significant cytotoxic activity (IC_{50} value of $19.52 \mu\text{g/mL}$ for FemX, IC_{50} value of $17.89 \mu\text{g/mL}$ for LS174) with moderate proapoptotic activity. The number of cells in the sub-G1 phase increased, and the number of cells in the S phase and G2/M phase was lower, indicating a G0/G1 cell cycle arrest [101]. Moreover, physodic acid was cytotoxic on different breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7, and T-47D) with IC_{50} values that ranged from 46.0 to $93.9 \mu\text{M}$ [102]. Physodic acid displayed weak cytotoxic activity on human U87MG-GBM cell lines and primary rat cerebral cortex (PRCC) cells (IC_{50} value of 698.19 mg/mL for PRCC cells and IC_{50} value of 410.72 mg/mL for U87MG cells) [103]. Moreover, physodic acid reduced thymocyte proliferation-induced cytotoxicity via oxidative stress mainly through ROS production [71]. On lymphocytes, this depsidone significantly decreased micronucleus frequency (28.2%) compared to the positive control [104]. Furthermore, this compound proved to significantly reduce human cancer HeLa cell viability (IC_{50} [24 h] value of $171 \mu\text{g/mL}$ and IC_{50} [72 h] value of $63 \mu\text{g/mL}$) [105]. In another study, Talapatra et al. concluded that physodic acid was a weak cancer cell inhibitor (EC_{50} values $\approx 30 \mu\text{M}$) on multiple cancer cell lines (human colon cancer HTC116 cell line, human leukemic K562 cell line, bladder cancer J82 and UM-UC-3 cell lines, and human primary pancreatic adenocarcinoma BxPC-3 cell line) [106]. Physodic acid was studied as a modulator of β -catenin-dependent transcription on colorectal cancer (HCT116 and DLD-1). β -catenin transcription is related to cell survival and proliferation. Physodic acid reduced Axin2 (β -catenin target gene) expression (especially in HCT116 cells) and decreased survivin and MMP7 expression [20]. Also, this depsidone was probed as an inhibitor of MPP1, essential for the cytokinesis process, indicating noncompetitive ATP binding in *in silico* studies [106].

Antimicrobial activity was also examined in bacteria and fungi. Physodic acid had strong inhibitory capacity especially against

B. subtilis and *B. mycoides* with MIC values of 0.0008 and 0.0016 mg/mL, respectively [101].

In addition to cytotoxic and antimicrobial properties, *in vitro* and *in silico* models showed the anti-inflammatory activity of physodic acid. Virtual screening evaluation revealed that this depsidone inhibits microsomal prostaglandin E2 synthase-1 [107]. Determination of mPGES-1 inhibition was performed using a microsomal fraction of IL-1 β -stimulated A549 cells (IC₅₀ = 0.43 μ M) [107].

Physodic acid was also investigated as an antioxidant agent, showing high DPPH radical scavenging activity (IC₅₀ value of 69.11 μ g/mL), high SOR scavenging activity (IC₅₀ value of 118.17 μ g/mL), and high reducing power [101]. Lower concentrations of physodic acid tested in cultured human amnion fibroblasts (<50 mg/L) and cultured human lymphocytes (0.5–10 mg/L) showed antioxidant capacities [108, 109].

Moreover, physodic acid showed neuroprotective properties, exhibiting neurotrophic and neurogenic activity via modulation of gene expression of BDNF and NGF in *ex vivo* (murine hippocampal primary cultures) and *in vivo* (murine neuroblastoma Neuro2A cells) assays [110].

Physodalic acid

Cytotoxic activity of physodalic acid is also described. However, compared to physodic acid, physodalic presented weaker activity. Physodalic acid demonstrated a weak reduction of viability (IC₅₀ [24 h] value of 964 μ g/mL and IC₅₀ [72 h] value of 283 μ g/mL) on human cancer HeLa cell lines [105].

This compound also diminished the proliferation of thymocytes inducing cytotoxicity via ROS production. Physodalic acid reduced the frequency of micronucleus (30.3%) on lymphocytes [71, 104].

Despite being reported as mutagenic in *S. typhimurium* TA 100 [83], physodalic acid inhibited the mutagenicity of a heterocyclic amine, Trp-P-2, in *S. typhimurium* TA 98 [111].

Protocetraric acid

Most of the studies on protocetraric acid referred to its antimicrobial activity. Particularly, this depsidone inhibited pathogenic bacteria growth such as *S. aureus* (MIC value of 12.5 μ g/mL), *M. tuberculosis* (MIC value of 125 μ g/mL), *S. typhi* (MIC value of 0.5 mg/mL), *K. pneumoniae* (MIC value of 1 mg/mL), and *B. mycoides*, *B. subtilis*, and *S. aureus* (MIC value of 0.015 mg/mL) [19, 93, 112, 113]. Moreover, protocetraric acid revealed a marked antifungal activity against *T. rubrum* (MIC value of 1 mg/mL), *C. albicans*, and *C. glabrata* (MIC value of 3.9 μ g/ μ l) [92, 112]. Furthermore, protocetraric acid showed trypanocidal activity against *T. brucei brucei* with a MIC value of 6.30 μ M [67].

Protocetraric acid also demonstrated cytotoxic activity against melanomas cell lines (IC₅₀ values of 0.52 μ g/mL for UACC-62 cells and 58.68 μ g/mL for FemX cells) and colon carcinoma cell line (IC₅₀ value of 60.18 μ g/mL for LS174 cells) [19, 89].

This depsidone had also an effective antioxidant action as evidenced in DPPH and superoxide anions radical scavenging activity [19].

Psoromic acid

Psoromic acid presented an inhibitory effect against melanoma cell lines (UACC-62 and B16-F10) and primary cultures of rat hepatocytes [18, 89]. The cytotoxic activity of psoromic acid was related to its capacity to induce an apoptotic response and to inhibit splicing and Rab GTPase [18, 114, 115].

Psoromic acid was also of interest as an antiviral agent, as it blocked HSV-1 and HSV-2 replication and DNA synthesis [116]. Moreover, this depsidone reduced bacterial growth of *Streptococcus gordonii* (MIC value of 11.72 μ g/mL), *Porphyromonas gingivalis* (MIC value of 5.86 μ g/mL), and *M. tuberculosis* strains (3.2–4.1 μ M) [116–118]. Furthermore, psoromic acid acts as an inhibitor of *Plasmodium* liver stages targeting the plasmodial FAS-II pathway [119]. *In vivo* studies determined that psoromic acid was hepatotoxic in fabp10a: DsRed2 zebrafish larvae (\geq 40%) [119].

Using different *in vitro* antioxidant assays, Behera et al. revealed that psoromic acid had moderate to strong antioxidant activity [120].

Salazinic acid

Salazinic acid displayed cytotoxic activity against colorectal cancer cell lines (HCT116, DLD-1, and LS174), melanoma cancer cell lines (FemX), and primary cultures of rat hepatocytes by inducing apoptosis and cell cycle arrest [18–20].

Considering its antimicrobial activity, salazinic acid inhibited *B. mycoides* and *B. subtilis* growth with a MIC value of 0.0008 μ g/mL and *B. cereus* with a MIC value of 63 μ g/mL [19, 121]. However, this depsidone was ineffective as an *E. coli* Rec A protein inhibitor [63]. Moreover, salazinic acid showed moderate antifungal activity against *Fusarium udum* (IC₅₀ value of 88.20 μ g/mL) [122]. Furthermore, this compound promoted growth effects on probiotic bacteria *Lactobacillus casei* [123].

Salazinic acid has also turned out to be interesting as an antioxidant compound as revealed in different *in vitro* assays (DPPH assay, SOR assay, ORAC assay) [19, 70, 123, 124]. Because of its antioxidant properties, this depsidone increased cell viability and reduced ROS production in a hydrogen peroxide-induced oxidative stress model in the human U373 MG astrocytoma cell line [124]. Moreover, salazinic acid proved to protect against UVA sun-rays (PF-UVA > 2) [70].

Another property attributed to salazinic action is its ability to heal wounds on HaCaT keratinocytes [125].

Stictic acid

Stictic acid has been investigated for its antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic properties. This promising compound showed antioxidant activity in diverse *in vitro* test models. Despite its low DPPH radical scavenging activity (less than 10%), stictic acid exhibited moderate ORAC values (2.32 μ molTE/mg), high SOR scavenging activity (IC₅₀ value of 35 μ M), and good hydroxyl radical scavenging activity (7.63 Trolox equivalents) [91, 124, 126]. Furthermore, in hydrogen peroxide-induced oxidative stress conditions, this depsidone protected human U373 MG astrocytoma cell line at 5, 10, and 25 g/mL concentrations via inhibition of ROS production [124]. These findings showed that stictic acid may be a potential neuroprotective compound.

On the other hand, cytotoxicity evaluation on murine melanocytes B16 cells and human HaCaT keratinocyte cell lines showed no safety; therefore, its possible cosmetic use was dismissed [91].

Enzymes involved in fatty acid biosynthesis processes such as FabZ are excellent targets for developing broad-spectrum antibiotics. Differences between FAS systems (bacterial and human) imply that the inhibition process does not interfere with the host. Stictic acid exhibited a significant inhibitory effect against *Francisella tularensis* (IC₅₀ value of 13 μM) and *Yersinia pestis* (IC₅₀ value of 27 μM) β-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ) [55]. Stictic acid's antimicrobial properties have been investigated, along with other depsidones through *E. coli* RecA protein inhibition. RecA is related to bacterial SOS response regulation, which is involved in resistance to antimicrobials. Stictic acid exhibited low RecA inhibition (16.7%) [63].

In vitro and *in silico* assays reported cytotoxic activity of this compound. In human cancer, p53 genes mutate frequently. Using docking studies, stictic acid showed potential p53 reactivation by binding to a transiently open L1/S3 pocket of the p53 core domain [127]. In another study, stictic acid showed great potential as a p53 activator and less adverse effect but poor pharmacokinetic properties [128]. To support *in silico* assays, stictic acid was biologically evaluated in human Saos-2 cells expressing cancer mutant R175H, restoring p53 activity via induction of the cell cycle inhibitor p21 [127]. Moreover, stictic acid displayed cytotoxic activity in different cell lines. In primary cultures of rat hepatocytes, this depsidone showed significant concentration-dependent activation of caspase 3 and an increased percentage of subdiploid nuclei (DNA fragmentation) [18].

Variolaric acid

While variolaric acid was tested to evaluate its cytotoxic and antimicrobial activity, the viability assays reported no significant effect on human breast adenocarcinoma cell line MCF-7, human cervical adenocarcinoma cell line HeLa, and human colon carcinoma HCT-116 [76]. Moreover, this depsidone had a low capacity to inhibit *E. coli* RecA protein (3.2%) [63].

Vicanicin

Cytotoxic activity of vicanicin was evaluated in different cell cancer lines, showing significant loss of viability in a concentration-dependent manner on human cervix adenocarcinoma HeLa cell lines and human colon carcinoma HCT-116 (IC₅₀ values of 67 μM and 40.5 μM, respectively). However, vicanicin did not have effects on human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. This depsidone neither exhibited antiradical activity nor reduced intracellular ROS level, dismissing both as the potential mechanism of cytotoxicity [76].

In the model of androgen-sensitive (LNCaP) and androgen-insensitive (DU-145) human prostate cancer cells, vicanicin decreased cell growth by the induction of apoptosis. The expression of Bcl-2, Bax, TRAIL, COX-2, NOS2, and Hsp70 proteins was analyzed, and the inhibition of Hsp70 proteins expression as a mediator of the process should be highlighted [129]. Moreover, this depsidone exhibited moderate activity against HL-60 cells as revealed on antileukemic assay [130]. Regarding its antimicrobial

activity, this depsidone showed moderate inhibition of *E. coli* RecA protein (73%) [63].

Other Depsidones

Many depsidones have been identified but barely studied. Computational studies have revealed that connorstictic acid, cryptostictic acid, conhyprotocetraric acid, hypoprotocetraric acid, and gangaleoidin, among other depsidones, are potent hydroxyl and superoxide anion radical scavengers in polar environments [131]. Other stictic acid derivatives also displayed antioxidant activities such as peristictic acid and cryptostictic acid that showed weak DPPH radical scavenging activity (about 10%) and potent superoxide anion radical scavenging activity equivalent to that of ascorbic acid. These compounds showed no cytotoxicity on B16 murine melanoma and HaCaT human keratinocyte cell lines (IC₅₀ higher than 100 μM) [91]. The compounds 8'-O-methylstictic and deoxystictic acid showed radical scavenging activity (61.85 and 13.176 Trolox equivalents, respectively) [126]. Moreover, 8'-O-methylstictic acted as a DPPH scavenger and had good properties for skin penetration (lipophilicity and permeability) [132].

These derivatives have also displayed other activities. For example, hypostictic acid showed antimicrobial properties due to its moderate inhibitory activity against *M. tuberculosis* (MIC value of 94 μg/mL) [93]. The compound 8'-O-ethylstictic presented moderate cytotoxicity against human epithelial carcinoma HeLa, human lung cancer NCI-H460, liver hepatocellular carcinoma HepG2, and human breast cancer MCF-7 cell lines [133].

Other depsidones recently identified, such as ceratinalone and flavicansone, isolated from *Usnea ceratina* Ach. and *Teloschistes flavicans* (Sw.) Norman, respectively, have also shown cytotoxic properties [130, 133]. Ceratinalone has been tested against different cancer cell lines such as human epithelial carcinoma HeLa, human lung cancer NCI-H460, liver hepatocellular carcinoma HepG2, and human breast cancer MCF-7. It acted as a moderate cytotoxic agent [133]. On the other hand, flavicansone exhibited cytotoxic activity as evidenced in an antileukemic assay against HL-60 cells (IC₅₀ value of 58 μM) [130].

Conclusions and Future Perspectives

Indeed, lichens produce unique bioactive secondary metabolites such as depsidones. Most pharmacological studies of depsidones focus on fumarprotocetraric acid, lobaric acid, norstictic acid, physodic acid, salazinic acid, and stictic acid compounds. Lichen depsidones have proven their ability to perform diverse biological activities, with cytotoxic, antimicrobial, and antioxidant the most studied. While many published works are on *in vitro* studies, the *in vivo* studies are very limited, and no clinical trials are yet available.

The cytotoxic activity has been evaluated against different cell lines of animal and human origin. Most of these works on cytotoxic activity are based on assessing their effect on cell viability, however, there are fewer studies that clarify the molecular targets and signaling pathways. The most interesting depsidones with cytotoxic activity included lobaric and physodic acids. Regarding the antimicrobial activity, most of the studies evaluated antibacterial

activity against both Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria and fungi, mainly *Candida* spp. Among depsidones, fumarprotocetraric and protocetraric acids are emphasized for their antimicrobial properties. The antioxidant activity has been investigated using techniques such as the DPPH method and ORAC assay as well as in cellular and animal models of oxidative stress. The compounds salazinic acid and stictic acid stand out for their antioxidant properties.

Our study revealed that the future perspectives of pharmacological research on depsidones should focus on:

1. Deepening the activities for these depsidones, clarifying the mechanism of action.
2. Evaluating other and novel potential actions and properties of depsidones.
3. Investigating the potential therapeutic activity of unstudied depsidones from a pharmacological perspective as notatic acid, nortotatic acid, constictic acid, and diploicin.
4. Performing more *in vivo* studies confirming the activity shown in *in vitro* studies.
5. Conducting clinical trials for those depsidones that have shown potential pharmacological activities.

Contributors' Statement

Data collection: I.M. Ureña-Vacas, E. González-Burgos; drafting the manuscript: I.M. Ureña-Vacas, E. González-Burgos; critical revision of the manuscript: P.K. Divakar, M.P. Gómez-Serranillos.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities (PID2019-105312GB-I00) and the Santander-University Complutense of Madrid (PR87/19-22637). I. Ureña-Vacas is supported by a grant CT42/18-CT43/18 from Complutense University of Madrid for predoctoral research.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Aschenbrenner IA, Cernava T, Berg G, Grube M. Understanding microbial multi-species symbioses. *Front Microbiol* 2016; 7: 180. doi:10.3389/fmicb.2016.00180
- [2] Calcott MJ, Ackerley DF, Knight A, Keyzers RA, Owen JG. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem Soc Rev* 2018; 47: 1730–1760. doi:10.1039/c7cs00431a
- [3] Ivanova D, Ivanov D. Ethnobotanical use of lichens: lichens for food review. *Scr Sci Med* 2009; 41: 11. doi:10.14748/ssm.v41i1.456
- [4] Singh H, Husain T, Agnihotri P, Pande PC, Khatoon S. An ethnobotanical study of medicinal plants used in sacred groves of Kumaon Himalaya, Uttarakhand, India. *J Ethnopharmacol* 2014; 154: 98–108. doi:10.1016/j.jep.2014.03.026
- [5] Devkota S, Chaudhary R, Werth S, Scheidegger C. Indigenous knowledge and use of lichens by the lichenophilic communities of the Nepal Himalaya. *J Ethnobiol Ethnomed* 2017; 13: 1–10. doi:10.1186/s13002-017-0142-2
- [6] Molnár K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review. *Z Naturforsch C J Biosci* 2010; 65: 157–173. doi:10.1515/znc-2010-3-401
- [7] Furmanek Ł, Czarnota P, Seaward MRD. Antifungal activity of lichen compounds against dermatophytes: a review. *J Appl Microbiol* 2019; 127: 308–325. doi:10.1111/jam.14209
- [8] Rankovic B, Kosanic M. Lichens as a Potential Lichen Source of bioactive secondary Metabolites. In: Rankovic B, ed. *Lichen secondary Metabolites. Bioactive Properties and pharmaceutical Potential*. Cham, Switzerland: Springer International; 2015: 1–26
- [9] Nash TH, Ryan BD, Gries C, Bungartz F. *Lichen Flora of the greater Sonoran Desert Region*. Dexter, MI: Arizona State University, Thomas-shore, Inc.; 2002
- [10] Fernández-Moriano C, Gómez-Serranillos MP, Crespo A. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharm Biol* 2016; 54: 1–17. doi:10.3109/13880209.2014.1003354
- [11] Solárová Z, Liskova A, Samec M, Kubatka P, Büsselberg D, Solár P. Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. *Biomolecules* 2020; 10: 87. doi:10.3390/biom10010087
- [12] Piovano M, Garbarino JA, Giannini FA, Correché ER, Feresin G, Tapia A, Zacchino S, Enriz RD. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Bol Soc Chil Quím* 2002; 47: 235–240. doi:10.4067/S0366-16442002000300006
- [13] Podterob A. Chemical composition of lichens and their medical applications. *Pharm Chem J* 2008; 42: 582–588. doi:10.1007/s11094-009-0183-5
- [14] Shukla V, Joshi GP, Rawat MSM. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: A review. *Phytochem Rev* 2010; 9: 303–314. doi:10.1007/s11101-010-9189-6
- [15] Vickery ML, Vickery B. Polyketides. In: *Secondary Plant Metabolism*. London: MacMillan Press; 1981: 88–111
- [16] Legaz M, de Armas R, Vicente C. Bioproduction of Depsidones for pharmaceutical Purposes. In: Rundfeldt C, ed. *Drug Development—A case Study based Insight into modern Strategies*. InTech; 2011. doi:10.5772/27051. Accessed November 1, 2020 at: <http://www.intechopen.com/books/drug-development-a-case-study-based-insight-into-modern-strategies/bioproduction-of-depsidones-for-pharmaceutical-purposes>
- [17] Ibrahim SRM, Mohamed GA, Al Haidari RA, El Kholy AA, Zayed MF, Khayat MT. Biologically active fungal depsidones: chemistry, biosynthesis, structural characterization, and bioactivities. *Fitoterapia* 2018; 129: 317–365. doi:10.1016/j.fitote.2018.04.012
- [18] Correché ER, Enriz RD, Piovano M, Giannini F, Garbarino J, Enriz D. Cytotoxic and apoptotic effects on hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens. *Altern Lab Anim* 2004; 32: 605–615. doi:10.1177/026119290403200611
- [19] Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Stanojković T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine* 2012; 19: 1166–1172. doi:10.1016/j.phymed.2012.07.012
- [20] Paluszczak J, Kleszcz R, Studzińska-Sroka E, Krajka-Kuźniak V. Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2018; 441: 109–124. doi:10.1007/s11010-017-3178-7
- [21] Honegger R. Lichen-forming Fungi and their Photobionts. In: Deising HB, ed. *Plant Relationships. The Mycota (A comprehensive Treatise on Fungi as experimental Systems for basic and applied Research)*. Berlin: Springer; 2009: 307–333. doi:10.1007/978-3-540-87407-2_16
- [22] Brunauer G, Hager A, Grube M, Türk RM, Stocker-Wörgötter E. Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages. *Plant Physiol Biochem* 2007; 45: 146–151. doi:10.1016/j.plaphy.2007.01.004

- [23] Elshobary ME, Osman ME, Abo-Shady AM, Komatsu E, Perreault H, Sorensen J, Piercey-Normore MD. Algal carbohydrates affect polyketide synthesis of the lichen-forming fungus *Cladonia rangiferina*. *Mycologia* 2016; 108: 646–656. doi:10.3852/15-263
- [24] Díaz E, Zamora J, Ruibal C, Divakar PK, González-Benítez N, Le Devehat F, Chollet M, Ferron S, Sauvager A, Boustie J, Crespo A, Molina MC. Axenic culture and biosynthesis of secondary compounds in lichen symbiotic fungi, the Parmeliaceae. *Symbiosis* 2020; 82: 1–15. doi:10.1007/s13199-020-00719-3
- [25] Gauslaa Y, Bidussi M, Solhaug KA, Asplund J, Larsson P. Seasonal and spatial variation in carbon based secondary compounds in green algal and cyanobacterial members of the epiphytic lichen genus *Lobaria*. *Phytochemistry* 2013; 94: 91–98. doi:10.1016/j.phytochem.2013.04.003
- [26] Nguyen KH, Chollet-Krugler M, Gouault N, Tomasi S. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat Prod Rep* 2013; 30: 1490–1508. doi:10.1039/c3np70064j
- [27] Stocker-Wörgötter E. Biochemical Diversity and Ecology of Lichen-forming Fungi: Lichen Substances, chemosyndromic Variation and Origin of Polyketide-Type Metabolites (biosynthetic Pathways). In: Upreti DK, Divakar PK, Shukla V, Bajpai R, eds. *Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques*, Volume 2. New Delhi: Springer; 2015: 161–180. doi:10.1007/978-81-322-2235-4_9
- [28] Parrot D, Legrave N, Delmail D, Grube M, Suzuki M, Tomasi S. Review – Lichen-associated bacteria as a hot spot of chemodiversity: Focus on unciamycin, a promising compound for future medicinal applications. *Planta Med* 2016; 82: 1143–1152. doi:10.1055/s-0042-105571
- [29] Hawksworth D, Grube M. Lichens redefined as complex ecosystems. *New Phytol* 2020; 227: 1281–1283. doi:10.1111/nph.16630
- [30] Smith H, Dal Grande F, Muggia L, Keuler R, Divakar PK, Grewe F, Schmitt I, Thorsten Lumbsch H, Leavitt SD. Metagenomic data reveal diverse fungal and algal communities associated with the lichen. *Symbiosis* 2020; 82: 133–147. doi:10.1101/2020.03.04.966853
- [31] Mosbach K. Biosynthesis of lichen substances, products of a symbiotic association. *Angew Chem* 1969; 8: 240–250. doi:10.1002/anie.196902401
- [32] Elix JA, Stocker-Wörgötter E. *Biochemistry and secondary Metabolites*. In: Thomas H Nash III, ed. *Lichen Biology*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2008: 104–133. doi:10.1017/CBO9780511790478.008
- [33] Huneck S, Yoshimura I. *Identification of Lichen Substances*. Berlin-Heidelberg: Springer; 1996: 493
- [34] Culberson CF. Joint occurrence of a lichen depsidone and its probable depside precursor. *Science* 1964; 143: 255–256. doi:10.1126/science.143.3603.255
- [35] Erdtman HGH. The chemistry of forest, humic acids, lichens, lignans, lignins and conifers. *Tappi* 1962; 45: 14A, 16A, 18A, 20A, 26A, 28A, 30A, 34A, 36A, 38A
- [36] Culberson WL, Culberson CF. *The Lichen Genera Cetrrelia and Platismatia (Parmeliaceae)*. Systematic Plant Studies. Contributions from the United States National Herbarium. Washington, DC: Smithsonian Institution Press; 1968: 449–558
- [37] Culberson CF. A note on the chemical strains of *Pseudevernia furfuracea*. *Bryologist* 1965; 68: 435–439
- [38] Elix JA, Jenie UA, Parker JL. A novel synthesis of the lichen depsidones divaronic acid and stenosporonic acid, and the biosynthetic implications. *Aust J Chem* 1987; 40: 1451–1464
- [39] Stocker-Wörgötter E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Nat Prod Rep* 2008; 25: 188–200. doi:10.1039/b606983p
- [40] Schmitt I, Martín MP, Kautz S, Lumbsch HT. Diversity of non-reducing polyketide synthase genes in the Pertusariales (lichenized Ascomycota): a phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 2005; 66: 1241–1253. doi:10.1016/j.phytochem.2005.04.014
- [41] Armaleo D, Sun X, Culberson C. Insights from the first putative biosynthetic gene cluster for a lichen depside and depsidone. *Mycologia* 2011; 103: 741–754. doi:10.3852/10-335
- [42] Bertrand RL, Abdel-Hameed M, Sorensen JL. Lichen biosynthetic gene clusters. Part I. Genome sequencing reveals a rich biosynthetic potential. *J Nat Prod* 2018; 81: 723–731. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00769
- [43] Armaleo D, Müller O, Lutzoni F, Andr sson  S, Blanc G, Bode HB, Collart FR, Dal Grande F, Dietrich F, Grigoriev IV, Joneson S, Kuo A, Larsen PE, Logsdon JM Jr, Lopez D, Martin F, May SP, McDonald TR, Merchant SS, Miao V, Morin E, Oono R, Pellegrini M, Rubinstein N, Sanchez-Puerta MV, Savelkoul E, Schmitt I, Slot JC, Soanes D, Sz v nyi P, Talbot NJ, Veneault-Fourrey C, Xavier BB. The lichen symbiosis re-viewed through the genomes of *Cladonia grayi* and its algal partner *Asterochloris glomerata*. *BMC Genom* 2019; 20: 605. doi:10.1186/s12864-019-5629-x
- [44] Pizarro D, Divakar PK, Grewe F, Crespo A, Dal Grande F, Lumbsch HT. Genome-wide analysis of biosynthetic gene cluster reveals correlated gene loss with absence of usnic acid in lichen-forming fungi. *Genome Biol Evol* 2020; 12: 1858–1868. doi:10.1093/gbe/evaa189
- [45] Hunyadi A. The mechanism(s) of action of antioxidants: From scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the generation of bioactive secondary metabolites. *Med Res Rev* 2019; 39: 2505–2533. doi:10.1002/med.21592
- [46] Manojlovic NT, Vasiljevic PJ, Maskovic PZ, Juskovic M, Bogdanovic-Dusanovic G. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 452431. doi:10.1155/2012/452431
- [47] Williams D, Loganzo F, Whitney L, Togias J, Harrison R, Singh M, McDonald L, Chelvendran S, Andersen R. Depsides isolated from the Sri Lankan lichen *Parmotrema* sp. exhibit selective Plk1 inhibitory activity. *Pharm Biol* 2011; 49: 296–301. doi:10.3109/13880209.2010.517540
- [48] Hong JM, Suh SS, Kim TK, Kim JE, Han SJ, Youn UJ, Yim JH, Kim IC. Anticancer activity of lobaric acid and lobarstin extracted from the antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *Molecules* 2018; 23: 658. doi:10.3390/molecules23030658
- [49] Huang Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene* 2000; 19: 6627–6631. doi:10.1038/sj.onc.1204087
- [50] Emsen B, Ozdemir O, Engin T, Togar B, Cavusoglu S, Turkez H. Inhibition of growth of U87MG human glioblastoma cells by *Usnea longissima* Ach. *An Acad Bras Cienc* 2019; 91: e20180994. doi:10.1590/0001-3765201920180994
- [51] Wisastra R, Dekker FJ. Inflammation, cancer and oxidative lipoygenase activity are intimately linked. *Cancers (Basel)* 2014; 6: 1500–1521. doi:10.3390/cancers6031500
- [52] Ebrahim HY, Elsayed HE, Mohyeldin MM, Akl MR, Bhattacharjee J, Egbert S, El Sayed KA. Norstictic acid inhibits breast cancer cell proliferation, migration, invasion, and *in vivo* invasive growth through targeting c-Met. *Phytother Res* 2016; 30: 557–566. doi:10.1002/ptr.5551
- [53] Zhang Y, Xia M, Jin K, Wang S, Wei H, Fan C, Wu Y, Li X, Li G, Zeng Z, Xiong W. Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer* 2018; 17: 45. doi:10.1186/s12943-018-0796-y
- [54] Alam MK, Alhhazmi A, DeCoteau JF, Luo Y, Geyer CR. RecA inhibitors potentiate antibiotic activity and block evolution of antibiotic resistance. *Cell Chem Biol* 2016; 23: 381–391. doi:10.1016/j.chembiol.2016.02.010
- [55] McGillick BE, Kumaran D, Vieni C, Swaminathan S. β -Hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ) from *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*: structure determination, enzymatic characterization, and cross-inhibition studies. *Biochemistry* 2016; 55: 1091–1099. doi:10.1021/acs.biochem.5b00832

- [56] Feibelman KM, Fuller BP, Li L, LaBarbera DV, Geiss BJ. Identification of small molecule inhibitors of the Chikungunya virus nsP1 RNA capping enzyme. *Antiviral Res* 2018; 154: 124–131. doi:10.1016/j.antiviral.2018.03.013
- [57] Panzhinskiy E, Ren J, Nair S. Pharmacological inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B: a promising strategy for the treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Curr Med Chem* 2013; 20: 2609–2625. doi:10.2174/0929867311320210001
- [58] Klamann LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim YB, Sharpe AH, Stricker-Krongrad A, Shulman GI, Neel BG, Kahn BB. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5479–5489. doi:10.1128/mcb.20.15.5479-5489.2000
- [59] Carpentier C, Barbeau X, Azelmat J, Vaillancourt K, Grenier D, Lagüe P, Voyer N. Lobaric acid and pseudodepsidones inhibit NF- κ B signaling pathway by activation of PPAR- γ . *Bioorg Med Chem* 2018; 26: 5845–5851. doi:10.1016/j.bmc.2018.10.035
- [60] Lee HW, Kim J, Yim JH, Lee HK, Pyo S. Anti-inflammatory activity of lobaric acid via suppressing NF- κ B/MAPK pathways or NLRP3 inflammatory activation. *Planta Med* 2019; 85: 302–311. doi:10.1055/a-0777-2420
- [61] Millot M, Tomasi S, Articus K, Rouaud I, Bernard A, Boustie J. Metabolites from the lichen *Ochrolechia parella* growing under two different heliotropic conditions. *J Nat Prod* 2007; 70: 316–318. doi:10.1021/np060561p
- [62] Bellio P, Segatore B, Mancini A, Di Pietro L, Bottoni C, Sabatini A, Brisdelli F, Piovano M, Nicoletti M, Amicosante G, Perilli M, Celenza G. Interaction between lichen secondary metabolites and antibiotics against clinical isolates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Phytomedicine* 2015; 22: 223–230. doi:10.1016/j.phymed.2014.12.005
- [63] Bellio P, Di Pietro L, Mancini A, Piovano M, Nicoletti M, Brisdelli F, Tondi D, Cendron L, Franceschini N, Amicosante G, Perilli M, Celenza G. SOS response in bacteria: Inhibitory activity of lichen secondary metabolites against *Escherichia coli* RecA protein. *Phytomedicine* 2017; 29: 11–18. doi:10.1016/j.phymed.2017.04.001
- [64] Yilmaz M, Türk AO, Tay T, Kivanç M. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (–)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Z Naturforsch C J Biosci* 2004; 59: 249–254. doi:10.1515/znc-2004-3-423
- [65] Ranković B, Misić M, Sukdolak S. Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Br J Biomed Sci* 2007; 64: 143–148. doi:10.1080/09674845.2007.11732776
- [66] Pompilio A, Pomponio S, Di Vincenzo V, Crocetta V, Nicoletti M, Piovano M, Garbarino JA, Di Bonaventura G. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. *Future Microbiol* 2013; 8: 281–292. doi:10.2217/fmb.12.142
- [67] Igloli JO, Gray AI, Clements CJ, Kantheti P, Singla RH. Antitrypanosomal activity & docking studies of isolated constituents from the lichen *Cetraria islandica*: possibly multifunctional scaffolds. *Curr Top Med Chem* 2014; 14: 1014–1021. doi:10.2174/1568026614666140324122323
- [68] Fernández-Moriano C, Divakar PK, Crespo A, Gómez-Serranillos MP. *In vitro* neuroprotective potential of lichen metabolite fumarprotocetraric acid via intracellular redox modulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017; 316: 83–94. doi:10.1016/j.taap.2016.12.020
- [69] de Barros Alves GM, de Sousa Maia MB, de Souza Franco E, Galvão AM, da Silva TG, Gomes RM, Martins MB, da Silva Falcão EP, de Castro CM, da Silva NH. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. *Pulm Pharmacol Ther* 2014; 27: 139–143. doi:10.1016/j.pupt.2013.07.002
- [70] Lohézić-Le Dévéhat F, Legouin B, Couteau C, Boustie J, Coiffard L. Lichenic extracts and metabolites as UV filters. *J Photochem Photobiol B* 2013; 120: 17–28. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.01.009
- [71] Pavlovic V, Stojanovic I, Jadranin M, Vajs V, Djordjević I, Smelcerovic A, Stojanovic G. Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. *Food Chem Toxicol* 2013; 51: 160–164. doi:10.1016/j.fct.2012.04.043
- [72] Cetin H, Tufan-Cetin O, Turk AO, Tay T, Candan M, Yanikoglu A, Sumbul H. Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae). *Nat Prod Res* 2012; 26: 350–355. doi:10.1080/14786411003774296
- [73] Yilmaz M, Tay T, Kivanç M, Türk H, Türk AO. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulosa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent. *Z Naturforsch C J Biosci* 2005; 60: 35–38. doi:10.1515/znc-2005-1-207
- [74] Ogmundsdóttir HM, Zoëga GM, Gissurarson SR, Ingólfssdóttir K. Anti-proliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50: 107–115. doi:10.1111/j.2042-7158.1998.tb03312.x
- [75] Bucar F, Schneider I, Ogmundsdóttir H, Ingólfssdóttir K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. *Phytomedicine* 2004; 11: 602–606. doi:10.1016/j.phymed.2004.03.004
- [76] Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Bozzi A, Amicosante G, Celenza G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. *Phytother Res* 2013; 27: 431–437. doi:10.1002/ptr.4739
- [77] Haraldsdóttir S, Guolaugsdóttir E, Ingólfssdóttir K, Ogmundsdóttir HM. Anti-proliferative effects of lichen-derived lipoxygenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin *in vitro*. *Planta Med* 2004; 70: 1098–1100. doi:10.1055/s-2004-832657
- [78] Morita H, Tsuchiya T, Kishibe K, Noya S, Shiro M, Hirasawaa Y. Antimitotic activity of lobaric acid and a new benzofuran, sakisacaulon A from *Stereocaulon sasakii*. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 3679–3681. doi:10.1016/j.bmcl.2009.03.170
- [79] Ozgencli I, Budak H, Ciftci M, Anar M. Lichen acids may be used as a potential drug for cancer therapy; by inhibiting mitochondrial thioredoxin reductase purified from rat lung. *Anticancer Agents Med Chem* 2018; 18: 1599–1605. doi:10.2174/1871520618666180525095520
- [80] Seo C, Sohn JH, Ahn JS, Yim JH, Lee HK, Oh H. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory effects of depsidone and pseudodepsidone metabolites from the antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 2801–2803. doi:10.1016/j.bmcl.2009.03.108
- [81] Kim TK, Kim JE, Youn UJ, Han SJ, Kim IC, Cho CG, Yim JH. Total syntheses of lobaric acid and its derivatives from the antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *J Nat Prod* 2018; 81: 1460–1467. doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00227
- [82] Joo YA, Chung H, Yoon S, Park JI, Lee JE, Myung CH, Hwang JS. Skin barrier recovery by Protease-Activated Receptor-2 antagonist lobaric acid. *Biomol Ther (Seoul)* 2016; 24: 529–535. doi:10.4062/biomolther.2016.011
- [83] Kwon IS, Yim JH, Lee HK, Pyo S. Lobaric acid inhibits VCAM-1 expression in TNF- α -stimulated vascular smooth muscle cells via modulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Biomol Ther (Seoul)* 2016; 24: 25–32. doi:10.4062/biomolther.2015.084
- [84] Ingólfssdóttir K, Gissurarson SR, Müller-Jakic B, Breu W, Wagner H. Inhibitory effects of the lichen metabolite lobaric acid on arachidonate metabolism *in vitro*. *Phytomedicine* 1996; 2: 243–246. doi:10.1016/S0944-7113(96)80049-3
- [85] Ingólfssdóttir K, Chung GA, Skúlason VG, Gissurarson SR, Vilhelmsdóttir M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. *Eur J Pharm Sci* 1998; 6: 141–144. doi:10.1016/s0928-0987(97)00078-x

- [86] Vankadari N, Jeyasankar NN, Lopes WJ. Structure of the SARS-CoV-2 Nsp1/5'-untranslated region complex and implications for potential therapeutic targets, a vaccine, and virulence. *J Phys Chem Lett* 2020; 11: 9659–9668. doi:10.1021/acs.jpcclett.0c02818
- [87] Thadhani VM, Choudhary MI, Ali S, Omar I, Siddique H, Karunarath V. Antioxidant activity of some lichen metabolites. *Nat Prod Res* 2011; 25: 1827–1837. doi:10.1080/14786419.2010.529546
- [88] Gissurarson SR, Sigurdsson SB, Wagner H, Ingolfssdottir K. Effect of lobaric acid on cysteinyl-leukotriene formation and contractile activity of guinea pig *taenia coli*. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 770–773
- [89] Brandão LF, Alcantara GB, Matos Mde F, Bogo D, Freitas Ddos S, Oyama NM, Honda NK. Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2013; 61: 176–183. doi:10.1248/cpb.c12-00739
- [90] Ranković B, Kosanić M, Stanojković T, Vasiljević P, Manojlović N. Biological activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 14707–14722. doi:10.3390/ijms131114707
- [91] Ismed F, Dévéhat FL, Rouaud I, Ferron S, Bakhtiar A, Boustie J. NMR reassignment of stictic acid isolated from a Sumatran lichen *Stereocaulon montagneanum* (Stereocaulaceae) with superoxide anion scavenging activities. *Z Naturforsch C J Biosci* 2017; 72: 55–62. doi:10.1515/znc-2016-0148
- [92] Tay T, Türk AO, Yılmaz M, Türk H, Kivanç M. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Z Naturforsch C J Biosci* 2004; 59: 384–388. doi:10.1515/znc-2004-5-617
- [93] Honda NK, Pavan FR, Coelho RG, de Andrade Leite SR, Micheletti AC, Lopes TI, Misutsu MY, Beatriz A, Brum RL, Leite CQ. Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine* 2010; 17: 328–332. doi:10.1016/j.phymed.2009.07.018
- [94] Russo A, Piovano M, Lombardo L, Vanella L, Cardile V, Garbarino J. Pannarin inhibits cell growth and induces cell death in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Anticancer Drugs* 2006; 17: 1163–1169. doi:10.1097/01.cad.0000236310.66080.ed
- [95] Russo A, Piovano M, Lombardo L, Garbarino J, Cardile V. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sci* 2008; 83: 468–474. doi:10.1016/j.lfs.2008.07.012
- [96] Hidalgo ME, Fernández E, Quilhot W, Lissi EA. Photohemolytic activity of lichen metabolites. *J Photochem Photobiol B* 1993; 21: 37–40. doi:10.1016/1011-1344(93)80161-2
- [97] Celenza G, Segatore B, Setacci D, Bellio P, Bristelli F, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Perilli M, Amicosante G. *In vitro* antimicrobial activity of pannarin alone and in combination with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Phytomedicine* 2012; 19: 596–602. doi:10.1016/j.phymed.2012.02.010
- [98] Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Inchausti A, Yaluff G, Quilhot W, Fernandez E, Hidalgo ME. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1997; 116: 51–54. doi:10.1016/s0742-8413(96)00127-2
- [99] Fernández E, Reyes A, Hidalgo ME, Quilhot W. Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein. *J Photochem Photobiol B* 1998; 42: 195–201. doi:10.1016/s1011-1344(98)00070-0
- [100] Cardile V, Graziano ACE, Avola R, Piovano M, Russo A. Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. *Chem Biol Interact* 2017; 263: 36–45. doi:10.1016/j.cbi.2016.12.007
- [101] Kosanić M, Manojlović N, Janković S, Stanojković T, Ranković B. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuracea* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Chem Toxicol* 2013; 53: 112–118. doi:10.1016/j.fct.2012.11.034
- [102] Studzińska-Sroka E, Piotrowska H, Kucińska M, Murias M, Bylka W. Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from *Hypogymnia physodes* against breast cancer cell lines. *Pharm Biol* 2016; 54: 2480–2485. doi:10.3109/13880209.2016.1160936
- [103] Emsen B, Aslan A, Togar B, Turkez H. *In vitro* antitumor activities of the lichen compounds olivetoric, physodic and psoromic acid in rat neuron and glioblastoma cells. *Pharm Biol* 2016; 54: 1748–1762. doi:10.3109/13880209.2015.1126620
- [104] Stojanović IZ, Stanković M, Jovanović O, Petrović G, Smelcerović A, Stojanović GS. Effect of *Hypogymnia physodes* extracts and their depsidones on micronucleus distribution in human lymphocytes. *Nat Prod Commun* 2013; 8: 109–112
- [105] Stojanović IZ, Najman S, Jovanović O, Petrović G, Najdanović J, Vasiljević P, Smelcerović A. Effects of depsidones from *Hypogymnia physodes* on HeLa cell viability and growth. *Folia Biol (Praha)* 2014; 60: 89–94
- [106] Talapatra SK, Rath O, Clayton E, Tomasi S, Kozielski F. Depsidones from lichens as natural product inhibitors of M-Phase Phosphoprotein 1, a human kinesin required for cytokinesis. *J Nat Prod* 2016; 79: 1576–1585. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00962
- [107] Bauer J, Waltenberger B, Noha SM, Schuster D, Rollinger JM, Boustie J, Chollet M, Stuppner H, Wenz O. Discovery of depsides and depsidones from lichen as potent inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 using pharmacophore models. *ChemMedChem* 2012; 7: 2077–2081. doi:10.1002/cmdc.201200345
- [108] Emsen B, Turkez H, Togar B, Aslan A. Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of olivetoric and physodic acid in cultured human amnion fibroblasts. *Hum Exp Toxicol* 2017; 36: 376–385. doi:10.1177/0960327116650012
- [109] Emsen B, Togar B, Turkez H, Aslan A. Effects of two lichen acids isolated from *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf in cultured human lymphocytes. *Z Naturforsch C J Biosci* 2018; 73: 303–312. doi:10.1515/znc-2017-0209
- [110] Reddy RG, Veeraval L, Maitra S, Chollet-Krugler M, Tomasi S, Dévéhat FL, Boustie J, Chakravarty S. Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics. *Phytomedicine* 2016; 23: 1527–1534. doi:10.1016/j.phymed.2016.08.010
- [111] Osawa T, Kumon H, Reece CA, Shibamoto T. Inhibitory effect of lichen constituents on mutagenicity induced by heterocyclic amines. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18: 35–40. doi:10.1002/em.2850180107
- [112] Nishanth KS, Sreerag RS, Deepa I, Mohandas C, Nambisan B. Protocetraric acid: an excellent broad spectrum compound from the lichen *Usnea albopunctata* against medically important microbes. *Nat Prod Res* 2015; 29: 574–577. doi:10.1080/14786419.2014.953500
- [113] Dieu A, Mambu L, Champavier Y, Chaleix V, Sol V, Gloaguen V, Millot M. Antibacterial activity of the lichens *Usnea Florida* and *Flavoparmelia caperata* (Parmeliaceae). *Nat Prod Res* 2020; 34: 3358–3362. doi:10.1080/14786419.2018.1561678
- [114] Deraeve C, Guo Z, Bon RS, Blankenfeldt W, DiLucrezia R, Wolf A, Menninger S, Stigter EA, Wetzel S, Choidas A, Alexandrov K, Waldmann H, Goody RS, Wu YW. Psoromic acid is a selective and covalent Rab-prenylation inhibitor targeting autoinhibited RabGGTase. *J Am Chem Soc* 2012; 134: 7384–7391. doi:10.1021/ja211305j
- [115] Samatov TR, Wolf A, Odenwälder P, Bessonov S, Deraeve C, Bon RS, Waldmann H, Lührmann R. Psoromic acid derivatives: a new family of small-molecule pre-mRNA splicing inhibitors discovered by a stage-specific high-throughput *in vitro* splicing assay. *Chembiochem* 2012; 13: 640–644. doi:10.1002/cbic.201100790
- [116] Hassan STS, Šudomová M, Berchová-Bímová K, Šmejkal K, Echeverría J. Psoromic acid, a lichen-derived molecule, inhibits the replication of HSV-1 and HSV-2, and inactivates HSV-1 DNA polymerase: shedding light on antiherpetic properties. *Molecules* 2019; 24: 2912. doi:10.3390/molecules24162912

- [117] Sweidan A, Chollet-Krugler M, Sauvager A, van de Weghe P, Chokr A, Bonnaure-Mallet M, Tomasi S, Bousarghin L. Antibacterial activities of natural lichen compounds against *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis*. *Fitoterapia* 2017; 121: 164–169. doi:10.1016/j.fitote.2017.07.011
- [118] Hassan STS, Šudomová M, Berchová-Bímová K, Gowrishankar S, Rengasamy KRR. Antimycobacterial, enzyme inhibition, and molecular interaction studies of psoromic acid in *Mycobacterium tuberculosis*: efficacy and safety investigations. *J Clin Med* 2018; 7: 226. doi:10.3390/jcm7080226
- [119] Lauinger IL, Vivas L, Perozzo R, Stairiker C, Tarun A, Zloh M, Zhang X, Xu H, Tonge PJ, Franzblau SG, Pham DH, Esguerra CV, Crawford AD, Maes L, Tasdemir D. Potential of lichen secondary metabolites against *Plasmodium* liver stage parasites with FAS-II as the potential target. *J Nat Prod* 2013; 76: 1064–1070. doi:10.1021/np400083k
- [120] Behera BC, Mahadik N, Morey M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. *Pharm Biol* 2012; 50: 968–979. doi:10.3109/13880209.2012.654396
- [121] Candan M, Yilmaz M, Tay T, Erdem M, Türk AO. Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Parmelia sulcata* and its salazinic acid constituent. *Z Naturforsch C J Biosci* 2007; 62: 619–621. doi:10.1515/znc-2007-7-827
- [122] Goel M, Dureja P, Rani A, Uniyal PL, Laatsch H. Isolation, characterization and antifungal activity of major constituents of the Himalayan lichen *Parmelia reticulata* Tayl. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 2299–2307. doi:10.1021/jf1049613
- [123] Gaikwad S, Verma N, Sharma BO, Behera BC. Growth promoting effects of some lichen metabolites on probiotic bacteria. *J Food Sci Technol* 2014; 51: 2624–2631. doi:10.1007/s13197-012-0785-x
- [124] de Paz GA, Raggio J, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, González-Burgos E, Carretero ME, Crespo A. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53: 165–171. doi:10.1016/j.jpba.2010.04.013
- [125] Burlando B, Ranzato E, Volante A, Appendino G, Pollastro F, Verotta L. Antiproliferative effects on tumor cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Med* 2009; 75: 607–613. doi:10.1055/s-0029-1185329
- [126] Papadopoulou P, Tzakou O, Vagias C, Kefalas P, Roussis V. Beta-orcinol metabolites from the lichen *Hypotrachyna revoluta*. *Molecules* 2007; 12: 997–1005. doi:10.3390/12050997
- [127] Wassman CD, Baronio R, Demir Ö, Wallentine BD, Chen CK, Hall LV, Salehi F, Lin DW, Chung BP, Hatfield GW, Richard Chamberlin A, Luecke H, Lathrop RH, Kaiser P, Amaro RE. Computational identification of a transiently open L1/S3 pocket for reactivation of mutant p53. *Nat Commun* 2013; 4: 1407. doi:10.1038/ncomms2361
- [128] Omar SI, Tuszynski J. Ranking the binding energies of p53 mutant activators and their ADMET properties. *Chem Biol Drug Des* 2015; 86: 163–172. doi:10.1111/cbdd.12480
- [129] Russo A, Caggia S, Piovano M, Garbarino J, Cardile V. Effect of vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: role of Hsp70 protein. *Chem Biol Interact* 2012; 195: 1–10. doi:10.1016/j.cbi.2011.10.005
- [130] Sanjaya A, Avidlyandi A, Adfa M, Ninomiya M, Koketsu M. A new depsidone from *Teloschistes flavicans* and the antileukemic activity. *J Oleo Sci* 2020; 69: 1591–1595. doi:10.5650/jos.ess20209
- [131] Bay MV, Nam PC, Quang DT, Mechler A, Hien NK, Hoa NT, Vo QV. Theoretical study on the antioxidant activity of natural depsidones. *ACS Omega* 2020; 5: 7895–7902. doi:10.1021/acsomega.9b04179
- [132] Leal A, Rojas JL, Valencia-Islas NA, Castellanos L. New β -orcinol depsides from *Hypotrachyna caraccensis*, a lichen from the páramo ecosystem and their free radical scavenging activity. *Nat Prod Res* 2018; 32: 1375–1382. doi:10.1080/14786419.2017.1346639
- [133] Bui VM, Duong TH, Chavasiri W, Nguyen KP, Huynh BL. A new depsidone from the lichen *Usnea ceratina*. *Nat Prod Res* 2020. doi:10.1080/14786419.2020.1828405

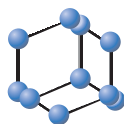
Dibenzofurans from lichens - a pharmacological overview

Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP.

Current Topics in Medicinal Chemistry. 2021 Jul

<https://doi.org/10.2174/1568026621666210728095214>

REVIEW ARTICLE

BENTHAM
SCIENCE

Dibenzofurans from Lichens – A Pharmacological Overview



Isabel Ureña-Vacas¹, Elena González Burgos¹, Pradeep Kumar Divakar¹ and Maria Pilar Gómez-Serranillos^{1,*}

¹Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE HISTORY

Received: May 07, 2021

Revised: July 01, 2021

Accepted: July 04, 2021

DOI:

10.2174/1568026621666210728095214



CrossMark

Abstract: Lichens are a symbiotic association between a fungus (mycobiont) and a green algae/cyanobacterium (photobiont). Lichens are a source of secondary metabolites, most of them being exclusively for these species, among which dibenzofurans are found. Dibenzofurans are a small group (over 35 different identified compounds), being usnic acid the most studied. In the last 10 years, there has been a growing interest in the pharmacological activity of dibenzofurans. In this work, dibenzofurans isolated from lichens (alectosarmentin, condidymic acid, didymic acid, isousnic acid, isostrepsilic acid, usimines A-C and usnic acid) were reviewed, most of which showed antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities. These findings provide future guidance for research on pharmacological activity of dibenzofurans.

Keywords: Dibenzofurans, Lichens, Pharmacology, Activities, Secondary metabolites, Orsellinic acid.

1. INTRODUCTION

Lichens are the most successful symbiotic association in nature [1]. Lichens are formed by a mycobiont (fungus) and a photobiont (green alga or cyanobacterium). These organisms produce a diversity of secondary metabolites, most of them being exclusive for these species. These compounds are grouped into depsides, depsidones, aliphatic acids, pulvinic acid derivatives, and dibenzofurans. These secondary metabolites are found on the surface of the cortical and medullary layer of lichen thallus, in their crystalline form [2]. Factors such as the environment, the climate, the ultraviolet radiation, and bacterial microbiomes could affect the production of these compounds [3].

Dibenzofurans are a small group among these secondary metabolites; over 32 different dibenzofurans have been identified in lichens [4]. These structures consist of two benzene rings fused to a central furan ring [2]. They are classified into monomeric dibenzofurans (majority in lichens) and dimeric dibenzofurans. Moreover, within this classification and according to the level of oxidation of the C ring, they are classified as fully aromatic, dihydrodibenzofurans (*i.e.*, usnic acid) and tetrahydrodibenzofurans. Dibenzofurans are synthesized via polyketide pathway. Like most of lichen secondary metabolites, these metabolites are biosynthesized via acetyl-polymalonate pathway [4].

The initial precursor is Acetyl-CoA, which after sequential condensations with malonyl-CoA forms the polyketide chain. This reaction is catalyzed by lichen PKS enzymes. PKS gene clusters are encoded in the genome of the fungal

partner [5, 6]. The cyclization process of polyketide chain results in the synthesis of the precursors: orsellinic acid and methylphloroacetophenone [7]. Orsellinic acid is cyclized by a non-enzymatic aldol condensation (C-2 to C-7). Methylphloroacetophenone is synthesized by an enzyme-catalyzed Claisen-type condensation (C-1 to C-6) (Figs. 1 and 2). There are dibenzofurans which are formed via C-C linkage of two methylphloroacetophenone, followed by cyclodehydration such as usnic acid (Fig. 2). On the other hand, fully aromatic dibenzofurans are synthesized using two orsellinic acid units. These structures are generated through enzymatic oxidative coupling via carbon-carbon bonding (Fig. 1B) or between carboxylic acid and hydroxyl groups (Fig. 1A-C), followed by a common set of reactions like dehydration and decarboxylation [2, 4, 7].

Most of biological/pharmacological studies on lichens have focused on extracts. Isolated compounds have been examined to a limited extent due to difficulties in extraction, identification and isolation processes, and to the reduced amount of metabolite production of these symbiotic organisms [8]. In the case of dibenzofurans, there are only activity studies for the isolated compounds alectosarmentin, condidymic acid, didymic acid, isousnic acid, isostrepsilic acid, usimines A-C and usnic acid (Fig. 3).

The compounds alectosarmentin, didymic acid, isousnic acid and, isostrepsilic acid are extracted using traditional methods such as maceration and Soxhlet extraction [9-11]. On the other hand, usnic acid studies incorporate non-conventional techniques such as supercritical CO₂ extraction [12] and sonication with acetone that appear to be more efficient in terms of purity, yield, and time [8, 13] (Table 1).

Maceration and Soxhlet extraction methods use mostly organic solvents to dissolve bioactive compounds. The elec-

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy University Complutense of Madrid, Madrid, Spain; Tel: +34 913942020; E-mail: pserra@ucm.es

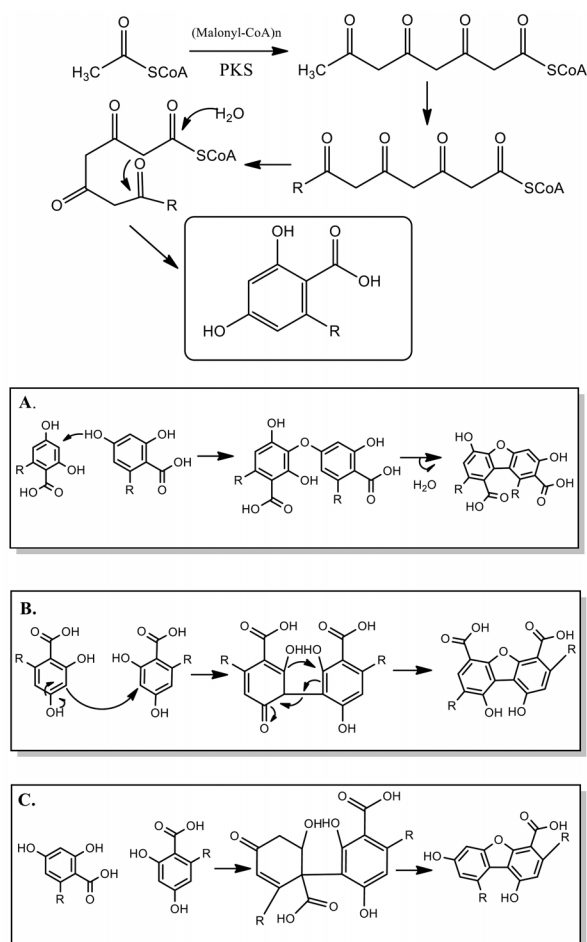


Fig. (1A-C). A schematic representation of the synthesis process of fully aromatic dibenzofurans.

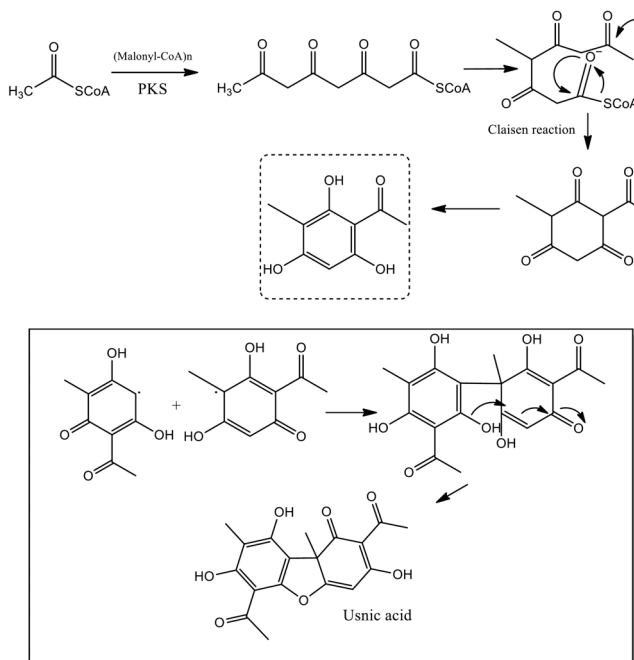


Fig. (2). A schematic representation of the synthesis process of usnic acid.

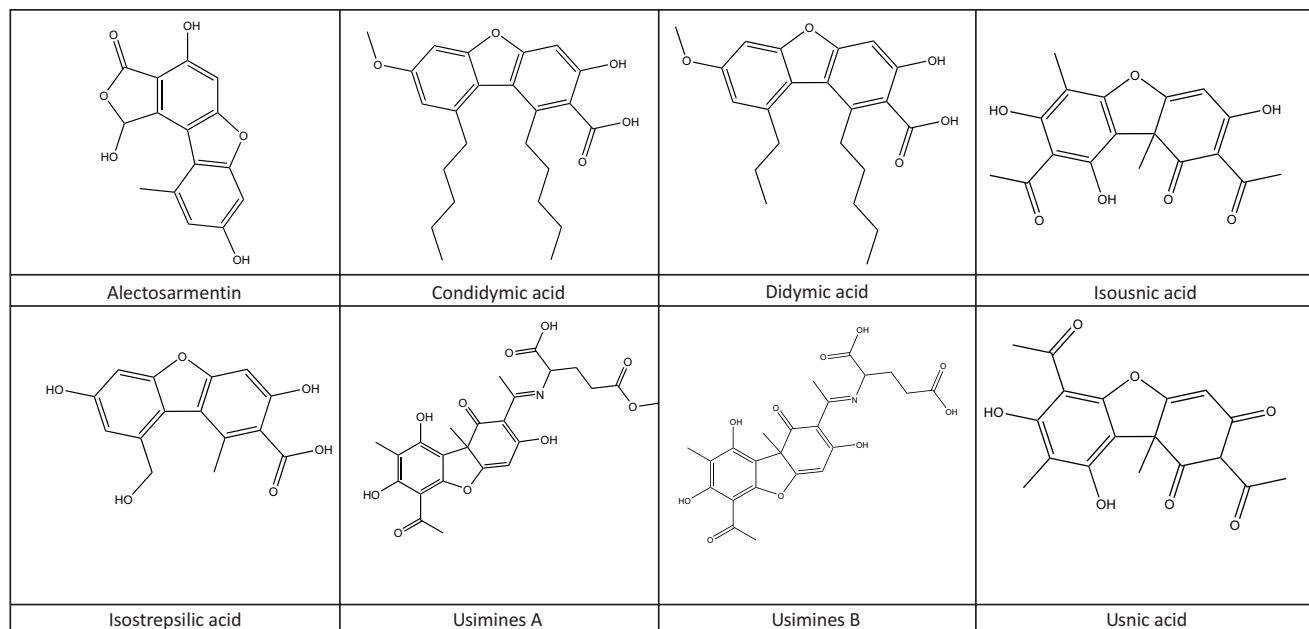


Fig. (3). Chemical structure of dibenzofurans from lichens with investigated pharmacological properties.

tion of the solvent and other conditions (*i.e.*, temperature) determines the yield and type of extracted compound. Acetone, ether, ethanol, methanol, and hexane are the most chosen solvents for dibenzofurans [10, 14-17]. Moreover, some works combine solvents with different polarities. This is the case of isousnic acid extraction from *Parmelia reticulata* Tayl. which used a Soxhlet apparatus with n-hexane followed by ethyl acetate and by methanol [9].

The separation, identification, and analysis methods for dibenzofurans are classified into two groups: chromatography techniques and spectroscopy methods. Chromatography techniques include column chromatography, thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). Column chromatography using silica gel columns was used for isolating alectosarmentin from *Alectoria sarmentosa* (Ach.) Ach.; isostrepsilic acid from *Usnea orientalis* Asah, and usnic acid from *Cladonia substellata* Vanio [18-20]. Thin-layer chromatography was the chosen method for condidymic and didymics acids identification from species of *Cladonia* genus. The TLC conditions were glass plates, toluene-acetic acid solvent system and UV-light for spot visualization [11]. Finally, HPLC is a reference technique for isolation and identification. Diverse columns (Reverse-phase Shim-pack, RP18 (150 x 4.6 mm; 5 μ m particle size), solvent system (methanol/phosphate buffer (70:30), water 0.1% orthophosphoric acid /acetonitrile), isocratic or gradient mode (linear/ stepwise) have been used for dibenzofurans analysis [12-15, 21].

Spectroscopy methods for analyzing dibenzofurans can be classified into Ultraviolet (UV) spectroscopy, Infrared

(IR) spectroscopy, Mass spectroscopy (MS) and Nuclear magnetic resonance (NMR). Infrared spectroscopy is less used. Isousnic acid from *Cladonia spp* and usnic acid from *Cladonia substellata* Vanio are identified using this method to complete information from other methods (UV-light and NMR) [19, 22].

These spectroscopic methods are usually coupled to HPLC analysis. The majority of HPLC instruments have a photodiode array detector [13, 15, 23]. Didymic acid from species of *Physcia* genus was analyzed by high-performance liquid-chromatography coupled to mass-spectrometry (HPLC-MS) [24].

The first known and isolated dibenzofuran compound was usnic acid in the mid-19th century. This compound is found exclusively in lichens and occurs in two enantiomers: (+)-usnic acid found in lichen genera such as *Usnea*, *Evernia*, *Lobaria*, *Nephroma* and *Ramalina* and (-)-usnic acid which has been reported in *Cladonia*, *Cetraria*, *Squamarina* and *Rhizoplaca* genera [4]. Other dibenzofurans identified in lichen species are shown in Table 1.

Lichens are of great interest to traditional medicine in many cultures. Among these lichens, there are species that contain dibenzofurans in their composition. Hence, *Alectoria sarmentosa* is used as antiasthmatic in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula) and applied as compress for open sores and arthritis in Oregon (USA). In the same region, Pallars, *Ramalina capitata* is used for asthma symptoms [25, 26]. *Usnea ceratina* has been traditionally employed for diseases associated with inflammation (*i.e.*, hepatitis), coughs, tuberculosis, and snakebites in China [1].

Table 1. Methods for dibenzofurans extraction, isolation, and characterization.

Compounds	Lichen Source	Extraction Method		Isolation-Identification-Characterization			References
		Type	Solvent-Conditions	Chromatography		Spectroscopy	
				Type	Conditions		
Alectosarmentin	<i>Alectoria sarmentosa</i> (Ach.) Ach.	Maceration	Cold Ethanol	Column Chromatography	Silica gel column	¹ H-NMR	[18]
Condidymic acid	<i>Cladonia incrassata</i> Florke.	Maceration	Acetone	Thin-layer chromatography High-performance liquid chromatography	Solvent: toluene-acetone-chloroform-methanol C18-silica gel MPLC Solvent: methanol-water	¹ H-NMR ¹³ C NMR	[16]
	<i>Cladonia squamosa</i> (Scop.) Hoffm.	Soxhlet	Ether	Thin-layer chromatography	Solvent: toluene-acetic acid (5%) UV-light	-	[17]
	<i>Cladonia didyma</i> (Fée) Vain. <i>Cladonia macilenta</i> Hoffm <i>Cladonia secundana</i> Nyl. <i>Cladonia subminiata</i> S. Stenroos	Maceration	Acetone	Thin-layer chromatography	Solvent C: toluene-acetic acid (200:30) UV-light	-	[11]
Didymic acid	<i>Cladonia didyma</i> (Fée) Vain. <i>Cladonia macilenta</i> Hoffm <i>Cladonia secundana</i> Nyl. <i>Cladonia subminiata</i> S. Stenroos	Maceration	Acetone	Thin-layer chromatography	Solvent C: toluene-acetic acid (200:30) UV-light	-	[11]
	<i>Cladonia incrassata</i> Florke.	Maceration	Acetone	Thin-layer chromatography High-performance liquid chromatography	Solvent: toluene-acetone-CHCl ₃ -H-COOH-MeOH C18-silica gel MPLC methanol-water	¹ H-NMR ¹³ C NMR	[16]
	Genus <i>Physcia</i> (von Schreber) Michaux	-	-	High-performance liquid chromatography	Water T3 column. Solvent 0.1% formic in water/0.1% formic in acetonitrile	HPLC-Mass spectroscopy	[24]
Didymic acid	<i>Cladonia leporina</i> Fr	-	-	High-performance liquid chromatography	-	UV-photodiode array detector	[23]
Isousnic acid	<i>Parmelia reticulata</i> Tayl	Soxhlet	Hexane followed by ethyl acetate and methanol.	Thin-layer chromatography	Solvent A: toluene-dioxane-acetic acid (180:45:5) Solvent B: hexane-methyl tertbutyl ether-formic acid (140:72:18) Solvent C: toluene-acetic acid (170:30) Spraying with 10% sulfuric acid	¹ H NMR ¹³ C NMR Mass spectroscopy	[9]
	<i>Cladonia spp</i>	Maceration	Ether	Thin-layer chromatography	Solvent: benzene- hexane (1:1)	UV spectrum NMR IR spectrum	[22]
Isostrepsilic acid	<i>Stereocaulon paschale</i> (L.) Hoffm	Maceration	Hexane Dichloromethane Methanol	Medium-pressure liquid chromatography (MPLC) Semipreparative HPLC High-performance liquid chromatography	Solvent: water 0.1% trifluoroacetic acid- methanol Linear gradient.	UV-photodiode array detector 1D and 2D NMR High-resolution mass spectrometry	[10]
	<i>Usnea orientalis</i> Asah.	Maceration	Cold acetone	Column chromatography Thin-layer chromatography High-performance liquid chromatography	Solvent: methanol- chloroform (15:35). 10% sulphuric acid and heated at 100 C for 10 min. Solvent: methanol-water- orthophosphoric acid (80:20:0.2).	UV-photodiode array detector	[20]
Usimines A-C	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	Maceration	Methanol	Column chromatography Semipreparative reversed phase HPLC	C18-functionalized silica gel flash Stepwise gradient methanol-water Stepwise gradient acetonitrile in water (0.1% formic acid)	¹ H NMR ¹³ C NMR Mass spectroscopy	[14]

(Table 1) contd....

Compound	Lichen Source	Extraction Method		Isolation-Identification-Characterization			References
		Type	Solvent-Conditions	Chromatography		Spectroscopy	
				Type	Conditions		
Usnic acid	<i>Cladonia substellata</i> Vanio	Soxhlet	Diethylether	Column chromatography Thin layer chromatography	Silica gel column Solvent chloroform-hexane (80:20)	¹ H NMR Infrared spectroscopy	[19]
	Genus <i>Usnea</i>	Sonication	Acetone	High-pressure liquid chromatography	RP18 column Solvent methanol phosphate buffer (70:30)	UV-photodiode array detector	[13]
	<i>Usnea barbata</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	Supercritical CO ₂	CO ₂	High-performance liquid chromatography	Solvents: water 0.1% orthophosphoric - acetone nitrile	-	[12]
	<i>Ramalina polymorpha</i> (Lilj.) Ach <i>Ramalina pollinaria</i> (Westr.) Ach <i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach. <i>Ramalina capitata</i> (Ach.) Nyl. <i>Ramalina fraxinea</i> (L.) Ach	Maceration	Acetone	High-performance liquid chromatography	Reverse-phase Shim-pack Solvent: methanol phosphate buffer (70:30)	UV- photodiode array detector	[15]
	<i>Cladonia uncialis</i> (L.) F. H. Wigg.	Maceration	Acetonitrile	High-performance liquid chromatography	C8 LC column Gradient elution Solvent: water 0.1% formic acid - acetonitrile 0.1% formic acid.	Mass spectroscopy	[21]

The traditional use of *Usnea barbata* was extensive in different cultures around the globe. In South Africa, decoction was used for indigestion, in Philippines for wounds and abdominal pain, in Malaysia, for cold, in Europe for internal bleeding, cough and growing hair. *Stereocaulon paschale* was used to control diabetes type 2 symptoms in the Cree community in Quebec, Canada. Moreover, in China, this lichen was used for spontaneous bleeding [26-28]. However, the pharmacological activity of dibenzofurans has hardly been investigated except for usnic acid. Particularly, the study of this pharmacological activity is limited to a total of eight dibenzofurans (without taking into account usnic acid) with most studies published in the last 10 years.

Other groups of lichen metabolites such as depsides and depsidones have shown diverse biological activities, from analgesic, antiulcer, antidiabetic, antioxidant, antimicrobial, to cytotoxic, larvicidal, neuroprotective, probiotic, wound healing, among others. *In vitro*, *in vivo* and *in silico* experiments have been carried out, gaining importance in recent years [29-38].

2. PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES

This review includes original papers in pharmacological activities of dibenzofurans isolated from lichens. The literature search was conducted using a combination of the following keywords “dibenzofurans”, “pharmacology”, “lichens”, and “individual names of dibenzofurans identified from lichens” in the databases PubMed, Scopus and Scholar google and Science Direct. Original papers written in Spanish, English and French were included in this work. No date restriction was applied except for usnic acid. The search years for this dibenzofuran were from 2010 to 2021. The excluded criteria were review articles, books and chapter of books, conference proceedings, editorial letters, and case reports. Moreover, those pharmacological studies involving combina-

tion of dibenzofurans and other compounds, galenic formulations of dibenzofurans, synthetic or semisynthetic derivatives of dibenzofurans and, dibenzofurans isolated from organisms other than lichens were excluded.

2.1. Cytotoxic and Antitumoral Activity

Studies on cytotoxic and antitumor activities in dibenzofurans focus on usnic acid. Different cell lines and *in vivo* models have been used to investigate the antitumor effects against lung, colorectal, ovarian, liver, kidney cancer, among others. The rest of dibenzofurans compounds, due to their availability, difficulties in isolation processes or lower abundance in lichen species, have not yet been studied for this activity.

Usnic acid has demonstrated cytotoxic properties against diverse cancer cell lines. Some of these studies focus solely on evaluating the effect of usnic acid on cancer cell viability without delving into the mechanism of action. This is the case of the works of Bačkorová *et al.*, 2011, Brisdelli *et al.*, 2013, Koparal *et al.*, 2006 and Prokopiev *et al.*, 2017 and Koparal *et al.*, 2015. These investigations demonstrated the effectiveness of usnic acid as a cytotoxic agent against numerous cell lines such as the human ovarian carcinoma A2780 cell line (IC₅₀ 72.7 μM), the human breast adenocarcinoma MCF-7 cell line (IC₅₀ 94.6 μM, 72h or 75.7 μM, 48h, depending on the study), the human colon adenocarcinoma HT-29 cell line (IC₅₀ 99.7 μM), the human promyelocytic leukaemia HL-60 cell line (IC₅₀ 48.5 μM) the Jurkat (IC₅₀ 76.3 μM) cell line, human T cells lymphocyte leukaemia, the human cervix adenocarcinoma HeLa cell line (IC₅₀ 23.7 μM), the human colon carcinoma HCT-116 cell line (IC₅₀ 17.7 μM), the mouse neuroblastoma NS20Y cells (IC₅₀ 52.18 μM), the hamster lung V79 cell line, the human liver carcinoma HepG2 cells (IC₅₀ 50.24 μM), the human umbili-

cal vein endothelial HUVEC cells (IC_{50} 71.5 μ M), and peripheral blood lymphocytes (0.04-0.30 mM) [39-43].

However, most studies have established possible mechanisms of action that explain the cytotoxic and antitumor action of usnic acid. Hence, both enantiomers of usnic acid inhibited the growth and proliferation of the breast cancer cell line T-47D (IC_{50} 4.2 μ g/mL and 4.0 μ g/mL for (+) and (-)-usnic acid), and the pancreatic cancer cell line Capan-2 (5.3 μ g/mL and 5.0 μ g/mL, respectively) by altering DNA synthesis, by arresting the cell cycle in S phase and causing mitochondrial membrane potential loss [44]. Moreover, *in vitro* and *in vivo* studies demonstrated that usnic acid inhibited tumor angiogenesis and growth of Bcap-37 breast cancer cells (10-50 μ M) and HUVEC cell line (1-50 μ M) in a dose-dependent manner, by blocking vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 2 mediated Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK1/2) and AKT/P70S6K signaling pathways. Also, usnic acid inhibits tumor growth and angiogenesis in a mouse xenograft tumor model, showed by tumor size reduction [45]. Furthermore, O'Neill *et al.*, 2010 concluded that the cytotoxic activity of usnic acid is not related to alterations in microtubules on breast cancer MCF7 cell line [46].

In vitro studies on human gastric carcinoma cell lines (BGC823 and SGC7901) revealed that usnic acid induced the inhibition of cell proliferation (IC_{50} 236.55 μ M and 618.82 μ M, respectively) by cell cycle arresting of G0/G1 phase and G2/M phase and by autophagic and apoptosis cell death [47]. Moreover, usnic acid showed cytotoxic activity against human gastric cells (viability reduction of 65%, and 35% on AGS cells and SNU-1 cells respectively, at 50 μ M) by producing ROS, causing DNA damage, and up regulating DNA-PKcs and γ -H2A.X phosphorylation [48]. Furthermore, usnic acid inhibited tumor size and weight in BGC823-bearing mice through apoptosis; its antitumoral activity was even better than that of the reference 5-fluorouracil treatment [47].

Uscopic acid was also a promising antitumor agent in lung squamous cell carcinoma (IC_{50} (H520) 32.51 μ M, IC_{50} (Calu-1) 34.25 μ M, 48h) which correlated with ROS accumulation and, consequently mitochondrial respiratory chain disruption and inhibition of Nrf2/PI3K/Akt pathway [49]. In another study, Singh *et al.* (2013) demonstrated that usnic acid was cytotoxic on the human lung carcinoma A549 cells (39-67% viability reduction at 25-100 μ M) by inducing cell cycle arrest at the G0/G1 phase and causing cell death *via* mitochondrial membrane depolarization [50]. Furthermore, O'Neill *et al.*, 2010 concluded that the cytotoxic activity of usnic acid is not related to alterations in microtubules on the lung cancer cell line H1299 [46]. Usnic acid also showed good chemotherapeutic properties in colorectal RKO cancer cells by upregulating ATM *via* miR-18a and inhibiting proliferation and migration [51]. Moreover, this compound induced mTOR inhibition, reduced ATP content and inhibited migration of human colorectal cancer c-KIT positive cells [52]. Furthermore, *in vivo* studies showed that usnic acid protected from 1,2-dimethylhydrazine-induced preneoplastic le-

sions in rat colon. This activity is related to its ability to interact with DNA topoisomerase II and its antioxidant properties [53].

Uscopic acid was also effective in hepatocellular carcinoma. This compound induced autophagy (formation of acidic vesicular organelles) and apoptosis (cell cycle arrest at G0/G1 and G2/M phases) in HEPG2 and SNU-449 hepatocellular carcinoma cell lines (viability reduction of 32.50% and 18.76% respectively with 25 mM) [54]. Moreover, usnic acid was cytotoxic for human hepatoblastoma HepG2 cells (IC_{50} 30.0 μ M) by altering the regulation of inflammation-related gene expression (genes CCL21 and CSF2), oxidative metabolic stress-related expression (genes CYP7A1 and CYP2E1), proliferation and carcinogenesis-related gene expression (gene CCNC) and metabolism-related gene expression (gene UGT1A4) [55]. Furthermore, usnic acid at doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg showed genotoxicity effect on liver and kidneys of mice associated with oxidative stress induction and not enantiomerically dependence [56].

Uscopic acid showed antigenotoxic effects in Chinese hamster ovary cells as evidenced in a reduction in chromosomal damage induced by etoposide, hydrogen peroxide, and doxorubicin [53]. Moreover, usnic acid resulted to be a potent antitumor agent against the human ovarian carcinoma A2780 cell line by causing mitochondrial membrane potential loss, phosphatidylserine externalization and inducing ROS and RNS overproduction [57].

Finally, usnic acid inhibited human prostate DU 145 and human melanoma HTB-140 cell proliferation by inducing cytoskeletal rearrangements and by interfering with the invasive potential [58]. Moreover, this compound showed cytotoxic activity against the human melanoma FemX cell line (IC_{50} value of 12.72 μ g/mL) and the human colon carcinoma LS174 cell line (IC_{50} value of 15.66 μ g/mL) by inducing apoptosis [59]. However, usnic acid was slightly cytotoxic against glioblastoma multiforme cells (IC_{50} value of 41.55 mg/L for U87MG cells) [60].

2.2. Antioxidant

Similar to cytotoxic and antitumoral activity research, only usnic acid has been studied for its antioxidant properties.

In silico studies demonstrated that usnic acid is a potent free radical scavenger in aqueous environments [61]. Moreover, this natural product had scavenging activities against diverse free-radical such as DPPH \cdot (IC_{50} 49 μ g/mL), DMPD \cdot^+ (IC_{50} 33 μ g/mL), O $_2^{\cdot-}$ (IC_{50} 18 μ g/mL), and ABTS $^{\cdot+}$ (IC_{50} 10 μ g/mL) [62]. Furthermore, usnic acid showed concentration dependent antioxidant activity from 0.005 to 0.2 mg/mL in free radical scavenging activity (FRSA) assay (4.85 to 51.2%), nitric oxide radical scavenging activity (NORSA) (23.5 to 53.2%) and inhibition of lipid peroxidation (24.4 to 46.6%) [63]. Additionally, *in vitro* studies revealed that usnic acid competitively inhibited glutathione reductase (Ki 0.21 mM) and glutathione S-transferase (Ki 0.012 mM) activities [64].

Usnic acid showed antioxidant properties in an UV-B-irradiation model in a human lymphocyte cell line (Jurkat-cells) at a concentration of 1×10^{-8} and 1×10^{-6} M and doses of UVB-light up to 0.1 J/cm². This study also demonstrated that when radiation doses increase and usnic acid concentration increases, this dibenzofuran acts as a pro-oxidant agent rather than an antioxidant agent [65].

Finally, usnic acid inhibited the oxidative action of hypochlorous acid on dimyristoylphosphatidylcholine (DM-PC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE) bilayers on human erythrocytes [66].

2.3. Antimicrobial

On the contrary, more dibenzofurans compounds have been investigated for antimicrobial activity beyond usnic acid. Aleptosarmentin, condidymic acid, didymic acid, isousnic acid, isostrepsilic acid and usimines A-C also showed antimicrobial effects.

In the case of usnic acid, this dibenzofuran has demonstrated antimicrobial properties against a spectrum of clinically relevant Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, fungal and viruses.

Usnic acid was effective as antibacterial agent against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (at 500 mg/ml and 1000 mg/ml; inhibition zone between 12 mm and 17 mm) and *Salmonella typhi* (at 1000 mg/ml; inhibition zone 14 mm) [67]. In another study, usnic acid showed antimicrobial activity against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. salmonicolor*, *B. subtilis*, *P. notatum* and *E. coli* with a diameter of inhibition zones from 12 to 40 mm. However, this natural compound was inactive against *C. albicans* Bayer-Ruck and *M. smegmatis* [68]. Moreover, usnic acid inhibited bacterial growth of *B. subtilis* and *S. aureus* with MIC values of 1.2 µg/mL and 5.6 µg/mL, respectively [69]. Furthermore, usnic acid was the most active antimicrobial agent compared to other lichen compounds against the bacteria *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, and *E. coli* with MIC values of 8, 8, 31, and 31 µg/ml, respectively [70]. Additionally, usnic acid showed strong antibacterial and antifungal activity from MIC value of 0.0008 mg/mL (against *B. mycoides* and *B. subtilis*) to MIC value of 1 mg/mL (against *P. purpureus* and *P. verrucosum*) [59]. Also, this compound inhibited the formation of several M serotypes of *Streptococcus pyogenes* (M56, st38 and M89) [71].

Considering antibacterial effects of other dibenzofurans, condidymic acid and didymic acid stand out. They showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, like usnic acid and superior to that of the reference compound Phenonip® (MIC value of 7.5 µg/ml) [16]. In another study, these compounds were active against the Gram-positive bacteria methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (inhibition zone of 28 mm and 17 mm for didymic acid and condidymic acid, respectively) and *Enterococcus faecium* (inhibition zone of 22 mm for both compounds) [72]. The usimines A, B and C, in this order, have also shown antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* (MIC values of 11,

12 and 26 µg/mL, respectively). However, these compounds were inactive against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* [69].

On the other hand, compounds like aleptosarmentin showed weak antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus* (25 µg/ml) and *Mycodaterium smegmatis* (25 µg/ml) and no activity against *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* [18]. Moreover, the dibenzofuran isostrepsilic acid did not exhibit antimicrobial activity either against the bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans* [10].

Usnic acid showed good antimycobacterial activity against both resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains (H37Rv with MIC value of 12.25 µg/mL; INHr with MIC value of 1.56 µg/mL; SMRr with MIC value of 6.25 µg/mL; RMPr and *M. kansasii* with MIC value of 12.5 µg/mL; *M. avium* with MIC value of 100 µg/mL; *M. fortuitum* with MIC value of 50 µg/mL and *M. chelonae* with MIC value of 25 µg/mL) [73]. In another study, usnic acid inhibited the growth of *M. tuberculosis* with a MIC value of 62.5 µg/mL at a concentration of 182 µM [74].

The mechanism of action of the antibacterial activity of usnic acid against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* is related to its ability to inhibit RNA synthesis and to affect DNA replication [75]. Moreover, usnic acid inhibited methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* growth by damaging peptidoglycan synthesis, impairing adhesion formation, reducing thermonuclease and lipase expression and disrupting cell membrane [76, 77]. Furthermore, usnic acid showed moderate antimicrobial activity (MIC value 18 µM) against *Mycobacterium abscessus* by acting as efflux pump inhibitor [78]. The differential pharmacological activity depends on enantiomers. The (+)-usnic acid has better antibacterial activity against anaerobic Gram-negative bacteria than (-)-usnic acid [79]. However, as a curiosity, viral activity is the opposite. The (-)-usnic acid has better antiviral activity than (+)-usnic acid [80]. Mechanism of action for other dibenzofurans has not been investigated.

Regarding its antifungal activity, usnic acid acted as anti-biofilm agent against azole-resistant and azole-sensitive *Candida albicans* (Biofilm inhibition of 71.08% and 87.84% at 4 µg/mL, respectively) by increasing reactive oxygen and nitrogen species level [81]. Moreover, usnic acid inhibited biofilm formation (65% of biofilm inhibition at 100 µg/ml) and morphological traits of *Candida albicans* as evidenced in a reduction of sugars from the exopolysaccharide layer, thickness of matured biofilms and fungal viability [82]. Isousnic acid (250 µg/ml) also showed antifungal effects against *Rhizoctonia bataticola*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium udum*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium debaryanum* and *Sclerotium rolfsii* with ED₅₀ of 62.3 to 70.98 µg/ml [9]. However, isostrepsilic acid did not show activity against the fungus *Candida albicans* [10].

Apart from the antibacterial and antifungal properties of dibenzofurans, usnic acid has been studied against other mi-

croorganisms like protozoans, viruses, or insects. Usnic acid, was effective as antileishmanial agent against *Leishmania major* (IC₅₀ 10 µg/ml), *Leishmania infantum* (IC₅₀ 13 µg/ml), and *Leishmania tropica* (IC₅₀ 21 µg/ml) through apoptotic pathway [83]. Moreover, this compound showed antileishmanial activity against promastigote forms of *Leishmania infantum* (IC₅₀ 18.3 µg/mL), as evidenced in structural changes (loss of cell polarity, membrane blebbing and cytoplasmic vacuolization) [84]. Furthermore, usnic acid was active against liver stage parasites of *Plasmodium berghei* with an IC₅₀ value of 2.3 µM [85].

Usnic acid has also molluscicidal activity against the aquatic snail *Biomphalaria glabrata*. This compound caused 100% mortality at a concentration of 4 µg/mL in the first 24 h [19]. Finally, usnic acid caused larvicidal activity against the second and third instar larvae of the mosquito *Culiseta longiareolata* with LC50 and LC90 values of 0.48 ppm and 1.54 ppm, respectively [86].

2.4. Other Activities

The study of other activities on dibenzofurans is scarce. Usimine C (90 µg/ml, 48 h), unlike the usimines A and B, significantly activated 1.6-fold proliferation of human dermal fibroblast CCD-986SK cell line through type I procollagen induction activity [29]. However, the majority of the work focused, as previously described, on usnic acid activities.

Usnic acid showed neuroprotective properties. Hence, usnic acid potently inhibited acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) with IC₅₀ values of 1.273 nM and 0.239 nM, respectively [62]. In another study, pretreatments with usnic acid at 5 and 10 µg/ml concentrations increased cell viability and reduced intracellular reactive oxygen species production in a hydrogen peroxide-induced oxidative stress model in human glioblastoma astrocytoma U373MG cells [87]. Moreover, usnic acid showed anti-inflammatory properties in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. Pretreatments with usnic acid (5 and 25 mg/kg for 10 days) prevented neuronal loss, motor dysfunction and glial activation by blocking NF-κB pathway [88]. Furthermore, usnic acid resulted to be also effective to restore cognitive deficits in a Aβ1-42 peptide mice model. This natural product reduced inflammation (low levels of IL-1β), oxidative stress (low content of hydroperoxides) and improved memory and learning [89]. Also, this dibenzofuran was effective in a cerebral ischemia/reperfusion rat model. The intraperitoneal administration of 25 mg/kg of usnic acid improved memory impairment, attenuated inflammation, up-regulated antioxidant defense system and reduced apoptosis [90].

Usnic acid is demonstrated to be an agent for the treatment of osteoporosis. This compound could exert anti-osteoclastogenic activity by inhibiting RANKL-mediated osteoclast formation and function *via* ERK-NFATc1 signaling. Moreover, *in vivo* studies revealed that usnic acid prevented LPS-induced bone loss in mice [91].

The effectiveness of usnic acid in a hypertrophic ear scar formation in a rabbit mode has also been evidenced in a reduction of scar elevation index and in an improvement of collagen tissue accumulation. This activity is related to its ability to suppress scar angiogenesis [92].

Usnic acid also exerted a protective effect on acute lung injury. This compound inhibited inflammatory response by reducing macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), chemokines interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) expression. Moreover, this compound reduced oxidative stress level by increasing the activity of the enzyme superoxide dismutase and the content of GSH and by reducing lipid peroxidation [93].

Usnic acid has also a cardioprotective role by reducing endoplasmic reticulum stress activation and pro-inflammatory cytokines expression (IL-1β and TNF-α) through AMPK signaling pathway in rat cardiomyocytes [94].

CONCLUSION AND FUTURE PROSPECTS

Lichens produce a variety of secondary metabolites with interesting pharmacological properties. One of the least numerous groups are the dibenzofurans. There have been identified over 32 dibenzofuran-like compounds in lichens. However, the knowledge of its biological activity is very recent and scarce except for usnic acid. Usnic acid has been extensively investigated because it is commercially available. Of the total dibenzofurans identified in lichens, only 9 (including usnic acid) have been investigated for their potential therapeutic properties. Furthermore, these works have been mainly carried out in the last 10 years.

Antimicrobial activity is the most studied for dibenzofurans. However, antimicrobial potency differs among these compounds being active condidymic acid and didymic acid against *S. aureus* and *E. faecium*, the usimines A, B and C against *B. subtilis*, isousnic acid against different fungal species and, usnic acid against diversity of bacterial and fungal. On the contrary, the dibenzofurans alectosarmentin and isostrepsilic acid were weak or inactive antibacterial and antifungal agents. Small structural differences such as the presence of lactone rings (*i.e.*, alectosarmentin) or the presence of nitrogen-bearing side chains (*i.e.*, usimines A-C) explain the differences in effectiveness as antimicrobial agents. Moreover, usnic acid has shown other promising activities, such as cytotoxic and antitumoral, antioxidant and anti-inflammatory. Most of these studies are *in vitro* and very few *in vivo* studies.

Future research should be aimed at 1) Studying activities other than antimicrobial activity. 2) Conduct further *in vivo* studies for the most promising compounds and activities. 3) Evaluate the pharmacological activity of those dibenzofurans identified in lichens but not investigated (*i.e.*, porphyrilic acid, pannaric acid, strepsilin, schizopeltic acid, placodiolic acid).

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

This study was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (PID2019-105312G-B-100) and the Santander-University Complutense of Madrid (PR87/19-22637). I. Ureña-Vacas is supported by a grant CT42/18-CT43/18 from Complutense University of Madrid for Predoctoral research.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- [1] Prateeksha, ; Paliya, B.S.; Bajpai, R.; Jadaun, V.; Goga, M.; Kumar, J.; Kumar, S.; Upreti, D.K.; Singh, B.R.; Nayaka, S.; Joshi, Y.; Singh, B.N. The genus *Usnea*: a potent phytomedicine with multifarious ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *RSC Advances*, **2016**, *6*(26), 21672-21696. <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA24205C>
- [2] Goga, M.; Elečko, J.; Marcinčinová, M.; Ručová, D.; Bačkorová, M.; Backor, M. Lichen Metabolites: An Overview of some secondary metabolites and their biological potential. Co-Evolution of Secondary Metabolite. In: *Springer Nature*; Switzerland, **2018**.
- [3] Gheza, G.; Di Nuzzo, L.; Vallese, C.; Barcella, M.; Benesperi, R.; Giordani, P.; Nascimbene, J.; Assini, S. Morphological and chemical traits of *Cladonia* respond to multiple environmental factors in acidic dry grasslands. *Microorganisms*, **2021**, *9*(2), 9. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9020453> PMID: 33671558
- [4] Millot, M.; Dieu, A.; Tomasi, S. Dibenzofurans and derivatives from lichens and ascomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, **2016**, *33*(6), 801-811. <http://dx.doi.org/10.1039/C5NP00134J> PMID: 26867808
- [5] Stocker-Wörgötter, E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, *25*(1), 188-200. <http://dx.doi.org/10.1039/B606983P> PMID: 18250902
- [6] Kim, J.A.; Hong, S.G.; Cheong, Y.H.; Koh, Y.J.; Hur, J.S. A new reducing polyketide synthase gene from the lichen-forming fungus *Cladonia metacorrallifera*. *Mycologia*, **2012**, *104*(2), 362-370. <http://dx.doi.org/10.3852/11-001> PMID: 22223171
- [7] Calcott, M.J.; Ackerley, D.F.; Knight, A.; Keyzers, R.A.; Owen, J.G. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*(5), 1730-1760. <http://dx.doi.org/10.1039/C7CS00431A> PMID: 29094129
- [8] Mohammadi, M.; Zambare, V.; Malek, L.; Gottardo, C.; Suntutres, Z.; Christopher, L. Lichenochemicals: extraction, purification, characterization, and application as potential anticancer agents. *Expert Opin. Drug Discov.*, **2020**, *15*(5), 575-601. <http://dx.doi.org/10.1080/17460441.2020.1730325> PMID: 32154739
- [9] Goel, M.; Dureja, P.; Rani, A.; Uniyal, P.L.; Laatsch, H. Isolation, characterization and antifungal activity of major constituents of the Himalayan lichen *Parmelia reticulata* Tayl. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, *59*(6), 2299-2307. <http://dx.doi.org/10.1021/jf1049613> PMID: 21351753
- [10] Carpentier, C.; Queiroz, E.F.; Marcourt, L.; Wolfender, J-L.; Azelmat, J.; Grenier, D.; Boudreau, S.; Voyer, N. Dibenzofurans and Pseudodepsidones from the Lichen *Stereocaulon paschale* Collected in Northern Quebec. *J. Nat. Prod.*, **2017**, *80*(1), 210-214. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00831> PMID: 28079378
- [11] Fraga Júnior, C.A.V.; Gumboski, E.L.; Eliasaro, S. The genus *Cladonia* (*Lichenizaed Ascomycota*) from restinga vegetation of espiro to santo state, Brazil: Supergroups *Cladonia* and *Cocciferæ*. *Rodriguésia*, **2017**, *68*, 1951-1962. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201768526>
- [12] Zugic, A.; Jeremic, I.; Isakovic, A.; Arsic, I.; Savic, S.; Tadic, V. Evaluation of anticancer and antioxidant activity of a commercially available CO2 supercritical extract of old man's beard (*Usnea barbata*). *PLoS One*, **2016**, *11*(1), e0146342. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146342> PMID: 26745885
- [13] Ji, X.; Khan, I.A. Quantitative determination of usnic acid in *Usnea* lichen and its products by reversed-phase liquid chromatography with photodiode array detector. *J. AOAC Int.*, **2005**, *88*(5), 1265-1268. <http://dx.doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1265> PMID: 16385974
- [14] Seo, C.; Sohn, J.H.; Park, S.M.; Yim, J.H.; Lee, H.K.; Oh, H.; Usimines, A-C. Usimines A-C, bioactive usnic acid derivatives from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*(4), 710-712. <http://dx.doi.org/10.1021/np070464b> PMID: 18288807
- [15] Cansaran-Duman, D.; Atakol, O.; Halıcı, M.; Aksoy, A. HPLC analysis of usnic acid in some *Ramalina*. species from anatolia and investigation of their antimicrobial activities. *Pharm. Biol.*, **2008**, *45*, 77-81. <http://dx.doi.org/10.1080/13880200601028503>
- [16] Dieu, A.; Millot, M.; Champavier, Y.; Mambu, L.; Chaleix, V.; Sol, V.; Gloaguen, V. Uncommon chlorinated xanthone and other antibacterial compounds from the lichen *Cladonia incrassata*. *Planta Med.*, **2014**, *80*(11), 931-935. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1382827> PMID: 25029172
- [17] Chester, D.O.; Elix, J.A. Condidid acid, a new dibenzofuran from the lichen *Cladonia squamosula*. *Aust. J. Chem.*, **1981**, *34*(7), 1501-1506. <http://dx.doi.org/10.1071/CH9811501>
- [18] Gollapudi, S.R.; Telikepalli, H.; Jampani, H.B.; Mirhom, Y.W.; Drake, S.D.; Bhattiprolu, K.R.; Vander Velde, D.; Mitscher, L.A. Alectosarmentin, a new antimicrobial dibenzofuranoid lactol from the lichen, *Alectoria sarmentosa*. *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*(7), 934-938. <http://dx.doi.org/10.1021/np50109a009> PMID: 7964789
- [19] Araújo, H.D.A.; Silva, L.R.S.; Siqueira, W.N.; Fonseca, C.S.M.; Silva, N.H.; Melo, A.M.M.A.; Martins, M.C.B.; Lima, V.L.M. Toxicity of Usnic Acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. *Acta Trop.*, **2018**, *179*, 39-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.007> PMID: 29183853
- [20] Kon, Y.; Iwashina, T.; Kashiwadani, H.; Wardlaw, J.D.; Elix, J.A. A new dibenzofuran, isostrepsilic acid, produced by cultured mycobiont of the lichenized ascomycete *Usnea orientalis*. *Shokubutsu Kenkyu Zasshi*, **1997**, pp. 67-71.
- [21] Sveshnikova, N.; Yuan, T.; Warren, J.M.; Piercey-Normore, M.D. Development and validation of a reliable LC-MS/MS method for quantitative analysis of usnic acid in *Cladonia uncialis*. *BMC Res. Notes*, **2019**, *12*(1), 550. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-019-4580-x> PMID: 31470895
- [22] Shibata, S.; Taguchi, H. Occurrence of isousnic acid in lichens with reference to "isodihydrousnic acid" derived from dihydrousnic acid. *Tetrahedron Lett.*, **1967**, *8*(48), 4867-4871. [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)89620-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(01)89620-9)
- [23] Stocker-Wörgötter, E.; Cordeiro, L.M.C.; Iacomini, M. Accumulation of potential pharmaceutically relevant lichen metabolites in lichens and cultured lichen symbiots. In: *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta, ur. R., Ed.; Elsevier, **2013**; 39, pp. 337-380.
- [24] Anderson, T.J.; Wagner, D.L.; Cooper, B.R.; McCarty, M.E.; Zaspel, J.M. HPLC-MS analysis of lichen-derived metabolites in the life stages of *Crambidia cephalica* (Grote & Robinson). *J. Chem. Ecol.*, **2017**, *43*(1), 66-74. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-016-0799-3> PMID: 27966190
- [25] Agelet, A.; Vallès, J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part III. Medicinal uses of non-vascular plants. *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, *84*(2-3), 229-234. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00320-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00320-3) PMID: 12648819

- [26] Crawford, S. Lichens Used in Traditional Medicine. In: Ranković B. (eds) *Lichen Secondary Metabolites*. Springer, Cham, **2015**. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-13374-4_2
- [27] Afolayan, ; Grierson, D.S.; Kambizi, L.; Madamombe-Manduna, I.; Masika, P.J. *In vitro* Antifungal activity of some South African medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.*, **2002**, *68*, 72-76. [http://dx.doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30444-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30444-0)
- [28] Fraser, M.-H.; Cuerrier, A.; Haddad, P.S.; Arnason, J.T.; Owen, P.L.; Johns, T. Medicinal plants of Cree communities (Québec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **2007**, *85*(11), 1200-1214. <http://dx.doi.org/10.1139/Y07-108> PMID: 18066122
- [29] Joo, Y.A.; Chung, H.; Yoon, S.; Park, J.I.; Lee, J.E.; Myung, C.H.; Hwang, J.S. Skin barrier recovery by protease-activated receptor-2 antagonist lobaric acid. *Biomol. Ther. (Seoul)*, **2016**, *24*(5), 529-535. <http://dx.doi.org/10.4062/biomolther.2016.011> PMID: 27169822
- [30] Gissurarson, S.R.; Sigurdsson, S.B.; Wagner, H.; Ingólfssdóttir, K. Effect of lobaric acid on cysteinyl-leukotriene formation and contractile activity of guinea pig *Taenia coli*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, *280*(2), 770-773. PMID: 9023290
- [31] Reddy, R.G.; Veeraval, L.L.; Maitra, S.; Chollet-Krugler, M.; Tomasi, S.; Dévéhat, F.L.; Boustie, J.; Chakravarty, S. Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics. *Phytomedicine*, **2016**, *23*(12), 1527-1534. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2016.08.010> PMID: 27765373
- [32] Burlando, B.; Ranzato, E.; Volante, A.; Appendino, G.; Pollastro, F.; Verotta, L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Med.*, **2009**, *75*(6), 607-613. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1185329> PMID: 19199230
- [33] Gaikwad, S.; Verma, N.; Sharma, B.O.; Behera, B.C. Growth promoting effects of some lichen metabolites on probiotic bacteria. *J. Food Sci. Technol.*, **2014**, *51*(10), 2624-2631. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-012-0785-x> PMID: 25328204
- [34] Ureña-Vacas, I.; González-Burgos, E.; Divakar, P.K.; Gómez-Serranillos, M.P. Lichen depsidones with biological interest. *Planta Med.*, **2021**. PMID: 34034351
- [35] Zofou, D.; Kengne, A.B.; Tene, M.; Ngemenya, M.N.; Tane, P.; Titanji, V.P. *In Vitro* antiparasitoid activity and cytotoxicity of crude extracts and compounds from the stem bark of *Kigelia africana* (Lam.) Benth (Bignoniaceae). *Parasitol. Res.*, **2011**, *108*(6), 1383-1390. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2363-y> PMID: 21487780
- [36] Siqueira, R.S.; Bonjardim, L.R.; Araújo, A.A.; Araújo, B.E.; Melo, M.G.; Oliveira, M.G.; Gelain, D.P.; Silva, F.A.; DeSantana, J.M.; Albuquerque-Júnior, R.L.; Rocha, R.F.; Moreira, J.C.; Antoniolli, A.R.; Quintans-Júnior, L.J. Antinociceptive activity of atranorin in mice orofacial nociception tests. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.*, **2010**, *65*(9-10), 551-561. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2010-9-1004> PMID: 21138055
- [37] Bayir, Y.; Odabasoglu, F.; Cakir, A.; Aslan, A.; Suleyman, H.; Halici, M.; Kazaz, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, **2006**, *13*(8), 584-590. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2005.07.002> PMID: 16920514
- [38] Seo, C.; Sohn, J.H.; Ahn, J.S.; Yim, J.H.; Lee, H.K.; Oh, H. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory effects of depsidone and pseudodepsidone metabolites from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*(10), 2801-2803. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.108> PMID: 19362837
- [39] Koparal, A.T.; Tüylü, B.A.; Türk, H. *In vitro* cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. *Nat. Prod. Res.*, **2006**, *20*(14), 1300-1307. <http://dx.doi.org/10.1080/14786410601101910> PMID: 17393655
- [40] Prokopiev, I.A.; Filippov, E.V.; Filippova, G.V.; Gladkina, N.P. Genotoxic effect of Usnic acid enantiomers *In vitro* in human peripheral blood lymphocytes. *Tsitologiya*, **2017**, *59*(1), 13-18. PMID: 30188098
- [41] Bačkorová, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Jendželovský, R.; Fedoročko, P. Variable responses of 14 different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol. In Vitro*, **2011**, *25*(1), 37-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.004> PMID: 20837130
- [42] Brisdeli, F.; Perilli, M.; Sellitri, D.; Piovano, M.; Garbarino, J.A.; Nicoletti, M.; Bozzi, A.; Amicosante, G.; Celenza, G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. *Phytother. Res.*, **2013**, *27*(3), 431-437. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4739> PMID: 22628260
- [43] Koparal, A.T. Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances (-)-usnic acid and vulpinic acid. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.*, **2015**, *70*(5-6), 159-164. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2014-4178> PMID: 26136299
- [44] Einarsdóttir, E.; Groeneweg, J.; Björnsdóttir, G.G.; Harethardóttir, G.; Omarsdóttir, S.; Ingólfssdóttir, K.; Ogmundsdóttir, H.M. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med.*, **2010**, *76*(10), 969-974. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1240851> PMID: 20143294
- [45] Song, Y.; Dai, F.; Zhai, D.; Dong, Y.; Zhang, J.; Lu, B.; Luo, J.; Liu, M.; Yi, Z. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis*, **2012**, *15*(3), 421-432. <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-012-9270-4> PMID: 22669534
- [46] O'Neill, M.A.; Mayer, M.; Murray, K.E.; Rolim-Santos, H.M.; Santos-Magalhães, N.S.; Thompson, A.M.; Appleyard, V.C. Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells? *Braz. J. Biol.*, **2010**, *70*(3), 659-664. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842010005000013> PMID: 20379653
- [47] Geng, X.; Zhang, X.; Zhou, B.; Zhang, C.; Tu, J.; Chen, X.; Wang, J.; Gao, H.; Qin, G.; Pan, W. Usnic acid induces cycle arrest, apoptosis, and autophagy in gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Med. Sci. Monit.*, **2018**, *24*, 556-566. <http://dx.doi.org/10.12659/MSM.908568> PMID: 29374767
- [48] Kumar, K.; Mishra, J.P.N.; Singh, R.P. Usnic acid induces apoptosis in human gastric cancer cells through ROS generation and DNA damage and causes up-regulation of DNA-PKcs and γ -H2A.X phosphorylation. *Chem. Biol. Interact.*, **2020**, *315*, 108898. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108898> PMID: 31715134
- [49] Qi, W.; Lu, C.; Huang, H.; Zhang, W.; Song, S.; Liu, B. (+)-Usnic acid induces ROS-dependent apoptosis *via* inhibition of mitochondrial respiratory chain complexes and Nrf2 expression in lung squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*(3), E876. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21030876> PMID: 32013250
- [50] Singh, N.; Nambiar, D.; Kale, R.K.; Singh, R.P. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Nutr. Cancer*, **2013**, *65*(Suppl. 1), 36-43. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2013.785007> PMID: 23682781
- [51] Wu, W.; Gou, H.; Dong, J.; Yang, X.; Zhao, Y.; Peng, H.; Chen, D.; Geng, R.; Chen, L.; Liu, J. Usnic acid inhibits proliferation and migration through ATM mediated DNA damage response in RKO colorectal cancer cell. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2020**. <http://dx.doi.org/10.2174/1389201021666201002155955> PMID: 33006536
- [52] Wu, W.; Hou, B.; Tang, C.; Liu, F.; Yang, J.; Pan, T.; Si, K.; Lu, D.; Wang, X.; Wang, J.; Xiong, X.; Liu, J.; Xie, C. (+)-Usnic acid inhibits migration of c-KIT positive cells in human colorectal cancer. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2018**, *2018*, 5149436. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/5149436> PMID: 30298093
- [53] Machado, N.M.; Ribeiro, A.B.; Nicoletti, H.D.; Ozelin, S.D.; Silva, L.H.D.D.; Guisone, A.P.P.; Rinaldi-Neto, F.; Lemos, I.L.L.; Furtado, R.A.; Cunha, W.R.; Rezende, A.A.A.; Spanó, M.A.; Tavares, D.C. Usnic acid attenuates genomic instability in Chinese hamster ovary (CHO) cells as well as chemical-induced preneoplastic lesions in rat colon. *J. Toxicol. Environ. Health A*, **2019**, *82*(6), 401-410. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2019.1613274> PMID: 31066341
- [54] Yurdacan, B.; Egeli, U.; Eskiler, G.G.; Eryilmaz, I.E.; Cecener,

- G.; Tunca, B. The role of usnic acid-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma. *Hum. Exp. Toxicol.*, **2019**, *38*(2), 201-215.
<http://dx.doi.org/10.1177/0960327118792052> PMID: 30084279
- [55] Sahu, S.C.; Amankwa-Sakyi, M.; O'Donnell, M.W., Jr; Sprando, R.L. Effects of usnic acid exposure on human hepatoblastoma HepG2 cells in culture. *J. Appl. Toxicol.*, **2012**, *32*(9), 722-730.
<http://dx.doi.org/10.1002/jat.1721> PMID: 21953288
- [56] Prokopiev, I.; Filippova, G.; Filippov, E.; Voronov, I.; Sleptsov, I.; Zhanataev, A. Genotoxicity of (+)- and (-)-usnic acid in mice. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **2019**, *839*, 36-39.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.01.010> PMID: 30744810
- [57] Bačkorová, M.; Jendželovský, R.; Kello, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Fedoročko, P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol. In vitro*, **2012**, *26*(3), 462-468.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.017> PMID: 22285236
- [58] Galanty, A.; Koczurkiewicz, P.; Wnuk, D.; Paw, M.; Karnas, E.; Podolak, I.; Węgrzyn, M.; Borusiewicz, M.; Madeja, Z.; Czyż, J.; Michalik, M. Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and melanoma cancer cells. *Toxicol. In vitro*, **2017**, *40*, 161-169.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.008> PMID: 28095330
- [59] Ranković, B.; Kosanić, M.; Stanojković, T.; Vasiljević, P.; Manojlović, N. Biological activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. *Int. J. Mol. Sci.*, **2012**, *13*(11), 14707-14722.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms131114707> PMID: 23203090
- [60] Emsen, B.; Aslan, A.; Turkez, H.; Joughi, A.; Kaya, A. The anti-cancer efficacies of diffractaic, lobaric, and usnic acid: *In Vitro* inhibition of glioma. *J. Cancer Res. Ther.*, **2018**, *14*(5), 941-951.
<http://dx.doi.org/10.4103/0973-1482.177218> PMID: 30197329
- [61] Hoa, N.T.; Van Bay, M.; Mechler, A.; Vo, Q.V. Is Usnic acid a promising radical scavenger? *ACS Omega*, **2020**, *5*(28), 17715-17720.
<http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c02306> PMID: 32715258
- [62] Cetin Cakmak, K.; Gülçin, İ. Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid-an activity-structure insight. *Toxicol. Rep.*, **2019**, *6*, 1273-1280.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.003> PMID: 31832335
- [63] Behera, B.C.; Mahadik, N.; Morey, M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. *Pharm. Biol.*, **2012**, *50*(8), 968-979.
<http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2012.654396> PMID: 22775414
- [64] Ceylan, H.; Demir, Y.; Beydemir, Ş. Inhibitory effects of usnic and carnosic acid on some metabolic enzymes: An *in vitro* study. *Protein Pept. Lett.*, **2019**, *26*(5), 364-370.
<http://dx.doi.org/10.2174/0929866526666190301115122> PMID: 30827223
- [65] Kohlhardt-Floehr, C.; Boehm, F.; Troppens, S.; Lademann, J.; Truscott, T.G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation--studies on human cells. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2010**, *101*(1), 97-102.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.06.017> PMID: 20656501
- [66] Suwalsky, M.; Jemiola-Rzeminska, M.; Astudillo, C.; Gallardo, M.J.; Staforelli, J.P.; Villena, F.; Strzalka, K. An *in vitro* study on the antioxidant capacity of usnic acid on human erythrocytes and molecular models of its membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, *1848*(11 Pt A), 2829-2838.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2015.08.017> PMID: 26299817
- [67] Maulidiyah; Sabarwati, S.H.; Harjuliarto, R.; Watoni, A.H.; Nurdin, M. Antibacterial activity of usnic acid from *Usnea longissima* Ach. *Pak. J. Pharm. Sci.*, **2020**, *33*(4), 1631-1639.
 PMID: 33583797
- [68] Ivanova, V.; Backor, M.; Dahse, H.M.; Graefe, U. Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **2010**, *40*(4), 377-388.
<http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2010.525432> PMID: 21108141
- [69] Paudel, B.; Bhattarai, H.D.; Lee, H.K.; Oh, H.; Shin, H.W.; Yim, J.H. Antibacterial activities of Ramalin, usnic acid and its three derivatives isolated from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.*, **2010**, *65*(1-2), 34-38.
<http://dx.doi.org/10.1515/znc-2010-1-206> PMID: 20355318
- [70] Sultana, N.; Afolayan, A.J. A new depsidone and antibacterial activities of compounds from *Usnea undulata* Stirton. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2011**, *13*(12), 1158-1164.
<http://dx.doi.org/10.1080/10286020.2011.622720> PMID: 22115039
- [71] Nithyanand, P.; Beema Shafreen, R.M.; Muthamil, S.; Karutha Pandian, S. Usnic acid, a lichen secondary metabolite inhibits Group A *Streptococcus* biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek*, **2015**, *107*(1), 263-272.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10482-014-0324-z> PMID: 25367342
- [72] Yoshikawa, K.; Kokudo, N.; Tanaka, M.; Nakano, T.; Shibata, H.; Aragaki, N.; Higuchi, T.; Hashimoto, T. Novel abietane diterpenoids and aromatic compounds from *Cladonia rangiferina* and their antimicrobial activity against antibiotics resistant bacteria. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2008**, *56*(1), 89-92.
<http://dx.doi.org/10.1248/cpb.56.89> PMID: 18175983
- [73] Ramos, D.F.; Almeida da Silva, P.E. Antimycobacterial activity of usnic acid against resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria. *Pharm. Biol.*, **2010**, *48*(3), 260-263.
<http://dx.doi.org/10.3109/13880200903085490> PMID: 20645810
- [74] Honda, N.K.; Pavan, F.R.; Coelho, R.G.; de Andrade Leite, S.R.; Micheletti, A.C.; Lopes, T.I.; Misutsu, M.Y.; Beatriz, A.; Brum, R.L.; Leite, C.Q. Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine*, **2010**, *17*(5), 328-332.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.07.018> PMID: 19683421
- [75] Maciąg-Dorszyńska, M.; Węgrzyn, G.; Guzew-Krzemińska, B. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2014**, *353*(1), 57-62.
<http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12409> PMID: 24571086
- [76] Pompilio, A.; Riviello, A.; Crocetta, V.; Di Giuseppe, F.; Pomponio, S.; Sulpizio, M.; Di Ilio, C.; Angelucci, S.; Barone, L.; Di Giulio, A.; Di Bonaventura, G. Evaluation of antibacterial and antibiofilm mechanisms by usnic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.*, **2016**, *11*, 1315-1338.
<http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2016-0049> PMID: 27633726
- [77] Gupta, V.K.; Verma, S.; Gupta, S.; Singh, A.; Pal, A.; Srivastava, S.K.; Srivastava, P.K.; Singh, S.C.; Darokar, M.P. Membrane-damaging potential of natural L-(-)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **2012**, *31*(12), 3375-3383.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-012-1706-7> PMID: 22865029
- [78] Ramis, I.B.; Vianna, J.S.; Reis, A.J.; von Groll, A.; Ramos, D.F.; Viveiros, M.; da Silva, P.E.A. Antimicrobial and efflux inhibitor activity of Usnic acid against *Mycobacterium abscessus*. *Planta Med.*, **2018**, *84*(17), 1265-1270.
<http://dx.doi.org/10.1055/a-0639-5412> PMID: 29913527
- [79] Lauterwein, M.; Oethinger, M.; Belsner, K.; Peters, T.; Marre, R. *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, *39*(11), 2541-2543.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.39.11.2541> PMID: 8585741
- [80] Sokolov, D.N.; Zarubae, V.V.; Shtro, A.A.; Polovinka, M.P.; Luzina, O.A.; Komarova, N.I.; Salakhutdinov, N.F.; Kiselev, O.I. Anti-viral activity of (-) and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*(23), 7060-7064.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.084> PMID: 23099095
- [81] Peralta, M.A.; da Silva, M.A.; Ortega, M.G.; Cabrera, J.L.; Paraje, M.G. Usnic acid activity on oxidative and nitrosative stress of azole-resistant *Candida albicans* biofilm. *Planta Med.*, **2017**, *83*(3-04), 326-333.
- [82] Nithyanand, P.; Beema Shafreen, R.M.; Muthamil, S.; Karutha Pandian, S. Usnic acid inhibits biofilm formation and virulent mor-

- phological traits of *Candida albicans*. *Microbiol. Res.*, **2015**, *179*, 20-28.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.06.009> PMID: 26411891
- [83] Derici, M.K.; Cansaran-Duman, D.; Taylan-Özkan, A. Usnic acid causes apoptotic-like death in *Leishmania major*, *L. infantum* and *L. tropica*. *3 Biotech*, **2018**, *8*(9), 384.
- [84] da Luz, J.S.; de Oliveira, E.B.; Martins, M.C.; da Silva, N.H.; Alves, L.C.; dos Santos, F.A.; da Silva, L.L.; Silva, E.C.; de Medeiros, P.L. Ultrastructural analysis of *Leishmania infantum chagasi* promastigotes forms treated *in vitro* with usnic acid. *ScientificWorldJournal*, **2015**, *2015*, 617401.
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/617401> PMID: 25767824
- [85] Lauinger, I.L.; Vivas, L.; Perozzo, R.; Stairiker, C.; Tarun, A.; Zloh, M.; Zhang, X.; Xu, H.; Tonge, P.J.; Franzblau, S.G.; Pham, D.H.; Esguerra, C.V.; Crawford, A.D.; Maes, L.; Tasdemir, D. Potential of lichen secondary metabolites against *Plasmodium* liver stage parasites with FAS-II as the potential target. *J. Nat. Prod.*, **2013**, *76*(6), 1064-1070.
<http://dx.doi.org/10.1021/np400083k> PMID: 23806111
- [86] Cetin, H.; Tufan-Cetin, O.; Turk, A.O.; Tay, T.; Candan, M.; Yanikoglu, A.; Sumbul, H. Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae). *Nat. Prod. Res.*, **2012**, *26*(4), 350-355.
<http://dx.doi.org/10.1080/14786411003774296> PMID: 21452097
- [87] de Paz, G.A.; Raggio, J.; Gómez-Serranillos, M.P.; Palomino, O.M.; González-Burgos, E.; Carretero, M.E.; Crespo, A. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, *53*(2), 165-171.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.04.013> PMID: 20457504
- [88] Lee, S.; Lee, Y.; Ha, S.; Chung, H.Y.; Kim, H.; Hur, J.S.; Lee, J. Anti-inflammatory effects of usnic acid in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res.*, **2020**, *1730*, 146642.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146642> PMID: 31930999
- [89] Cazarin, C.A.; Dalmagro, A.P.; Gonçalves, A.E.; Boeing, T.; Silva, L.M.D.; Corrêa, R.; Klein-Júnior, L.C.; Pinto, B.C.; Lorenzetti, T.S.; Sobrinho, T.U.D.C.; Fátima, Â.; Lage, T.C.A.; Fernandes, S.A.; Souza, M.M. Usnic acid enantiomers restore cognitive deficits and neurochemical alterations induced by A β_{1-42} in mice. *Behav. Brain Res.*, **2021**, *397*, 112945.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112945> PMID: 33022354
- [90] Erfani, S.; Valadbeigi, T.; Aboutaleb, N.; Karimi, N.; Moghimi, A.; Khaksari, M. Usnic acid improves memory impairment after cerebral ischemia/reperfusion injuries by anti-neuroinflammatory, anti-oxidant, and anti-apoptotic properties. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, **2020**, *23*(9), 1225-1231.
 PMID: 32963745
- [91] Kim, K.J.; Jeong, M.H.; Lee, Y.; Hwang, S.J.; Shin, H.B.; Hur, J.S.; Son, Y.J. Effect of Usnic acid on osteoclastogenic Activity. *J. Clin. Med.*, **2018**, *7*(10), E345.
<http://dx.doi.org/10.3390/jcm7100345> PMID: 30322046
- [92] Song, Y.; Yu, Z.; Song, B.; Guo, S.; Lei, L.; Ma, X.; Su, Y. Usnic acid inhibits hypertrophic scarring in a rabbit ear model by suppressing scar tissue angiogenesis. *Biomed. Pharmacother.*, **2018**, *108*, 524-530.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.176> PMID: 30243085
- [93] Su, Z.Q.; Mo, Z.Z.; Liao, J.B.; Feng, X.X.; Liang, Y.Z.; Zhang, X.; Liu, Y.H.; Chen, X.Y.; Chen, Z.W.; Su, Z.R.; Lai, X.P. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. *Int. Immunopharmacol.*, **2014**, *22*(2), 371-378.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.06.043> PMID: 25068825
- [94] Li, J.; Di, L.H.; Liu, W.X.; Ren, Y.L. Usnic acid inhibits ER stress activation through AMPK signaling pathway in rat cardiomyocytes. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **2014**, *18*(17), 2538-2543.
 PMID: 25268102

Lichen Depsides and Tridepsides: Progress in Pharmacological Approaches.

Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP.

Journal of Fungi 2023,9,116.

<https://doi.org/10.3390/jof9010116>

Review

Lichen Depsides and Tridepsides: Progress in Pharmacological Approaches

Isabel Ureña-Vacas, Elena González-Burgos *, Pradeep Kumar Divakar and María Pilar Gómez-Serranillos *

Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: elenagon@ucm.es (E.G.-B.); pserra@ucm.es (M.P.G.-S.)

Abstract: Depsides and tridepsides are secondary metabolites found in lichens. In the last 10 years, there has been a growing interest in the pharmacological activity of these compounds. This review aims to discuss the research findings related to the biological effects and mechanisms of action of lichen depsides and tridepsides. The most studied compound is atranorin, followed by gyrophoric acid, diffractaic acid, and lecanoric acid. Antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities are among the most investigated activities, mainly in in vitro studies, with occasional in silico and in vivo studies. Clinical trials have not been conducted using depsides and tridepsides. Therefore, future research should focus on conducting more in vivo work and clinical trials, as well as on evaluating the other activities. Moreover, despite the significant increase in research work on the pharmacology of depsides and tridepsides, there are many of these compounds which have yet to be investigated (e.g., hiassic acid, lassalic acid, ovoic acid, crustinic acid, and hypothamnolic acid).

Keywords: depsides; tridepsides; pharmacological activities; lichens

1. Introduction

Using the traditional definition of lichens, these organisms are a symbiotic association consisting of a mycobiont (Ascomycota and Basidiomycota phylum) and a photosynthetic partner (which is an algae or a cyanobacterium). The rise of “Omics” technologies such as genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics allows us to deeply study the symbiotic partnership in lichens. Photobiont and mycobiont are not the only members of this symbiosis. Specific bacterial microbiomes, such as Alphaproteobacteria communities and lichenicolous fungi, have also been identified and characterized on lichens [1–3]. Between 17,000 and 20,000 lichen species that inhabit diverse ecosystems have been identified [4]. The nutritional uses as food or flavoring agents, the spiritual uses in religious ceremonies, the industrial uses as natural dyes, and the environmental ones as biomonitors of pollution have made lichens a significant resource for different economic activities [5]. Like higher plants, lichens have been used for their therapeutic properties in many traditional medicine systems, such as those of Ayurvedic and Unani medicine, for, e.g., bronchitis, asthma, amenorrhea, stomach disorder, and vomiting [6]. For example, the *Usnea* species has been used in many cultures around the world for its antiseptic, wound healing, antibacterial, and anti-inflammatory properties. Traditional knowledge and confirmed activity studies led to the improvement of its pharmacological potential by new pharmaceutical formulations. Popovici et al. have developed bioadhesive oral films with *Usnea barbata* extract in Canola oil as an effective oral formulation [7]. However, the usefulness of lichens in the pharmaceutical industry goes far beyond this. The biological synthesis of nanoparticles (NPs) has become an active line of research. The reducing or stabilizing capacity of different natural sources, including lichens, is used in a simple, non-toxic, eco-friendly process known as green synthesis [8]. Lichenan from *Usnea longissima* was used to decorate selenium nanoparticle surfaces, showing great stability and

Citation: Ureña-Vacas, I.; González-Burgos, E.; Divakar, P.K.; Gómez-Serranillos, M.P. Lichen Depsides and Tridepsides: Progress in Pharmacological Approaches. *J. Fungi* **2023**, *9*, 116. <https://doi.org/10.3390/jof9010116>

Academic Editors: Wenbing Yin, Shu-Ming Li, Xiaolong Yang and Lin Chen

Received: 30 November 2022

Revised: 11 January 2023

Accepted: 12 January 2023

Published: 14 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

strong free radical scavenging [9]. *Protoparmeliopsis muralis* lichen aqueous extract was used in the green synthesis of Ag, Cu, TiO₂, ZnO, and Fe₃O₄ nanoparticles with antibacterial, antibiofilm, anti-quorum sensing, antimotility, and antioxidant activities [10].

Furthermore, to overcome the disadvantages of this process, new biomechanicochemical methods are being studied. The powdered lichens *Xanthoria elegans*, *Cetraria islandica*, *Usnea antarctica*, and *Leptogium puberulum* optimize the synthesis process of silver nanoparticles in a solid state synthesis [11].

All of these bioactive properties are attributed to their secondary metabolites. There have been around 1000 different secondary metabolites identified; these are mainly unique to these organisms and include, most notably, polyketides [12]. Three biosynthetic pathways are involved in the formation of these metabolites, such as the shikimic acid pathway for pulvinic acid derivatives; the mevalonic acid pathways for terpenes and steroids; and the polymalonate pathway, from which the main interesting groups of secondary metabolites, depsidones, depsides, and dibenzofurans are synthesized [13]. These compounds comprise from 5% to 20% of the dry weight of the thallus [6].

The present review focuses only on depsides and tridepsides and outlines the research on their bioactivities. These compounds have been identified in different lichens, such as *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf (e.g., olivetoric acid); *Umbilicaria hirsuta* (Sw. Ex Westr.) Hoffm. (e.g., gyrophoric acid); *Thamnolia subuliformis* (Ehrenb.) W.L. Culb. (e.g., baeomycesic acid); *Usnea diffracta* Vain (e.g., diffractaic acid); and *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. (e.g., barbatic acid) [14–18]. Most depsides and tridepsides are found in the lichen medulla. In contrast to cortical chemistry, which was usually correlated with higher taxonomic ranks, medullary chemistry was used as the species level discriminator [19]. However, in the last decades DNA techniques have changed the understanding of lichen taxonomy. As Lucking et al. explain, the presence of chemical compounds must be taken into account when comparing variations in well-established, molecularly defined taxa (e.g., chemosyndromes) [20]. Polyketides synthases (PKSs) genes for depside synthesis are currently being studied. Through the study of *Pseudevernia furfuracea* chemotypes, Singh et al. have identified that the same biosynthetic gene cluster can produce different compounds, suggesting intraspecific variation in the regulation of metabolite synthesis [21].

The interest in depsides and tridepsides has grown in recent years due to their biological and pharmacological activities, as is reflected in the exponential increase in scientific publications. These compounds have shown antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, and UV-protectant activities, among others [22–26].

This review aims to investigate the research findings related to the biological effects and mechanisms of action of lichen depsides and tridepsides in order to highlight the strong demand for an in-depth study of their structures and activities, ADMET parameter properties, and toxicities for the further development of drugs with lichen metabolites.

2. Pharmacological Activity of Lichen Depsides and Tridepsides

2.1. Depsides

The depside chemical structures are shown in Figure 1. The pharmacological activities of the depsides are compiled in Table 1.

2.1.1. Atranorin

Atranorin is the most studied depside of this group of compounds. Several activities were investigated in vitro, in silico, and even in vivo experiments. This review describes the activities, which range from the analgesic, anti-inflammatory, antiulcer, antidiabetic, antioxidant, and cytotoxic to the antimicrobial, antifungal, antiviral, antiparasitic, and larvicidal, as well as the potential neuroprotection activities, among others.

Different studies showed the effects of this depside against bacteria, fungi, viruses, protozoans, and larvae. Atranorin exhibited low antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, with high minimum inhibitory concentration (MIC)

values (15.6 µg to 500 µg per disk against 10^7 cells) [27]. Other studies showed the bacteriostatic effect against Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, isolated from cystic fibrosis patients, with differences among the strains (the MIC values for all the strains tested were 128 µg/mL, except that from MRSA Sa15, which was 64 µg/mL). Moreover, this depside was found to be effective against the adhesion of *Staphylococcus aureus* strains on polystyrene, reducing the ability of biofilm formation; it was also interesting with regard to the eradication of preformed biofilms [28]. Fungal species such as *Candida albicans* were minimally inhibited by atranorin [27,29]. Conversely, this compound showed its maximum antifungal activity against *Sclerotium rolfsii* (ED₅₀ 39.70 µg/mL) [30]. In vitro activity against species of the *Mycobacterium* genera, such as *M. tuberculosis*, *M. aurum*, and diverse mycobacterial multidrug-resistant strains (MDR-A8, MDR-V791, MDR-R, MDR-40s), was also low, with MIC values of 250 µg/mL, 125 µg/mL, and 200 µg/mL, respectively [31–33]. Probiotic bacteria *Lactobacillus casei* increased its biomass (41.1 mg) due to the moderate growth stimulating activity of atranorin [34].

It also acts as an antiviral agent against the hepatitis C virus (HCV), inhibiting viral entry (IC₅₀ 22.3 µM) [35].

As evidenced in the work of Zofou et al., atranorin also presented antiplasmodial effects against different strains and field isolates of *Plasmodium falciparum*, with IC₅₀ values of < 5 µM. Furthermore, this compound had synergistic interactions with artemether [36,37]. Other protozoa, such as piroplasm parasites (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Babesia divergens*, *Babesia caballi* and *Theileria equi*), were affected by atranorin properties, reducing their multiplication in in vitro studies. Moreover, in vivo experiments were carried out using female BALB/c mice infected with *Babesia microti*. A reduction in *Babesia microti* multiplication by 68.17% was observed [38].

Larvicidal activity against the second and third instar larvae of the mosquito *Culiseta longiareolata* was also investigated, showing lethal concentration (LC) (50) and LC (90) values of 0.52 ppm and 5.93 ppm, respectively [39].

Several in vitro and in vivo studies demonstrated the analgesic and anti-inflammatory activities of atranorin. Due to the structure similarity between this depside and cyclooxygenase (COX) inhibitors, in vitro experiments were conducted, which showed 50% COX-1 inhibition at 17 µg/mL and 40% COX-2 inhibition at all concentrations of the analyzed range (17 µg/mL–0.17 µg/mL) [40]. In addition, according to Kumar and Müller, this compound inhibited leukotriene B₄ (LTB₄) biosynthesis in polymorphonuclear leukocytes (IC₅₀ 6 µM) via a nonspecific redox mechanism [41]. Atranorin also exerted analgesic and anti-inflammatory effects in mice. With doses of 200 and 400 mg/kg (p.o.), a reduction (52.6 and 61.3%, respectively) in abdominal writhing and inhibition of the inflammatory processes was observed [42]. Furthermore, atranorin pretreatments (100, 200, and 400 mg/kg, i.p) reduced the effects on formalin- and capsaicin-induced orofacial pain tests, decreasing the nociceptive behavior of rubbing the face. At high doses (400 mg/kg, i.p), the effect appears to be central and is reversed with the administration of naxolone. Thus, in the acute model of carrageenan- and arachidonic acid-induced inflammation, atranorin reduced the formation of paw edema in rats [43].

In in vitro and in silico studies of N-substituted hydrazide derivatives of atranorin, a high α-glucosidase inhibition (IC₅₀ 6.67 µM) was shown, making it a potential antidiabetic drug [44]. Atranorin showed high urease inhibition (IC₅₀ 18.2 µM), making it a potential antiulcer drug candidate. Nonetheless, atranorin has no effectiveness against α-chymotrypsin [45].

Atranorin acts as an antioxidant or a prooxidant, depending on the study. Atranorin showed moderate antioxidant activity, as was evidenced in a 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay (IC₅₀ value = 100 µg/mL), and anti-linoleic acid peroxidation activity (IC₅₀ value = 116 µg/mL) and hydroxyl radical-scavenging activity (11.85 mg expressed as Trolox® equivalents) in a total peroxy radical-trapping (TRAP) assay (at 1–100 µg/mL concentrations) and a total antioxidant response (TAR) assay (at 100 µg/mL) [34,46,47].

Other studies presented atranorin as a weak antioxidant, as revealed in a beta-carotene-linoleate model system (14% antioxidant activity at 200 µg/mL) [48].

Conversely, a TBARS assay showed that atranorin induced lipoperoxidation at 0.1 to 100 µg/mL, increased NO production (only at high concentrations), and enhanced H₂O₂ formation. This compound acted as a superoxide scavenger, and hydroxyl radical/nitric oxide scavenging activity was not observed [47].

Cytotoxic effects on different cell lines (cancer and normal) were also investigated. Atranorin has demonstrated moderate activity against breast cancer cells such as MDA MB-231 and MCF-7, with IC₅₀ values of 5.36 µM and 7.55 µM, respectively, by the downregulation of the Bcl-2, Akt, Bcl-w, and Bcl-xL proteins and the induction of Bax and caspase-3 expression. *In silico* studies confirmed the high interaction between the depside and the oncoproteins [49]. Cytotoxicity was also observed in human lung cancer cell lines (A549), epithelial carcinoma cell lines (SKHep1 and Huh-7), primary cancer cell lines (SNU-182), melanoma cell lines (HTB-140), prostate cancer cell lines (DU-145 and PC-3), and murine leukemia cell lines (P388) [50–53]. The tumorigenesis reduction and antimigratory activity against human lung cancer was mediated by the downregulation of activator protein 1 (AP-1), Wnt, and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways, as well as the inhibition of RhoGTPase activity [50]. Moreover, atranorin showed effects against hepatocellular carcinoma tumorigenesis by reducing cell proliferation (at 80 µg/mL), attenuating the cell cycle (G2/M phase cell cycle arrest), inducing cell death through necrosis, and diminishing metastatic potential by the suppression of cell migration and invasion [51]. Additionally, atranorin was found to be effective in inhibiting the cancer cell proliferation, migration, and actin cytoskeleton organization in melanoma cell lines (HTB-140) and prostate cancer lines (DU-145 and PC-3) [52]. The killing effect of atranorin on gastric cancer was also studied using complexes formed by superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) and atranorin. *In vitro* results on gastric cancer stem cells showed a reduction in proliferation, invasion, and tumorigenicity by reducing the expression of members of the Xc-/GPX4 axis and their mRNA 5-hydroxymethylcytidine modification and by inducing ferroptosis [54].

Moreover, this compound revealed cytotoxicity against all the cell lines (A2780, HCT-116 p53+/+ and HCT-116 p53-/-, SK-BR-3, HL-60, HT-29, Jurkat, and MCF-7) except HeLa, highlighting its activity against HL-60 cells. The clonogenic ability for the inhibition of all the tested tumor cells and the effects on the cell cycle at 200 µM (accumulation in S-phase at expense of G1/G0-phase) was also observed. In addition, atranorin seems to be effective as a pro-apoptotic agent with a p53-dependent action [55]. In particular, the studies on A2780 cancer cells and HT-19 also showed that atranorin caused cell death by reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/RNS) overproduction, caspase-3 activation, phosphatidylserine externalization, and mitochondrial membrane potential loss [56].

In vivo experiments were also conducted. Atranorin administration to BALB/c mice with T1-induced cancer disease was related to longer survival time, reduced tumor size, and higher numbers of apoptotic 4T1 cells. Comparing the effects of atranorin on normal mammary epithelial NMuMG cells and 4T1 cancer cells, it was observed that 4T1 cells were more sensitive to atranorin, reducing the clonogenic ability of carcinoma (75 µM), inducing apoptosis mediated by caspase-3 activation and poly ADP ribose polymerase (PARP) cleavage, and enhancing the depletion of Bcl-xL protein [57]. Moreover, atranorin SPION complexes showed tumorigenicity reduction in NOD-scid mice [54].

However, this depside showed low activity (IC₅₀ ≥ 250 µg/mL) against melanoma cancer cell lines (A375, UACC-62, and B16-F10), human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) (IC₅₀ = 286 µg/mL), and human prostate cancer cells (LNCaP and DU-145), only inhibiting at the highest concentration tested (25 and 50 µM) [33,58–60]. Furthermore, atranorin was found to be ineffective as a topoisomerase I inhibitor [61]. Finally, in human lymphocytes, atranorin did not cause clastogenic and antiproliferative effects [16].

Atranorin participates in processes such as neuroprotection, acting as a neurotrophic and proneurogenic agent (131.73 µM in neurite outgrowth at 5 µM). Moreover, this

compound stimulated neurotrophic genes (brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) expression) [62].

Previous studies focused on the effects of atranorin alongside irradiation (360–366 nm), as evidenced in the inhibition of 8-methoxypsoralen (MOP)-human serum albumin (HSA), photobinding by 20.1%, and also as revealed in the significant hemolysis in red cell suspension; it acted as a photoprotective and photohemolytic agent, respectively [63,64].

2.1.2. Baeomycesic Acid

The β -orcinol depside baeomycesic acid, a major secondary metabolite in *Thamnia* spp., was shown to selectively inhibit 5-lipoxygenase (LOX); this seems to be related to its aromatic ring substitution pattern in positions 4, 1' and 2' [15,65]. However, this compound demonstrated weak activity against 12(S)-lipoxygenase in human platelets [66]. Moreover, this depside presented a slightly antiproliferative potential against cancer cell lines from several tissues (pancreas, ovary, and colorectal) [65].

2.1.3. Barbatic Acid

Barbatic acid showed antiparasitic activity against the adult worms and larval stages of *Schistosoma mansoni* by causing death (IC₅₀ value of 99.43 μ M), affecting mobility, as was reflected in movements being presented only in the extremities, and triggering tegumentary damage [18,67]. Moreover, this depside was active against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* (both the commercial and the clinic strains), with MIC values of 7.8 to 31.3 μ g/mL [68]. This compound also displayed molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* at 20 and 25 μ g/mL [67].

Furthermore, this secondary metabolite was a potent cytotoxic agent against the lung cancer A549 cell line, with an IC₅₀ value of 1.78 μ M, by inducing apoptosis, as shown in the cell cycle arrest in the G0/G1 phase, the cleavage of PARP, and the activation of caspase-3 activity [69]. Conversely, this compound was found to have little effect in inhibiting the tumor promoter-induced Epstein–Barr virus (EBV), with an IC₅₀ value higher than 100 μ M [70]. Finally, in silico studies revealed that barbatic acid is a weak diuretic agent on the active site of the with-no-lysine kinase 1 (WNK1) domain [71].

2.1.4. Diffractaic Acid

The antimicrobial activities of diffractaic acid were studied against bacteria and fungi. The inhibition zones in the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cultures were 17.25 mm and 12.75 mm, respectively, at concentrations of 1000 ppm, exhibiting a strong activity (less than the amoxicillin control) [72]. This compound exhibited strong activity against *Fusarium fujikuroi* (MIC value of 16×10^{-3} mg/mL). This activity was higher than that of the flucytosine, clotrimazole, and ketoconazole drugs and similar to that of amphotericin B and posaconazole [73]. Furthermore, diffractaic acid was a potent antimycobacterial agent, with an MIC value of 15.6 μ g/mL [31].

Diffractaic acid has also been investigated for its analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory properties. This compound, at a dose of 200 mg/kg, exerted a moderate analgesic effect and a hypothermic effect on normal body temperature in male ddY mice. However, diffractaic acid did not suppress the fever in mice with lipopolysaccharide(LPS)-induced hyperthermia [14]. Moreover, diffractaic acid inhibited the formation of LTB₄ in polymorphonuclear leukocytes, with an IC₅₀ value of 8 μ M via a nonspecific redox mechanism [41].

This secondary metabolite showed a protective effect against indomethacin-induced gastric ulcers in Wistar rats via increasing the antioxidant capacity (augmented enzyme activities and reduced glutathione levels and decreased lipid peroxidation) and via suppressing neutrophil infiltration. As an index of the neutrophil infiltration, myeloperoxidase (MPx), and nitric oxide synthase (NOS) activities were used. In gastric mucosal lesions, the activities of MPx and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were increased.

Diffraitaic acid reduced MPx and iNOS activities and increased constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activity [74].

Several works have focused on studying the cytotoxic activity of diffractaic acid in different types of tumor cells. This secondary metabolite showed moderate cytotoxicity in the cells of the nervous system (IC₅₀ values of 122.26 mg/L in neurons and IC₅₀ values of 35.67 mg/L in glioblastoma multiforme cells) [75]. Moreover, this depside exhibited a cytostatic effect through antiproliferation activity in the human keratinocyte HaCaT cell line, with an IC₅₀ value of 2.6 mM [76]. Furthermore, diffractaic acid demonstrated a significant cytotoxicity against human breast cancer (MCF-7 cell line), human epithelial carcinoma (HeLa cell line), and human lung cancer (NCI-H460 cell line) at a concentration of 100 µg/mL [77]. In another study, this lichen compound displayed a strong proliferative action against the colon carcinoma HCT-116 cell line (IC₅₀ value of 42.2 µM) and moderate activity against the breast adenocarcinoma MCF-7 cell line and the cervix adenocarcinoma HeLa cell line (IC₅₀ values of 93.4 µM and 64.6 µM, respectively) [78]. In addition, diffractaic acid was found to be a moderate inhibitor of thioredoxin reductase [79]. Likewise, this compound was found to have little effect in inhibiting the tumor promoter-induced Epstein–Barr virus (IC₅₀ value of > 100 µM) [70].

All these studied activities led the investigation of new formulations that reduce the cytotoxicity of the treatment with diffractaic acid. The encapsulation of the compound with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin on PLC microspheres improved its solubility and reduced the cytotoxicity in monkey kidney fibroblasts (Vero cells) [80].

2.1.5. Divaricatic Acid

Divaricatic acid has resulted in being an effective antimicrobial agent against Gram-positive bacteria, with MIC values ranging from 7.0 µg/mL for *Bacillus subtilis* to 64.0 µg/mL for *Staphylococcus aureus*, highlighting its therapeutic role in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. Moreover, this compound showed anti-*Candida* activity (MIC value of 20 µg/mL) [81]. Divaricatic acid, which is the major compound of the ether extract of the lichen *Ramalina aspera*, showed molluscicidal activities against *Biomphalaria glabrata* and cercaricidal activities against *Schistosoma mansoni* [82]. In another study, Silva et al. also demonstrated the antiparasitic properties of divaricatic acid against *Schistosoma mansoni* worms by affecting motility and viability (IC₅₀ 100.6 µM). Indeed, this compound resulted in being not cytotoxic against human peripheral blood mononuclear cells, suggesting that it is safe for humans [83].

Cytotoxic activities were also investigated in UACC-62 human and B16-F10 murine melanoma cancer cells and NIH/3T3 fibroblasts using a sulforhodamine B assay. This depside exhibited strong activity against UACC-62 (GI₅₀ 7µM) and B16-F10 cells (GI₅₀ 11.3 µM), being more selective against melanoma cells than 3T3 normal cells (GI₅₀ 37.3 µM) [59].

2.1.6. Evernic Acid

Evernic acid acts as an antimicrobial agent, inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans* (MIC values from 0.98 to 125 µg/mL) [84]. In deepening the mechanism of these effects, it was observed that the virulence of the Gram-negative opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* was reduced by inhibiting quorum sensing on diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains (54% of gfp expression of *lasB-gfp* and 50% of *rhlA-gfp* at a concentration of 116 µM). These genes are essential in the process because they encode the virulence factors elastase and rhamnolipids [23]. In another study, this depside diminished the maturation and growth of *Candida albicans* biofilms (Minimal Biofilm Inhibition Concentration (MBIC₅₀) ≤ 12.5 µg/mL) [85]. Moreover, this lichen compound displayed activity against the liver stage of the malaria parasite *Plasmodium*, targeting the fatty acid synthesis (FAS)-II pathway [86].

In another study, Fernández-Moriano et al. investigated the neuroprotective activity of evernic acid, based on its antioxidant properties, in a model of oxidative stress, which was hydrogen peroxide-induced in astrocytes and neurons. This compound increased cell

viability and reduced/oxidized the glutathione (GSH/GSSG) ratio and antioxidant enzymes expression. Moreover, evernic acid reduced lipid peroxidation, intracellular ROS overproduction, protein carbonyls content, and caspase-3 activity. The activation of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway contributes to this neuroprotection [87]. Neuroprotective effects were also shown in an MPTP-induced Parkinson's disease model. Hence, evernic acid inhibited apoptosis and mitochondrial dysfunction, and it reduced oxidative stress in primary neurons. Moreover, a reduction was demonstrated in motor dysfunction and in dopaminergic neuronal death and astroglia activation using a C57BL/6 mouse model [88].

In terms of cytotoxic activities, evernic acid showed low cytotoxicity for the malignant mesothelioma cell line (MM98), the vulvar carcinoma cell line (A431), and the human keratinocyte cell line (HaCaT). There was also no effect on the stimulation of cell migration as measured by scratch healing assays in HaCaT [89]. Contrary to these data, evernic acid demonstrated strong cytotoxic activity at 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ concentrations in a HeLa cell line and a reduction in A549 cancer cell proliferation (at 12.5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$). These depside concentrations were studied in healthy HUVEC cells with no toxic results, making this a good candidate for cancer treatment [90,91]. Evernic acid was also investigated against glioblastoma multiforme (GBM) cancer using A-172 and T98G cells, with moderate activity in A-172 cultures (IC_{50} 33.2 $\mu\text{g/mL}$). Multiple targets play a significant role in brain tumors, such as an immunosuppressive environment, inflammation, the degradation of hyaluronic acid, oxidative stress, and acetylcholine cholinesterase. Evernic acid also showed an inhibitory activity against indoleamine-2,3 dioxygenase 1 (IDO1), COX-2, hyaluronidase, and butyrylcholinesterase [92]. It should be also noted that evernic acid is a moderate inhibitor of tumor promoter-induced Epstein–Barr virus activation (64.6% of an inhibitory effect at a concentration of 50 μM) [71]. Finally, regarding the toxicity of this compound, *in silico* prediction tests showed no mutagenic effects, no tumorigenic effects, no reproductive alterations, and no irritant effects [84].

2.1.7. Isolecanoric Acid

Isolecanoric acid has shown a prolonged antioxidant action. Based on the antioxidant properties, de Pedro et al. investigated its protective role in two neurodegenerative diseases models (L-BMAA for the Amyotrophic lateral sclerosis model and rotenone for the Parkinson's disease model) in the human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line. Pretreatments with 10 and 25 μM of isolecanoric acid prevented mitochondrial dysfunction by decreasing the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$), reduced oxidative stress by attenuating the ROS production, attenuated early and late apoptosis, and inhibited glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 β) and casein kinase I (CK1) [93].

2.1.8. Lecanoric Acid

Lecanoric acid is of interest as an antimicrobial and antihelminthic agent since it inhibits 100% of Gram-negative bacteria *Aliivibrio fischeri*, and it causes 80% mortality in nematode *Caenorhabditis elegans* at 100 $\mu\text{g/mL}$ [4]. Moreover, lecanoric acid was active as an antimicrobial agent against a wide variety of bacteria and fungi, with MIC values of 0.5 to 1 mg/mL [24].

The antioxidant properties of this compound are controversial according to the studies. Therefore, according to Ristic et al., lecanoric acid showed a slight antioxidant capacity, as evidenced in the DPPH assay (IC_{50} value of 424.5 $\mu\text{g/mL}$) and the reducing power assay (0.0165 to 125 $\mu\text{g/mL}$) [24]. Jayaprakasha et al. also showed that this compound had weak–moderate antioxidant activity (36% antioxidant activity at 500 $\mu\text{g/mL}$ using the beta-carotene-linoleate model system) [48]. However, according to Thadhani et al., lecanoric acid has good antioxidant activity compared to other lichen substances [superoxide radical (SOR) test (IC_{50} value of 91.5 μmol), DPPH (IC_{50} value of 34 μmol), and nitric oxide radical (NOR) test (IC_{50} value of 53.5 μmol)] [94].

Studies on the cytotoxic activity of lecanoric acid showed that this depside has moderate activity against colon HCT116 cancer cells and reduced cell colony formation by decreasing Axin2 expression and M phase arrest (downregulation of CDK1, upregulation of cyclinB1 and pH3) [95,96]. Lecanoric acid also exhibited slight activity against human larynx carcinoma Hep-2 cells, human breast carcinoma MCF7 cells, human kidney carcinoma 786-0 cells, murine melanoma B16-F10 cells (IC_{50} values $> 50 \mu\text{g/mL}$), Hela cells (IC_{50} value of $124 \mu\text{g/mL}$), and A549 cells and LS174 cells (IC_{50} value of $200 \mu\text{g/mL}$) [24,97]. Moreover, lecanoric acid was an effective thioredoxin reductase inhibitor for cancer therapy, even more effective than the common antitumoral drugs such as doxorubicin and cisplatin [79].

Finally, in vitro studies revealed that lecanoric acid exhibited effective α -glucosidase inhibitory activity (85.9% of inhibition) with an IC_{50} value of $350 \mu\text{M}$ [98] and moderate protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity (IC_{50} $31 \mu\text{M}$) [99].

2.1.9. Methyl Evernate

Methyl evernate has displayed antimicrobial activity against bacteria and fungi and is especially active against *Bacillus cereus* (MIC value of 0.125 mg/mL) and *Candida albicans* (MIC value of 0.25 mg/mL). Furthermore, methyl evernate had low DPPH radical scavenging activity (IC_{50} value of $391.57 \mu\text{g/mL}$) and higher reducing power than acetone extracts of *Ramalina* spp. [24]. Moreover, this depside inhibited the cancer cell growth of the human epithelial carcinoma Hela cell line (IC_{50} value of $46.45 \mu\text{g/mL}$), the human lung carcinoma A549 cell line (IC_{50} value of $76.84 \mu\text{g/mL}$), and the human colon carcinoma LS174 cell line (IC_{50} value of $161.37 \mu\text{g/mL}$).

2.1.10. Olivetoric Acid

Olivetoric acid has antimicrobial activity against a wide range of bacteria, yeast, and fungi. This compound was active against 12 of 15 species of bacteria and yeast (it was inactive in *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Pseudomonas syringae*) and against 7 of 11 species of fungi (it was inactive against *Alternaria citri*, *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, and *Gaeumannomyces graminis*) [100].

Olivetoric acid showed slight to moderate antioxidant properties in cultured human amnion fibroblasts (total antioxidant capacity value of $20.79 \text{ mmol Trolox equivalent/L}$) and in cultured human lymphocytes (HLs) (total antioxidant capacity value of $3.79 \text{ mmol Trolox equivalent/L}$) [16,101]. Finally, olivetoric acid induced cytotoxicity and genotoxicity against the glioblastoma multiforme U87MG cell line (IC_{50} value of 17.55 mg/L) and primary rat cerebral cortex (PRCC) cells (IC_{50} value of 125.71 mg/mL) via oxidative stress-induction, as evidenced by the lactate dehydrogenase (LDH) activity and oxidative DNA damage [102]. Moreover, concentrations of $100\text{--}400 \text{ mg/L}$ of olivetoric acid showed activity against human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) and the upregulation of the pro-apoptotic genes, BAK, CASP6, CASP7, CASP8, FADD, FAS, and FASLG [103]. Furthermore, this depside has resulted in being of interest as anti-angiogenic agent, as evidenced by its ability to prevent rat adipose tissue endothelial cell (RATECs) cell proliferation by disrupting microtubules and inhibiting actin polymerization [104].

2.1.11. Perlatolic Acid

Perlatolic acid has good antimicrobial properties against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, with an MIC_{90} value of $32 \mu\text{g/mL}$, and it showed a synergic action with gentamicin and an antagonism action with levofloxacin [105].

This compounds also exerted neurobiological processes such as neuroprotection, neurotrophicity, and neurogenesis. Hence, this depside acts as a neurotrophic and pro-neurogenic agent ($125.34 \mu\text{m}$ in neurite outgrowth at $0.5 \mu\text{M}$) by inducing the upregulation of neurotrophic genes (BDNF and NGF). This neurotrophic activity is also related to the increased histone acetylation of H3 and H4 protein in a mouse neuroblastoma

(Neuro2A) cell line. Moreover, this secondary metabolite was a potent acetylcholinesterase (AChE) inhibitor (IC_{50} 6.8 μ M) [63]. Moreover, in silico, in vitro, and in vivo studies have shown that perlatolic acid is a potent anti-inflammatory compound by inhibiting microsomal prostaglandin E2 synthase-1 (IC_{50} 0.4 μ M), 5-lipoxygenase (IC_{50} 1.8 μ M for cell-based assay and IC_{50} 0.4 μ M for purified enzyme), tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor kappa B (IC_{50} 7 μ M), and leukocyte recruitment [106,107]. Furthermore, perlatolic acid showed slight to moderate immune-modulating properties in cultures of peritoneal macrophage cells from mice, as evidenced in a significant increase in hydrogen peroxide release and a slight increase in nitric oxide (NO) release activity [108].

2.1.12. Ramalic Acid/Obtusatic Acid

Ramalic acid/Obtusatic acid was active as an antimicrobial agent against five bacteria and ten fungal species with MIC values from 0.125 to 1 mg/mL [24]. Moreover, this depside showed slight to moderate antioxidant activity (DPPH radical scavenging activity with IC_{50} value of 324.61 μ g/mL and reducing power of 0.0142 at 125 μ g/mL) [24]. Furthermore, ramalic acid/obtusatic acid showed weak to moderate cytotoxic activity against the human epithelial carcinoma (Hela) cell line, the human lung carcinoma (A549) cell line, and the human colon carcinoma (LS174) cell line with IC_{50} values of 43.24 μ g/mL, 93.98 μ g/mL, and 74.28 μ g/mL [24]. On the other hand, this secondary metabolite was inactive as an inhibitor of LTB₄ production via non-mediation by redox reactions and as an antiproliferative agent against the human keratinocyte HaCaT cell line [41,76].

2.1.13. Sekikaic Acid

Sekikaic acid displayed maximum antimicrobial activity against *Escherichia coli* (78% inhibition), moderate activity against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptomyces viridochromogenes* (60%, 50%, and 55% inhibition, respectively), and low activity against *Bacillus subtilis* (15% inhibition) [109]. In addition, sekikaic acid acts as a potent antiviral agent against a recombinant strain rg respiratory syncytial virus (IC_{50} 5.69 μ g/mL) and a respiratory syncytial virus A2 strain (IC_{50} 7.7 μ g/mL) by interfering with viral replication at a viral post-entry step. Its antiviral action is even higher than the reference compound ribavirin [110]. Moreover, sekikaic acid has good antioxidant properties, as revealed by hydroxyl radical assay (IC_{50} value of 41.5 μ g/mL), ferric ion assay (IC_{50} value of 42.0 μ g/mL), DPPH assay (IC_{50} value of 11.24 μ g/mL; IC_{50} value of 32.6 μ mol), and SOR assay (IC_{50} value of 82.0 μ mol); this is attributed to the three hydroxyl groups of its structure [94,109,111]. In vivo studies demonstrated that this depside has antidiabetic activity by inhibiting digestive enzymes (α -glucosidase and α -amylase) and by reducing plasma glucose levels (44.17%) in a streptozotocin-induced type 2 diabetic albino rat model [111]. Regarding its cytotoxicity activity, sekikaic acid was inactive against A2780 ovarian and MCF-7 breast cancer cell lines [112].

2.1.14. Squamatic Acid

Squamatic acid showed weak antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 1250.0 mg/mL) [113]. Moreover, this compound displayed a weak antiproliferative effect on prostate cancer PC-3 cells (IG_{50} value of > 200 μ M) [114].

2.1.15. Thamnolic Acid

Thamnolic acid showed antimicrobial activity against fungi (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, and *Sclerotium rolfsii*, with MIC values of 400, 400, and 200 μ g/mL, respectively), yeast (*Candida krusei*, with an MIC value of 400 μ g/mL), and bacteria (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Proteus vulgaris*, with an MIC value of 400 μ g/mL, and *Listeria monocytogenes* and *Micrococcus luteus*, with an MIC value of 200 μ g/mL) [115]. On the other hand, this depside showed weak antiproliferative activity in prostate cancer cells (IC_{50} value of > 200 μ M) [114].

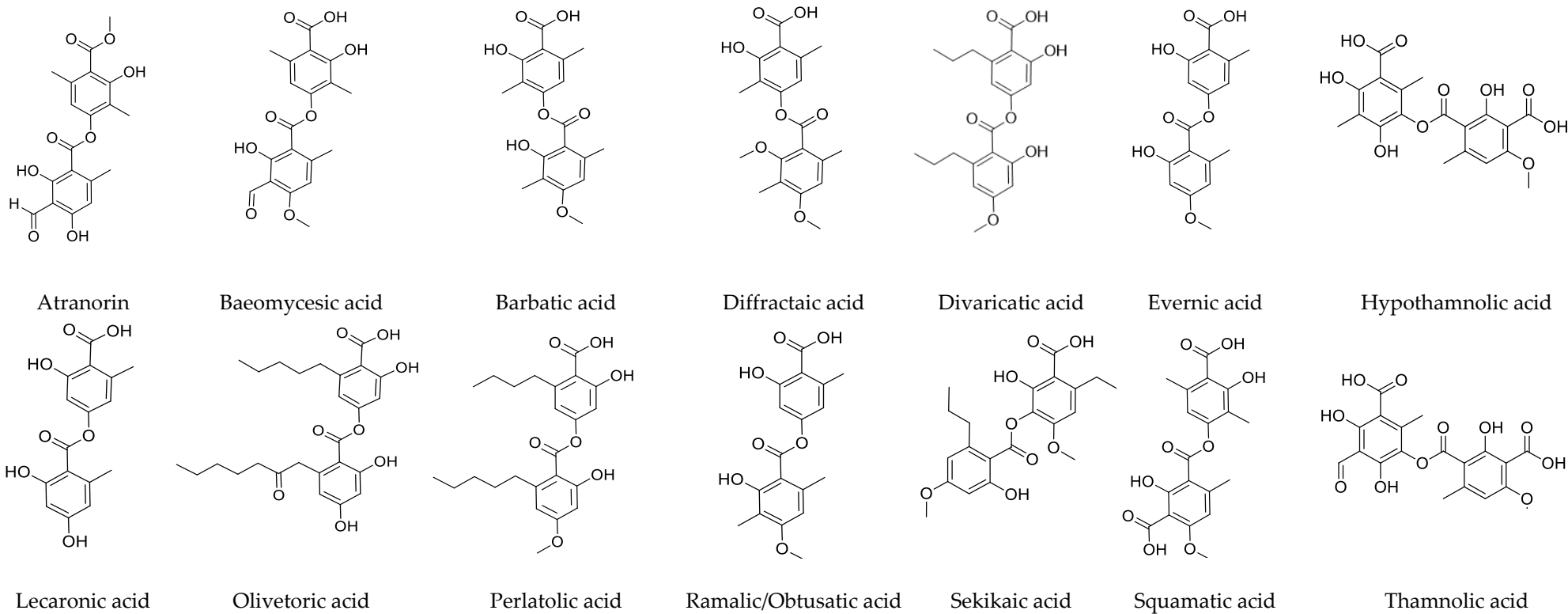


Figure 1. Chemical structures of different depsides of lichens.

Table 1. Pharmacological activity of lichen depsides.

Depside	Botanical Origin	Type of Study	Experimental Model	Activities	Results	References
	<i>Parmotrema saccatilobum</i> (Taylor) Hale	In vitro	Cyclooxygenase inhibition assay	Analgesic	Inhibition of COX-1 (IC ₅₀ 45 µM). Inhibition (40%) of COX-2 ranging between 17 µg/mL and 0.17 µg/mL.	[40]
	<i>Cladina kalbi</i> . (Ahti)	In vivo	Male Swiss mice	Analgesic	Acetic acid-induced writhing test—200 and 400 mg/kg (p.o.)—reduction (<i>p</i> < 0.05) abdominal writhing by 52.6 and 61.3%, compared to control. Formalin test—200 and 400 mg/kg (p.o.) inhibition inflammatory processes (second phase) dose dependently.	[42]
Atranorin	<i>Cladina kalbi</i> . (Ahti)	In vivo	Male Swiss mice	Analgesic Anti-inflammatory	Inhibitory effect in formalin- and capsaicin-induced orofacial pain tests. Anti-inflammatory effects in the acute model of inflammation (leukocyte migration to the peritoneal cavity), carrageenan- and arachidonic acid-induced paw edema in rats.	[43]
	-	In vitro In silico	α-Glucosidase assay HEK293 (Human embryonic kidney cell line) Docking studies	Antidiabetic	N-substituted hydrazide derivatives of atranorin, more potent inhibition than the original. Weak or no cytotoxicity toward HEK293 cell line.	[44]
	<i>Parmelia nepalensis</i> (Taylor)	In vitro	Polymorphonuclear leukocytes	Anti-inflammatory	Inhibition of LTB ₄ biosynthesis via non-redox mechanism.	[41]
	<i>Kigelia africana</i> (Lam.) Benth	In vitro	Chloroquine-resistant W-2 and two field isolates (CAM10 and SHF4) of <i>Plasmodium falciparum</i> LLC/MK2 monkey kidney cells	Antimalarial	Good activity against all parasite strains (IC ₅₀ <5 µM). Cytotoxicity at high concentrations.	[36]
	<i>Kigelia africana</i> (Lam.) Benth	In vitro	Multidrug-resistant W2mef strain of <i>Plasmodium falciparum</i>	Antimalarial	Parasite lactate dehydrogenase assay (IC ₅₀ 1.78 µM). Synergistic effects with artemether.	[37]
	<i>Homalia trichomanoides</i> (Hedw.) B. S. G.	In vitro	<i>Candida albicans</i>	Antimicrobial	Minimum inhibitory doses of 2.0 µg.	[29]
Atranorin	<i>Parmelia reticulata</i> (Taylor)	In vitro	<i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>R. bataticola</i> , <i>Fusarium udum</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> and <i>Pythium debaryanum</i>	Antimicrobial	Maximum antifungal activity against <i>Sclerotium rolfsii</i> (ED ₅₀ : 39.70 µg/mL).	[30]
	<i>Cladonia foliacea</i> (Huds.) Willd	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> Gram-negative bacteria: <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> . Fungi: <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i>	Antimicrobial	Low activity with high MIC values (15.6 µg to 500 µg per disk against 10 ⁷ cells).	[27]
	<i>Parmotrema dilatatum</i> (Vain.) Hale, <i>Parmotrema tinctorum</i> (Nyl.) Hale	In vitro	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Antimicrobial	Low-activity compound (MIC value 250 µg/mL).	[31]
Atranorin	-	In vitro	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> strains	Antimicrobial	Effective in counteracting adhesion to polystyrene, against biofilm formation and against MRSA.	[28]
	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer.	In vitro	<i>Mycobacterium aurum</i> strains	Antimicrobial	Low-activity MIC values >=125 µg/mL.	[32]

	<i>Usnea laevis</i> Nyl.	In vitro	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Mycobacterial multidrug-resistant (MDR) strains (MDR-A8, MDR-V791, MDR-R, MDR-40)	Antimicrobial	Inactive against mycobacterial strains MIC values \geq 200 $\mu\text{g/mL}$.	[33]
	<i>Cladina kalbii</i> Ahti	In vitro	TRAP, TAR, TBARS, hydroxyl radical scavenging activity, nitric oxide scavenging activity, CAT-SOD-like activity. SH-SY5Y neuroblastoma cell line	Antioxidant	TRAP assay: 1–100 $\mu\text{g/mL}$ significant antioxidant effects (dose-dependent). TAR assay: 100 $\mu\text{g/mL}$ significant antioxidant capacity. TBARS: 0.1 to 100 $\mu\text{g/mL}$ AAPH-induced lipoperoxidation. No hydroxyl radical/nitric oxide scavenging activity. Increase (\uparrow) H_2O_2 formation in vitro \uparrow superoxide degradation.	[47]
	<i>Parmotrema austrosinense</i> (Zahlbr.) Hale	In vitro	DPPH assay Anti-linoleic acid peroxidation activity	Antioxidant	IC ₅₀ : 100 $\mu\text{g/mL}$. IC ₅₀ : 116 $\mu\text{g/mL}$.	[34]
	<i>Hypotrachyna revoluta</i> (Flörke) Hale	In vitro	Hydroxyl radical-scavenging activity	Antioxidant	Metabolite (11.8 mg) same activity as Trolox (1 mg).	[46]
	<i>Parmotrema stuppeum</i> (Taylor) Hale	In vitro	Beta-carotene-linoleate model system	Antioxidant	14% of antioxidant activity at 200 $\mu\text{g/mL}$.	[48]
	-	In vitro	Piroplasm parasites: <i>Babesia. bovis</i> , <i>Babesia bigemina</i> , <i>Babesia divergens</i> , <i>Babesia caballi</i> , and <i>Theileria equi</i> Hosts of piroplasm parasites: human foreskin fibroblasts (HFF), mouse embryonic fibroblast (NIH/3T3) Madin–Darby bovine kidney (MDBK)	Anti-parasitic	Suppression of multiplication: IC ₅₀ (<i>B. bovis</i>): 98.4 μM , IC ₅₀ (<i>B. bigemina</i>): 64.5 μM , IC ₅₀ (<i>B. divergens</i>): 45.2 μM , IC ₅₀ (<i>B. caballi</i>): 46.6 μM , IC ₅₀ (<i>T. equi</i>): 71.3 μM . Reduce (\downarrow) Cell viability.	[38]
	-	In vivo	BALB/c mice infected by <i>B. microti</i>	Anti-parasitic	\downarrow <i>B. microti</i> multiplication in mice by 68.17%.	[38]
Atranorin	-	In vivo	Normal mammary epithelial NMuMG cells BALB/c mice with T1-induced cancer disease	Antitumoral	\downarrow Clonogenic ability of carcinoma. \uparrow Apoptosis associated with the activation of caspase-3 and PARP cleavage in 4T1 cells. \uparrow Depletion of Bcl-xL protein in 4T1 cells. Longer survival time, reduced tumor size, and higher numbers of apoptotic 4T1 cells. Normal NMuMG cells are less sensitive to ATR.	[57]
	<i>Stereospermum acuminatissimum</i> K. Schum.	In vitro	Urease inhibition assay Chymotrypsin inhibition assay	Antiulcerogenic	Excellent urease inhibition IC ₅₀ (18.2 μM). No α -chymotrypsin inhibitory effect.	[45]
	<i>Stereocaulon evolutum</i> Graewe.	In vitro	HCV grown in Huh-7.5.1 human hepatic cell line	Antiviral	Interferes with the lifecycle of hepatitis C virus (HCV), inhibiting only viral entry (IC ₅₀ : 22.3 μM).	[35]
	<i>Parmotrema rampoddense</i> (Nyl.) Hale	In silico In vitro	Docking studies with breast cancer oncoproteins MDA MB-231 and MCF-7 (breast cancer cell lines)	Cytotoxic	Molecular docking studies interaction: Akt > Bax, Bcl-xL and Bcl-2 > Bcl-w proteins. IC ₅₀ (MDA MB-231) = 5.36 μM ; IC ₅₀ (MCF-7) = 7.55 μM .	[49]
	<i>Everniastrum vexans</i> (Zahlbr. ex W.L. Culb. and C.F. Culb.)	In vitro	A549 (human lung cancer cell line)	Cytotoxic	\downarrow Lung cancer cell motility and tumorigenesis by affecting AP-1, Wnt, and STAT signaling and suppressing RhoGTPase activity.	[50]
Atranorin	<i>Stereocaulon caespitosum</i> Redinger	In vitro	SKHep1 and Huh-7 (epithelial carcinoma cell line) SNU-182 (primary cancer cell line)	Cytotoxic	\downarrow Cell growth at 80 $\mu\text{g/mL}$ in all cell lines Cell cycle attenuated. \uparrow Cell death through necrosis. \downarrow Metastatic potential by suppression of cell migration and invasion.	[51]
	-	In vitro	HTB-140 (melanoma cell line)	Cytotoxic	\downarrow Cancer cell proliferation, migration, and actin cytoskeleton organization.	[52]

			DU-145 and PC-3 (prostate cancers) normal human skin fibroblasts PNT2 (prostate epithelial cell line)			
<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl		In vitro	Human lymphocytes- cytochalasin-B blocked micronucleus (CBMN) assay.	Cytotoxic	No significant clastogenic and antiproliferative effects on selected concentrations.	[16]
-		In vitro	A2780 (human ovarian cancer cell line) HT-29 (human colon cancer cell line)	Cytotoxic	Loss in the mitochondrial membrane potential. ↑ caspase-3 activation (only in HT-29 cells) and phosphatidylserine externalization. ↑ ROS/RNS. ↑ PARP, p53, Bcl-2/Bcl-xL, Bax, p38, pp38.	[56]
Atranorin	-	In vitro	A2780 (human ovarian carcinoma) HCT-116 p53+/+ and HCT-116 p53/- (human colon carcinoma) HeLa (human cervix adenocarcinoma) SK-BR-3 (human breast adenocarcinoma) HL-60 (human promyelocytic leukemia) HT-29 (human colon adenocarcinoma) Jurkat (human T cells lymphocyte leukemia) MCF-7 (human breast adenocarcinoma)	Cytotoxic	Cytotoxicity against all cell lines except against HeLa (especially effective against HL-60 cells (50 μM). Clonogenic inhibition ability of all tested tumor cells. Accumulation in S-phase at expense of G1/G0-phase. Lower incidence in p53-deficient cells.	[55]
Atranorin SPION	-	In vitro	GCSCs (gastric cancer stem cells)	Cytotoxic	Inhibition proliferation, invasion, angiogenesis, and tumorigenicity of CD44+/CD24+. ↑ Oxidative stress. ↑ Fe ²⁺ accumulation/ferroptosis. Increase mRNA encoding apoptosis factors, COX-2 levels. Inhibition GCSC markers and GPX4, NCOA4, BRF2, CD98. Downregulation mRNA hm5C modification levels.	[54]
	-	In vivo	NOD-scid mice	Cytotoxic Antitumor	Smaller tumors in weight and volume. Inhibition GPX4 and SLC7A11.	[54]
<i>Bacidia stipata</i> I. M. Lamb.		In vitro	A375 (melanoma cancer cell line)	Cytotoxic	Low inhibition (only high concentrations)	[55]
<i>Parmotrema dilatatum</i> (Vain.) Hale		In vitro	UACC-62 and B16-F10 (melanoma cells) 3T3 (normal cells)	Cytotoxic	IC ₅₀ : 250 μg/mL. Low cytotoxic effects on all the cell lines.	[59]
<i>Bacidia stipata</i> I. M. Lamb.		In vitro	Androgen-sensitive (LNCaP) and androgen-insensitive (DU-145) human prostate cancer cells.	Cytotoxic	Lower activity inhibiting cancer cells only at higher concentrations (25 and 50 μM).	[60]
Atranorin	<i>Ramalina glaucescens</i> Kremp.	In vitro	P388 murine leukemia cell line	Cytotoxic	Moderate activity against (IC ₅₀ of >33 μM).	[53]
	<i>Usnea laevis</i> Nyl.	In vitro	Human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)	Cytotoxic	IC ₅₀ : 286.13 μg/mL. Low cytotoxic effects on macrophages.	[33]
	-	In vitro	Calf thymus DNA	DNA-interacting agents	ATR acts as effective DNA-interacting agent. No inhibitory effect on Topo isomerase I.	[61]
	-	In vitro	Second and third instar larvae of the mosquito <i>Culiseta longiareolata</i>	Larvicidal activity	LC (50) values: 0.52 ppm. LC (90) values: 5.93 ppm.	[39]
	<i>Usnea articulata</i> (L.) Hoffm.	In vitro	Neuro2A (mouse neuroblastoma) cell line	Neuroprotective	Neurotrophic activity (131.73 μm at 5 μM).	[62]

		Ex vivo	Primary neural stem or progenitor cells		Gene expression of BDNF and NGF modulation.	
	<i>Umbilicaria antarctica</i> Frey and I. M. Lamb.	In vitro	Red cell suspension	Photohemolytic	Significant hemolysis in a red cell suspension after irradiation of atranorin with 366 nm light. Higher in presence of nitrogen.	[64]
	<i>Umbilicaria antarctica</i> Frey and I. M. Lamb.	In vitro	Inhibition of 8-MOP-human serum albumin (HSA) photobinding.	Photoprotective	Atranorin (10 mM) and irradiation (360 nm) inhibited photobinding to HSA by 20.1%.	[63]
Atranorin	<i>Parmotrema austrosinense</i> (Zahlbr.) Hale	In vitro	Bacterial strain <i>Lactobacillus casei</i>	Probiotic bacteria	Moderate growth stimulating activity in terms of increased dry matter of biomass (41.1 mg) of <i>L. casei</i> .	[34]
	<i>Thamnolia subuliformis</i> (Ehrh.) W. Culb.	In vitro	Porcine leucocytes Sheep seminal vesicle microsomes	Cytotoxic	Potent 5-lipoxygenase inhibitor (IC ₅₀ = 8.3 μM). Inactive against COX.	[15]
	<i>Thamnolia vermicularis</i> (Sw.) Schaer.	In vitro	Human platelets	Cytotoxic	Weak 12(S)-LOX inhibitor (14.7+/-2.76%).	[66]
Baeomycesic acid	<i>Thamnolia vermicularis</i> (Sw.) Schaer.	In vitro	AGS (stomach cancer cell line) Capan-1, Capan-2 and PANC-1 (pancreas cell lines) HL-60, K-562 and JURKAT (blood cancer cell lines) NCI-H1417 (lung cancer cell line) NIH: OVCAR-3 (ovary cancer line) PC-3 (prostate cancer cell line) T47-D (breast cancer line) WiDr (colorectal cancer cell line)	Cytotoxic	Slight anti-proliferative activity. Selective 5-LOX inhibitor.	[65]
Barbatic acid	<i>Cladonia borealis</i> Steenroos	In vitro	<i>Staphylococcus aureus</i> NEWP0023 <i>Enterococcus faecalis</i> (NEWP0012) <i>Escherichia coli</i> (NEWP 0022)	Antimicrobial	MIC values: <i>S. aureus</i> (NEWP0023) = 31.3 μg/mL; <i>S. aureus</i> (clinic) = 31.3 μg/mL; <i>E. faecalis</i> (NEWP0012) = 7.8 μg/mL; <i>E. faecalis</i> (clinic) = 31.3 μg/mL; <i>E. coli</i> = nt.	[68]
	<i>Cladia longissima</i> (Sw.) Nyl.	In vitro	Adult worms of <i>Schistosoma mansoni</i>	Antiparasitic	Schistosomicidal effect (death, tegumentary damages, and changes in mobility).	[18]
	<i>Cladia longissima</i> (Sw.) Nyl.	In vitro	Adult mollusks of <i>Biomphalaria glabrata</i> Cercariae of <i>Schistosoma mansoni</i>	Antiparasitic Antimolluscal	Molluscicidal activity against <i>B. glabrata</i> at 20 and 25 μg/mL. Schistosomicidal effect against the parasite <i>S. mansoni</i> at the second larval stage (1 μg/mL after 60 min of exposure).	[67]
Barbatic acid	<i>Usnea longissima</i> Ach.	In vitro	A549 (lung cancer cell line)	Cytotoxic	Pro-apoptotic effect (G0/G1 accumulation and poly ADP-ribose polymerase cleavage).	[69]
	<i>Usnea longissima</i> Ach.	In vitro	Tissue culture	Cytotoxic	Slight inhibitor of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus (EBV) activation.	[70]
	<i>Pyrrhosia petiolosa</i> (Christ) Ching.	In silico	With-no-lysine 1 (WNK1) kinase	Diuretic	Weak diuretic potential.	[71]
Diffraactaic acid	<i>Usnea diffracta</i> Vain.	In vivo	Male ddY mice Lipopolysaccharide (LPS)-induced (hyperthermia model) Acetic acid-induced writhing and tail-pressure method (analgesic model)	Analgesic and antipyretic	Hypothermic effect (dose of 200 mg/kg) on normal body temperature. Analgesic effect (dose of 200 mg/kg).	[14]
	<i>Parmelia nepalensis</i> (Taylor) <i>Parmelia tinctorum</i> Despr. Ex Nyl	In vitro	Polymorphonuclear leukocytes	Anti-inflammatory	Inhibition of LTB4 biosynthesis by specific enzyme interaction.	[41]
	<i>Usnea blepharea</i> Motyka	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> ,	Antimicrobial	Antibacterial. Strong inhibition at 750 and 1000 ppm concentration.	[72]

Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i>							
-	In vitro	<i>Fusarium fujokuroi</i>	Antimicrobial	Antifungal. MIC 16×10^{-3} mg/mL. Similar to amphotericin B, isavuconazole, terbafine, voriconazole.	[73]		
<i>Usnea subcavata</i> (Motyka)	In vitro	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Antimicrobial	Anti-tubercular activity. High active compound (MIC value 15.6 µg/mL).	[31]		
<i>Usnea longissima</i> Ach	In vivo	Albino Wistar rats Indomethacin-induced gastric lesions	Antiulcerogenic	Significant gastroprotective effect. ↑ SOD and GPx activities and GSH levels ↓ lipid peroxidation ↓ myeloperoxidase and inducible NOS (iNOS) activities ↑ constitutive NOS (cNOS) activity.	[74]		
-	In vitro	U87MG (glioblastoma multiforme cell line) PRCC cells (neurons from Sprague Dawley® rats)	Cytotoxic	IC ₅₀ value (PRCC) = 122.26 mg/L. IC ₅₀ value (U87MG) = 35.67 mg/L. High antioxidant capacity on PRCC cells (10 mg/L).	[75]		
Diffractaic acid	In vitro	<i>Parmelia nepalensis</i> (Taylor)	HaCaT (human keratinocyte cell line)	Cytotoxic	Inhibition cell growth (IC ₅₀ values of 2.6 mM). No changes on LDH activity, cytostatic effects.		
		<i>Parmelia tinctorum</i> Despr. ex Nyl					
Diffractaic acid	In vitro	<i>Usnea aciculifera</i> Vain.	HeLa (human epithelial carcinoma cell line) NCI-H460 (human lung cancer cell line) MCF-7 (human breast cancer cell line)	Cytotoxic	Strong cytotoxic activity against all cell lines (100 µg/mL).		
		<i>Protousnea magellanica</i> (Mont.) Krog	MCF-7 (breast adenocarcinoma cell line) HeLa (cervix adenocarcinoma cell line) HCT-116 (colon carcinoma cell line)			Cytotoxic	Cytotoxic effects in a concentration-dependent manner (2.5–100 µM). No increase intracellular ROS level. No prevention of oxidative injury induced by t-butylhydroperoxide in HeLa cells.
			-				
Diffractaic acid	In vitro	<i>Usnea longissima</i> Ach	Tissue culture	Cytotoxic	Slight inhibitor of tumor promoter-induced Epstein–Barr virus (EBV) activation. ↑ Caspase-2, Csp-8, Csp-9, and Csp-3 activation. ↑ Strong myeloperoxidase and inducible nitric oxide synthase activities. ↓ SOD activity and total glutathione level.		
		<i>Usnea longissima</i> Ach	Titanium-implanted rabbits			Proapoptotic agent	
Divaricatic acid	In vitro	<i>Evernia mesomorpha</i> Nyl.	Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Streptococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> Fungi: <i>Candida albicans</i>	Antimicrobial	Effective against Gram+ bacteria (MIC values ranging from 7.0 to 64.0 µg/mL) and <i>Candida albicans</i> .		
			-			Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Protozoan: <i>Plasmodium berghei</i> liver stage (LS)	Antimicrobial Antiplasmodial

			parasites, <i>Plasmodium falciparum</i> blood stage (BS) parasites			
	-	In vitro	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Antimicrobial	↓ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence factors expression by inhibiting quorum sensing.	[23]
	<i>Ramalina aspera</i> Räsänen	In vitro	Mollusk <i>Biomphalaria glabrata</i> Cercariae of the helminth <i>Schistosoma mansoni</i>	Molluscicidal and cercaricide	High toxicity against: adult snails (5 µg/mL) and embryos (20 µg/mL after 6 h of exposure) cercariae (10 µg/mL after 30 min of exposure).	[82]
Divaricatic acid	<i>Dirinaria aspera</i> Hasanen	In vitro	UACC-62 and B16-F10 (human and murine melanoma cells) 3T3 normal cells	Cytotoxic	Cytotoxic against both lines (LC ₅₀ 50.2µM (UACC-62) LC ₅₀ 643.7 Mm (B16-F10). More selective against melanoma cells than normal cells.	[59]
	<i>Canoparmelia texana</i>	In vitro	PBMCs (peripheral blood mononuclear cell)	Cytotoxic	No cytotoxicity (IC ₅₀ > 200 µM).	[82]
	<i>Cetraria ornata</i> Müll.Arg.	In vitro	Tissue culture	Cytotoxic	Moderate inhibitor of tumor promoter-induced Epstein–Barr virus (EBV) activation.	[70]
	<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> Gram-negative bacteria: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> Fungi: <i>Candida albicans</i>	Antimicrobial	Inhibition of the growth of all tested microorganisms (MIC values = from 0.98 to 125 µg/mL).	[84]
Evernic acid	<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	In silico	Prediction of toxicity risk based on fragment-based toxicity estimation	Toxicity	No mutagenic, no tumorigenic, no reproductive alterations and no irritant effects.	[84]
	<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	In vitro	<i>Candida albicans</i> biofilms	Antimicrobial	Slow maturation and reduction in biofilms with MBIC ₅₀ ≤ 12.5 µg/mL.	[85]
	<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	In vitro	HeLa (Human epithelial cervical cancer)	Cytotoxic	Strong cytotoxic and antiproliferative effects (25 and 50 µg/mL).	[91]
	<i>Evernia prunastri</i> (L.) <i>Pseudoevernia furfuraceae</i> (L.) Zopf.	In vitro	A549 (human lung cancer cells) HUVEC (umbilical vein endothelial cells)	Cytotoxic	No significant effects in healthy cells. Decrease in proliferation in cancer cells (12.5–100 µg/mL).	[90]
	<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	In vitro	Glioblastoma multiforme cell line: A-172 and T98G cell lines.	Cytotoxic	Reduction A-172 cell viability at 10 µM. Mildly cytotoxic on T98G cell line. Anti-IDO1 (32.8 % inhibition). Anti-COX-2 (50.7%) inhibition. Anti-hyaluronidase activity (IC ₅₀ 600 µg/mL). Weak antioxidant properties (DPPH (750 µg/mL) CUPRAC (250 µg/mL)) (21.2 % SOD and 20 % GPx inhibition). Inhibition of BChE. (85.9 %) No AchE inhibition. BBB Permeability (8.6 × 10 ⁻⁶ (cm/s) at 4 h.	[92]
Evernic acid	<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	In vitro	U373-MG (human glioblastoma astrocytoma cell line) SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line)	Neuroprotective	↑ Cell viability; GSH/GSSG ratio; antioxidant enzymes expression. ↓ ROS; lipid peroxidation; protein carbonyls; Caspase-3 activity; Nrf2 pathway activation.	[87]
	-	In vitro	Primary neurons	Neuroprotective	Suppression/inhibition MPP+ induced: - Apoptosis (↑ Bcl-2/ ↓ Bax/Caspase-3) - Mitochondrial Dysfunction - Astrocyte Activation (GFAP expression) - Oxidative stress (↓ ROS production) - NF-κB Signaling Pathway.	[88]
	-	In vivo	MPTP-induced mouse model C57BL/6 mice Rotarod	Neuroprotective	Attenuation of motor dysfunction Reduction in dopaminergic neuronal death and astroglial activation.	[88]
Evernic acid	<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	In vitro	MM98 (malignant mesothelioma cell line) A431 (vulvar carcinoma cell	Wound healing	No wound closure effects.	[89]

			line) HaCaT (human keratinocyte cell line)			
Isolecanoric acid	<i>Glarea lozoyensis</i>	In vitro	SH-SY5Y (human dopaminergic neuroblastoma cell line) L-BMAA for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model and rotenone for Parkinson's disease (PD) model	Neuroprotective	GSK3β and CK1 inhibition. ↓ Oxidative stress, mitochondrial damage, apoptosis, and cell death.	[93]
	-	In vitro	α-Glucosidase	Antidiabetic	Active against α-glucosidase (85.9% of inhibition; IC ₅₀ value of 350 μM)	[98]
	<i>Umbilicaria ntárctica</i> Frey and I. M. Lamb.	In vitro	PTP1B enzyme activity and kinetic analysis	Antidiabetic Antiobesity	Moderate inhibition PTP1B activity IC ₅₀ 31 μM.	[99]
Lecanoric acid	<i>Melanelia subaurifera</i> (Nyl.) <i>Melanelia fuliginosa</i> (Fr. Ex Duby) Ess	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> . Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> Fungi: <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Mucor. mucedo</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Antimicrobial	Antimicrobial activity against all tested bacteria and fungi with MIC values of 0.5 to 1 mg/mL.	[24]
	<i>Parmelia cetrata</i> Ach.	In vitro	Gram-negative bacteria: <i>Aliivibrio fischeri</i> Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	Antimicrobial Antihelmintic	Antibacterial activity (100% inhibition at 100 μM). Antihelmintic effect (80% mortality at 100 μg/mL).	[4]
	<i>Melanelia subaurifera</i> (Nyl.) <i>Melanelia fuliginosa</i> (Fr. ex Duby) Ess	In vitro	DPPH assay	Antioxidant	Slight DPPH scavenging activity (IC ₅₀ value of 424.5 μg/mL) and reducing power (0.0165 at 125 μg/mL).	[24]
	<i>Parmotrema grayanum</i> (Hue) Hale.	In vitro	Superoxide radical (SOR) Nitric oxide radical DPPH assay	Antioxidant	Good antioxidant activity: SOR assay (IC ₅₀ value = 91.5 μmol), DPPH (IC ₅₀ value = 34 μmol), NOR assay (IC ₅₀ value = 53.5 μmol).	[94]
	<i>Parmotrema stuppeum</i> (Nyl.) Hale	In vitro	Beta-carotene-linoleate model system	Antioxidant	Thirty-six percent of antioxidant activity at 500 μg/ml.	[48]
Lecanoric acid	<i>Hypocnomyce scalaris</i> (Ach. ex. Lilj)	In vitro	Colorectal cancer cells (HCT116 and DLD-1) Human keratinocytes HaCaT cell line	Cytotoxic	Moderate cytotoxic effects against colon HCT116 cells. ↓ Slight Axin2 expression in HCT116 cells.	[95]
	<i>Parmotrema tinctorum</i> (Despr. ex Nyl.) Hale.	In vitro	Hep-2 (human larynx carcinoma cells) MCF7 (human breast carcinoma cells) 786-0 (human kidney carcinoma cells) B16-F10 (murine melanoma cells)	Cytotoxic	Slight activity against all tested cancer cell lines (IC ₅₀ values > 50 μg/mL).	[97]
	<i>Melanelia subaurifera</i> (Nyl.) <i>Melanelia fuliginosa</i> (Fr. ex Duby) Ess	In vitro	Hela (human epithelial carcinoma cells) A549 (human lung carcinoma cells) LS174 (human colon carcinoma cells)	Cytotoxic	Weak cytotoxic activity against Hela cells (IC ₅₀ value of 124 μg/mL) and against A549 and LS174 cells (IC ₅₀ value of 200 μg/mL).	[24]
Lecanoric acid	-	In vitro	HCT-116 (human colon cancer cell line)	Cytotoxic	Inhibition cell colony formation already at 0.03 μg/mL. Induction of a G2 cell cycle block. Arrest of cells in the M phase. Upregulated expression of cyclin B1 and pH3. Inactive CDK1. More cell death in cancer cells than in primary human immune and endothelial cells.	[96]
	-	In vitro	Mitochondrial TrxR from rat lung	Cytotoxic	High inhibitory effect on Thioredoxin reductase (TrxR).	[79]

Methyl evernate	<i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach.	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> . Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> Fungi: <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Antimicrobial	Inhibition against all tested microorganisms. MIC values (from 0.125 to 1 mg/mL).	[24]
	<i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach.	In vitro	DPPH assay Reducing power assay	Antioxidant	Low DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ value of 391.57 µg/mL). Isolated components showed higher reducing power than lichen extracts.	[24]
	<i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach.	In vitro	Hela (human epithelial carcinoma cells) A549 (human lung carcinoma cell line) LS174 (human colon carcinoma cells)	Cytotoxic	IC ₅₀ values of 46.45 µg/mL (Hela cell line), 76.84 µg/mL (A549 cell line), and 161.37 µg/mL (LS174 cell line).	[24]
Olivetoric acid	<i>Pseudevernia furfuracea</i> var. <i>ceratea</i> (Ach.) D. Hawksw.	In vitro	RATECs (rat adipose tissue endothelial cells)	Anti-angiogenic	↓ Proliferation. Disruption of endothelial tube formation. Depolymerization effects on F-actin stress fibers.	[104]
	<i>Pseudevernia furfuracea</i> var. <i>ceratea</i> (Ach.) D. Hawksw.	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> . Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas vulgaris</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> . Fungi: <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. alternata</i> , <i>Gaeumannomyces graminis</i> .	Antimicrobial	Active against all bacteria and yeast except <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>P. syringae</i> . Active against all tested fungi except <i>A. citri</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. niger</i> , and <i>G. graminis</i> .	[100]
	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	In vitro	Cultured human amnion fibroblasts	Antioxidant	↓ Cell viability (IC ₅₀ values of 571.27 mg/mL) <50 mg/L no oxidative stress and genotoxicity.	[101]
	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	In vitro	HLs (cultured human lymphocytes)	Antioxidant	↑ Total antioxidant capacity.	[16]
	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	In vitro	U87MG (glioblastoma multiforme cell line) PRCC cells (neurons from Sprague Dawley® rats)	Cytotoxic	↓ Cell viability (IC ₅₀ values of 125.71 mg/mL, for PRCC cells and 17.55 mg/L for U87MG cells). ↑ 8-OH-dG levels. LDH activity and oxidative DNA damage.	[102]
	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	In vitro	HepG2 (human hepatocellular carcinoma cells)	Cytotoxic	Cytotoxicity with 100–400 mg/L. Upregulation of pro-apoptotic genes (BAK, CASP6, CASP7, CASP8, FADD, FAS, FASLG).	[103]
Perlatolic acid	-	In silico	Microsomal prostaglandin E2 synthase 1	Anti-inflammatory	Potent inhibitor of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 (IC ₅₀ = 0.43 µM).	[106]

	<i>Cetrelia monachorum</i> (Zahlbr.) W.L. Culb. and C.F. Culb.	In vitro In vivo	Stimulated A549 lung epithelial adenocarcinoma cells Stimulated HEK-293 cells Thioglycollate-induced C57BL/6J male murine peritonitis model	Anti-inflammatory	Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 inhibition (IC ₅₀ = 0.4 μM), 5-Lipoxygenase inhibition (IC ₅₀ = 1.8 μM for cell-based assay and IC ₅₀ = 0.4 μM for purified enzyme). Tumor necrosis factor alpha-induced NF-kB (IC ₅₀ = 7 μM). Inhibition of leukocyte recruitment.	[107]
	<i>Stereocaulon sp.</i>	In vitro	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> strains	Antimicrobial	MIC ₉₀ value of 32 μg/mL. Synergic action with gentamicin and antagonism action with levofloxacin.	[105]
	<i>Cladina confusa</i> (Sant.) Follm and Ahti	In vitro	Cultures of peritoneal macrophage cells from mice	Immune modulating	↑ Hydrogen peroxide release (10.48 nmol). Slight NO release activity.	[108]
	<i>Cladonia portentosa</i> (Dufour) Coem.	In vitro Ex vivo	Neuro2A (mouse neuroblastoma) cell line Primary neural stem or progenitor cells	Neuroprotective	Neurotrophic activity (125.34 μm at 0.5 μM). AChE inhibition activity (IC ₅₀ = 6.8 μM). Potent proneurogenic activity. Gene expression of BDNF and NGF modulation. ↑ Acetyl H3 and H4 protein levels.	[63]
Ramalic acid/Obtusatic acid	<i>Ramalina fraxinea</i> (L.) Ach. <i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach.	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> . Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> Fungi: <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> .	Antimicrobial	Inhibition against all tested microorganisms. MIC values (from 0.125 to 1 mg/mL).	[24]
	<i>Ramalina fraxinea</i> (L.) Ach. <i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach.	In vitro	DPPH assay Reducing power assay	Antioxidant	Slight to moderate antioxidant activity (DPPH radical scavenging activity with IC ₅₀ value of 324.61 μg/mL and reducing power of 0.0142 at 125 μg/mL). Isolated components showed higher reducing power than lichen extracts.	[24]
Ramalic acid/Obtusatic acid	-	In vitro	HaCaT (human keratinocyte cell line)	Cytotoxic	No significant inhibitory activity against LTB ₄ production via non-mediation by redox reactions. No cytotoxic activity.	[76]
	<i>Ramalina fraxinea</i> (L.) Ach. <i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach.	In vitro	Hela (human epithelial carcinoma cell line) A549 (human lung carcinoma cell line) LS174 (human colon carcinoma cell line)	Cytotoxic	IC ₅₀ value (Hela) 43.24 μg/mL; IC ₅₀ value (A549) 93.98 μg/mL; IC ₅₀ value (LS174) 74.28 μg/mL.	[24]
	<i>Dirinaria consimilis</i> (Stirt.) D. D.Awasthi	In vivo	STZ-induced type 2 diabetic albino rat model	Antidiabetic	↑ α-glucosidase and α-amylase inhibition. ↓ Plasma glucose levels (44.17%), low-density lipoprotein, total cholesterol, and total glycerides.	[111]
Sekikaic acid	<i>Ramalina roesleri</i> Nyl	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptomyces viridochromogenes</i> , <i>Streptococcus mutans</i> . Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> .	Antimicrobial	Maximum antimicrobial activity against <i>E. coli</i> (78% inhibition), moderate against <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>S. viridochromogenes</i> (60%, 50% and 55% inhibition, respectively), and low against <i>B. subtilis</i> (15% inhibition).	[109]
Sekikaic acid	<i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach	In vitro	Respiratory syncytial virus	Antimicrobial	Potent antiviral action against a recombinant strain rg respiratory syncytial virus (IC ₅₀ 5.69 μg/mL) and respiratory syncytial virus A2 strain (IC ₅₀ 7.73 μg/mL).	[110]

	<i>Ramalina roesleri</i> Nyl	In vitro	DPPH assay	Antioxidant	Good antioxidant activity: DPPH radical assay (IC ₅₀ value = 11.24 µg/mL).	[109]
	<i>Heterodermia obscurata</i> (Nyl.) Trevisan	In vitro	Superoxide radical (SOR) Nitric oxide radical DPPH assay	Antioxidant	Good antioxidant activity: SOR assay (IC ₅₀ value = 82.0 µmol), DPPH (IC ₅₀ value = 32.6 µmol). No nitric oxide radical activity.	[94]
	<i>Dirinaria consimilis</i> (Stirt.) D. D. Awasthi	In vitro	Ferric ion reducing power and hydroxyl radical assay.	Antioxidant	Good antioxidant activity: hydroxyl radical assay (IC ₅₀ value = 41.5 µg/mL) and ferric ion assay (IC ₅₀ value = 42.0 µg/mL).	[33]
	<i>Niebla homalea</i> (Ach.) Rundel and Bowler	In vitro	MCF-7 (human hormone-dependent breast) A2780 (ovarian cancer cell)	Cytotoxic	No antiproliferative activity.	[112]
Squamatic acid	<i>Cladonia uncialis</i> (L.) F. H. Wigg.	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> Gram negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , Fungi: <i>Candida albicans</i>	Antimicrobial	Weak antibacterial activity (MIC = 1250.0 mg/mL against <i>S. aureus</i>).	[113]
	<i>Thamnolia vermicularis</i> (Sw.) Schaer	In vitro	PC-3 (prostate cancer cells)	Cytotoxic	Weak antiproliferative effect.	[114]
Thamnolic acid	<i>Usnea florida</i> (L.) F.H. Wigg	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Micrococcus luteus</i> . Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> . Mycobacteria: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Fungi: <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Alternaria brassicola</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Fusarium solani</i>	Antimicrobial	Antifungal: <i>Alternaria alternate</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> and <i>Sclerotium rolfsii</i> with MIC values of 400, 400, and 200 µg/mL, respectively. Anti-yeast: <i>Candida krusei</i> with MIC value of 400 µg/mL. Antibacterial: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , and <i>Proteus vulgaris</i> with MIC value of 400 µg/mL and <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Micrococcus luteus</i> with MIC value of 200 µg/mL.	[115]
	<i>Thamnolia vermicularis</i> (Sw.) Schaer.	In vitro	PC-3 (prostate cancer cells)	Cytotoxic	Weak antiproliferative effect.	[114]

2.2. Tridepsides

The biological activities and tridepside chemical structures have been gathered in Table 2 and Figure 2.

2.2.1. Gyrophoric Acid

Gyrophoric acid is a potent antimicrobial agent against a wide range of bacteria and fungi, with MIC values from 0.019 mg/mL for *B. subtilis* [117]. Moreover, the antimicrobial activity for this tridepside was also demonstrated by Candan et al., highlighting its effect against the bacteria *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* and the fungi *Candida albicans* and *Candida glabrata* [118]. Furthermore, gyrophoric acid showed larvicidal activity against the second and third instar larvae of the mosquito *Culiseta longiareolata*, with LC (50) and LC (90) values of 0.41 ppm and 1.93 ppm, respectively [39].

Gyrophoric acid has also demonstrated potent antioxidant properties. Hence, the IC₅₀ values for DPPH and superoxide anion scavenging were 105.7 µg/mL and 196.6 µg/mL, respectively, and its reducing power value was 1.32 at 1000 µg/mL [117].

Gyrophoric acid has been investigated for its role as a cytotoxic agent against different cancer cells. This compound reduced the cell viability of human ovarian carcinoma (A2780 cells), human promyelocytic leukemia (HL-60 cells), human T cell lymphocyte leukemia (Jurkat cells), malignant melanoma (Fem-x cells), and chronic myelogenous leukemia (K562 cells) [55,117]. In particular, the studies on A2780 cancer cells revealed that gyrophoric acid caused the accumulation of these cells in the G2/M phase at the expense of the G0/G1 phase. Moreover, this compound reduced the percentage of Fem-x cells and K562 cells in the G0/G1 and S-G2/M phases of the cell cycle [117]. Furthermore, this secondary metabolite inhibited the clonogenic ability of breast SK-BR-3 cancer cells [55]. Additionally, gyrophoric acid caused the cell death of human cervix carcinoma (HeLa) by oxidative stress and apoptosis pathways, as evidenced in the ROS overproduction, DNA oxidative damage, and caspase-3 activation [17]. A study on lichen compounds that interact with DNA revealed that gyrophoric acid was able to inhibit topoisomerase I activity at a concentration of 25 μM [61]. However, this tridepside has resulted in being inactive as an apoptotic agent, as revealed by its ineffectiveness as a caspase-3 activator on hepatocytes [119], and it has low activity against A375 melanoma cancer cell line even at the highest concentrations tested [58].

Other studies, based on the antiproliferative capacity of gyrophoric acid, have investigated its effect on skin cells for therapeutic purposes for psoriasis. This tridepside significantly inhibited the growth of the human keratinocyte HaCaT cell line, with the IC_{50} value of 1.7 μM by a cytostatic mechanism [76]. Moreover, gyrophoric acid exerted a photoprotective effect on HaCaT cells with a sun protection factor (SPF) of (SPF > 5) [120,121]. Anti-aging effects were also investigated on ultraviolet A (UVA)-treated dermal fibroblasts, showing upregulated mRNA levels of COL1A1/COL3A1/SOD2 genes and type I collagen protein levels [122].

Gyrophoric acid has been shown to have antihypertensive properties by acting as an angiotensin II type-1 receptor (AT1) antagonist by interacting with residues ARG167, TRP84, and VAL108 [123]. Moreover, gyrophoric acid has been identified as a non-competitive PTP1B inhibitor, with an IC_{50} value of 3.6 μM , making it a drug candidate for type 2 diabetes and obesity [99]. Finally, gyrophoric acid is of interest for its properties as a healing agent, especially when combined with usnic acid, that promotes tissue regeneration [89].

2.2.2. Tenuiorin Acid

Tenuiorin acid showed weak to moderate antiproliferative action against the human cancer breast T-47D cell line (ED_{50} 152.6 μM), the human cancer colon WIDR cell line (ED_{50} 95.9 μM), and the human cancer pancreas PANC-1 cell line (ED_{50} 87.9 μM), which seems to be related to its ability to inhibit 5-lipoxygenase activity [22]. Using a Thioflavin T (ThT) fluorescence assay, tenuiorin acid was a potent neuroprotective agent which acted as a tau inhibitor (IC_{50} 100 μM) [124].

2.2.3. Trivarinic Acid

The tridepside trivarinic acid has resulted in being a promising antidiabetic agent. *In silico* and *in vitro* studies revealed that this compound inhibited protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) by blocking its active site with an IC_{50} value of 173 nM. Moreover, this tridepside improved the insulin-stimulated glucose uptake through the insulin receptor (IR)/IRS/Akt/GLUT2 pathway in the human liver HepG2 cancer cell line. Furthermore, *in vivo* studies demonstrated the beneficial effects of trivarinic acid as an antidiabetic agent at doses of 5 mg/kg and 50 mg/kg through significantly improving lipid and glycemic profiles [125,126].

In another study, trivarinic acid exerted a potent anti-inflammatory action by significantly inhibiting human leukocyte elastase (IC_{50} value of 1.8 μM) [127].

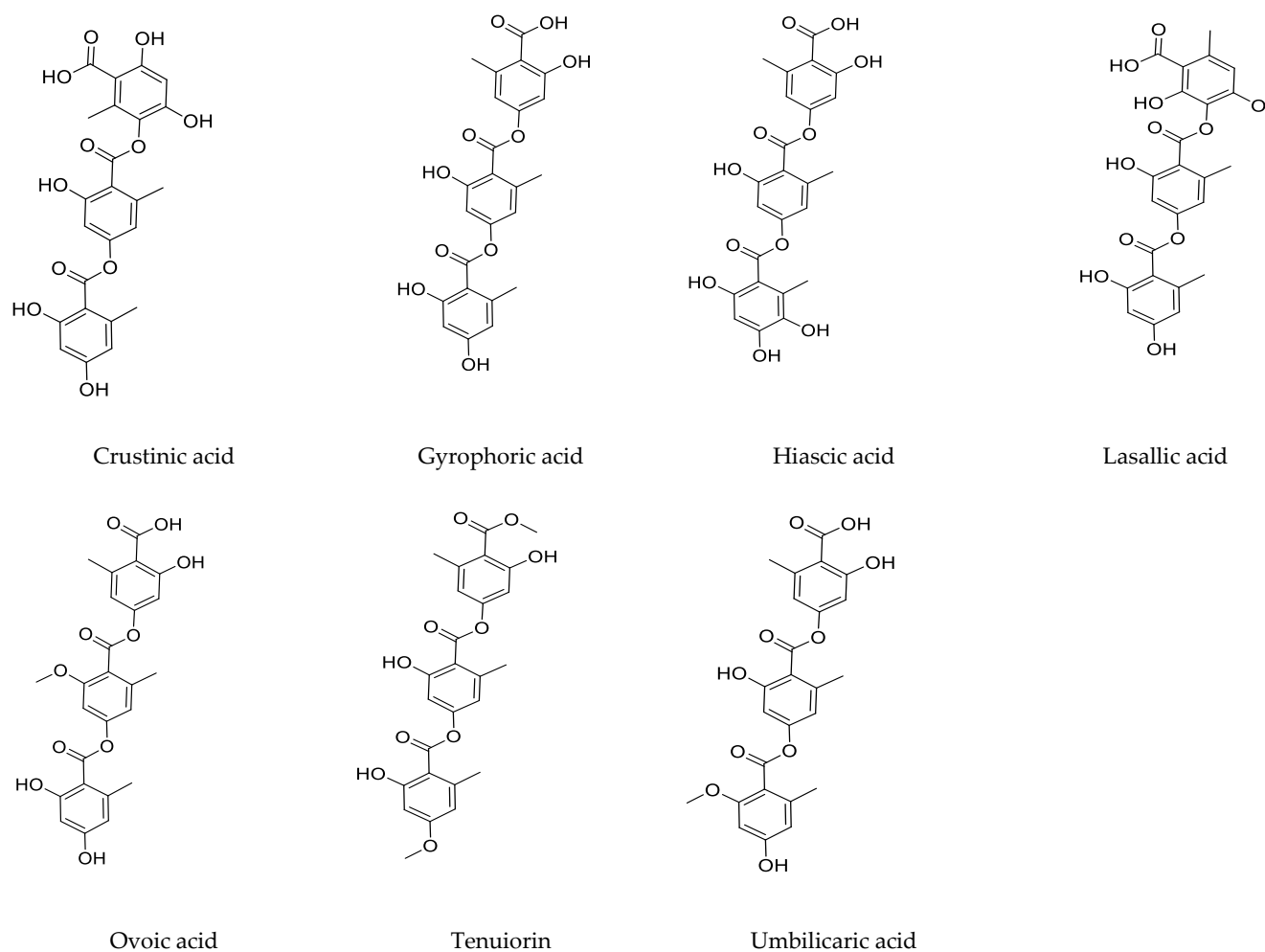


Figure 2. Chemical structure of tridepsides from lichens.

Table 2. Pharmacological activity of lichen tridepsides.

Tridepside	Botanical Origin	Type of Study	Experimental Model	Activities	Results	References
	<i>Umbilicaria antarctica</i> Frey and I. M. Lamb	In vitro	PTP1B enzyme activity and kinetic analysis	Antidiabetic Antiobesity	Inhibition PTP1B activity IC ₅₀ : 3.6 μM in a non-competitive manner.	[99]
	<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach.	In vitro In silico	Angiotensin II type-1 receptor (AT1) interaction	Antihypertensive	AT1 antagonist. Calcium influx assay (IC ₅₀ 29.76 μM).	[123]
Gyrophoric acid	<i>Acarospora fuscata</i> (Nyl.) Th.Fr.	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> . Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Fungi: <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Penicillium purpurescens</i> and <i>Penicillium verrucosum</i> .	Antimicrobial	Minimum inhibitory concentration values ranging from 0.019 to 1.25 mg/mL.	[117]

	<i>Xanthoparmelia pokornyii</i> (Körb.) O.Blanco, A.Crespo, Elix, D.Hawksw. and Lumbsch	In vitro	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Streptococcus faecalis</i> . Gram-negative bacteria: <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> . Fungi: <i>Candida albicans</i> and <i>Candida glabrata</i> .	Antimicrobial	Active against some bacteria and fungi (<i>A. hydrophila</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>C. albicans</i> and <i>C. glabrata</i>)	[118]
	<i>Acarospora fuscata</i> (Nyl.) Th.Fr.	In vitro	DPPH Superoxide anion radical-scavenging reducing power	Antioxidant	DPPH (IC ₅₀ 105.75 µg/mL). Superoxide anion radical (IC ₅₀ 196.62 µg/mL). Reducing power (1.32 at 1000 µg/mL, 1.12 at 500 µg/mL, 0.71 at 250 µg/mL, 0.39 at 125 µg/mL, and 0.20 at 62.5 µg/mL).	[117]
	<i>Parmelia nepalensis</i> Tayl. <i>Parmelia tinctorum</i> Nyl.	In vitro	HaCaT (human keratinocyte cell line)	Antiproliferative	Antiproliferative activity (IC ₅₀ value of 1.7 µM). Cytostatic mechanism.	[76]
Gyrophoric acid	<i>Umbilicaria hirsuta</i> (Sw. ex Westr.) Hoffm	In vitro	A2780 (human ovarian carcinoma) HCT-116 p53+/+ and HCT-116 p53-/- (human colon carcinoma) HeLa (human cervix adenocarcinoma) SK-BR-3 (human breast adenocarcinoma) HL-60 (human promyelocytic leukemia) HT-29 (human colon adenocarcinoma) Jurkat (Human T cells lymphocyte leukemia) MCF-7 (Human breast adenocarcinoma)	Cytotoxic	Effective against A2780, HL-60, and Jurkat cells. Clonogenic ability inhibition of SK-BR-3 cells. A2780 cells accumulation in S-phase at expense of G1/G0-phase.	[55]
Gyrophoric acid	<i>Umbilicaria hirsuta</i> (Sw. ex Westr.) Hoffm	In vitro	HeLa (human cervix carcinoma)	Cytotoxic	Oxidative stress pathway: ↑ ROS level, DNA oxidation and activity changes of stress/survival proteins as p38MAPK, Erk1/2 and Akt. Apoptosis pathway: ↑ caspase-3 activation, PARP cleavage, PS externalization, and cell cycle changes.	[17]
Gyrophoric acid	<i>Acarospora fuscata</i> (Nyl.) Th.Fr.	In vitro	A549 (human lung carcinoma cell line), Fem-x (malignant melanoma cell line), K562 (chronic myelogenous leukemia cell line) LS174 (human colon carcinoma cell line)	Cytotoxic	Weak activity against A549 and LS174 (IC ₅₀ 151.51 and 151.65 µg/mL). Moderate cytotoxic effect against Fem-x and K562 cells (IC ₅₀ 64.01 and 78.45 µg/mL). Apoptosis of sub-G1 phase in malignant cells.	[117]

					Reduction percentage of cells in G0/G1 and S-G2/Mphases of the cell cycle.	
<i>Ochrolechia deceptionis</i> Hue.	In vitro	A375 (melanoma cancer cell line)	Cytotoxic		Low activity.	[58]
-	In vitro	Primary cultures of rat hepatocytes	Cytotoxic		Inactive.	[119]
<i>Umbilicaria hirsuta</i> (Sw. ex Westr.) Hoffm	In vitro	Calf thymus DNA	DNA-interacting agents		Topoisomerase I inhibition (25 µM).	[61]
-	In vitro	Second and third instar larvae of the mosquito <i>Culiseta longiareolata</i>	Larvicidal activity		LC (50) values: 0.41 ppm, LC (90) values: 1.93 ppm.	[39]
<i>Xanthoparmelia pokornyii</i> (Körb.) O.Blanco, A.Crespo, Elix, D.Hawksw. and Lumbsch	In vitro	HaCaT (human keratinocyte cell line)	Photoprotective		Prevention of cytotoxic, apoptotic, and cytoskeleton alternative effects of 2.5 J/cm ² UVB.	[121]
<i>Lasallia pustulata</i> (L.) Méra	In vitro	DPPH assay NBT assay Human keratinocytes HaCaT cell line	Photoprotective		DPPH (IC ₅₀ 25 µg/mL) Good PF-UVA candidate (SPF > 5).	[120]
Gyrophoric acid	-	In vitro (UVA)-treated dermal fibroblasts	Photoprotective		Anti-aging effects. Upregulated mRNA levels of COL1A1/COL3A1/SOD2 genes and type I collagen protein levels. ↓ MMP1 mRNA and protein expression levels.	[122]
<i>Lasallia pustulata</i> (L.) Méra	In vitro	MM98 (Malignant mesothelioma cell line) A431 (vulvar carcinoma cell line) HaCaT (human keratinocyte cell line)	Wound healing		Strong wound closure effects. Better results combined with (+)-usnic acid.	[89]
Tenuiorin acid	<i>Peltigera leucophlebia</i> (Nyl.) Gyeln.	In vitro Calcium-stimulated porcine leucocytes. T-47D (human cancer breast cell line) WIDR (human cancer colon cell line) PANC-1 (human cancer pancreas cell line)	Antiproliferative		Moderate 5-lipoxygenase inhibition (IC ₅₀ values of 41.6 µM). Moderate/weak antiproliferative effects on PANC-1 and WIDR cells (ED ₅₀ 87.9 and 95.9 µM, respectively) and weak activity against T-47D cells (ED ₅₀ 152.6 µM).	[22]
<i>Umbilicaria antarctica</i> Frey and I. M. Lamb	In vitro In silico	ThT fluorescence assay Docking studies	Neuroprotective		Tau inhibitor (IC ₅₀ 100 µM).	[124]
-	In silico	Docking and ITC studies	Antidiabetic		PTP1b inhibition by blocking its active site.	[126]
Trivaric acid	-	In vitro PTP1b inhibition assay Human liver HepG2 cancer cell line	Antidiabetic		↑ PTP1B inhibitory activity. IR/IRS/Akt/GLUT2 pathway stimulation. ↑ Glucose consumption	[125]

Triventric acid	-	In vivo	Diabetic mice model	Antidiabetic	↓ insulin resistance ↓ leptin resistance. Improve lipid profile and weight control.	[125]
	-	In vitro	Human leukocyte elastase assay	Anti-inflammatory	Potent human leukocyte elastase inhibitory activity (IC ₅₀ of 1.8 μM).	[127]

3. Conclusions and Prospects

Most of the works on the pharmacological activity of depsides and tridepsides have been published in the last 10 years, which shows the growing therapeutic interest in the secondary metabolites of lichens. Most of these works are in vitro studies, with the occasional in silico and in vivo studies.

Lichens have been investigated for their ability to inhibit bacterial growth. The most common Gram-positive bacteria genera studied on depsides and tridepsides are *Bacillus* and *Staphylococcus*, followed by *Mycobacterium*, *Streptococcus*, and *Enterococcus*. Among the Gram-negative bacteria, the genera *Escherichia* and *Proteus* were the most investigated. In general terms, depsides and tridepsides showed weak to moderate antimicrobial activity, being more potent against Gram-positive bacteria. In addition, the antifungal activity of several of these compounds (e.g., atranorin, divaricatic acid, gyrophoric acid, lecanoric acid, and methyl evernate) has mainly been studied against *Candida* spp. Moreover, some depsides displayed good antiparasitic activity against *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma mansoni*.

Moreover, antioxidant activity has also been widely investigated using different in vitro techniques, such as DPPH assay, hydroxyl radical scavenging activity, superoxide radical scavenging activity, and reducing power assay. Depsides and tridepsides have a phenolic structure that provides antioxidant properties. The compounds with the greatest capacity to scavenge free radicals are sekikaic acid and atranorin.

The cytotoxic activity of depsides and tridepsides has been extensively investigated in in vitro studies. The mechanisms involved in the cytotoxicity of these compounds imply oxidative stress induction (ROS overproduction), apoptosis induction (caspase-3 activation, Bcl2/Bax signaling pathway), cell-cycle arrest, and 5-lipoxygenase antagonist therapy.

Despite the interesting activities that have been compiled in this review, the information seems to stop after the in vitro assays with diverse cell lines. Only a few studies have continued with the in vivo model. The great variety of activities indicate low specificity, which must be deepened with regard to structure–activity studies and toxicological studies. Preclinical and clinical studies should focus on identifying the molecular targets for the action and the nontoxic doses in humans. Furthermore, there are also several compounds for which there is no study of pharmacological activity, such as hiassic acid, lasalic acid, ovoic acid, crustinic acid, and hypothamnolic acid, all being potential metabolites to be investigated. On the other hand, new technology advances will allow the improvement of growing yields and compound extraction, solving the current problem that limits the study with these interesting compounds

Author Contributions: Conceptualization, I.U.-V., E.G.-B. and M.P.G.-S.; methodology, I.U.-V.; investigation, I.U.-V.; formal analysis, I.U.-V. and E.G.-B.; data curation, I.U.-V. and E.G.-B.; writing—original draft preparation, I.U.-V. and E.G.-B.; validation, E.G.-B.; writing—review and editing, P.K.D. and M.P.G.-S.; supervision, E.G.-B. and M.P.G.-S.; project administration, P.K.D. and M.P.G.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financed by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (PID2019-105312GB-I00) and the Santander-University Complutense of Madrid (PR87/19-22637). I.U.V was supported by a grant CT42/18-CT43/18 from Complutense University of Madrid for predoctoral research.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Aschenbrenner, I.A.; Cernava, T.; Berg, G.; Grube, M. Understanding Microbial Multi-Species Symbioses. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00180>.
2. Calcott, M.J.; Ackerley, D.F.; Knight, A.; Keyzers, R.A.; Owen, J.G. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 1730–1760. <https://doi.org/10.1039/c7cs00431a>.
3. Grimm, M.; Grube, M.; Schiefelbein, U.; Zühlke, D.; Bernhardt, J.; Riedel, K. The Lichens' Microbiota, Still a Mystery? *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 623839. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.623839>.
4. Nugraha, A.S.; Untari, L.F.; Laub, A.; Porzel, A.; Franke, K.; Wessjohann, L.A. Anthelmintic and antimicrobial activities of three new depsides and ten known depsides and phenols from Indonesian lichen: *Parmelia cetrata* Ach. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *35*, 5001–5010. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1761361>.
5. Adenubi, O.T.; Famuyide, I.M.; McGaw, L.J.; Eloff, J.N. Lichens: An update on their ethnopharmacological uses and potential as sources of drug leads. *J. Ethnopharmacol.* **2022**, *298*, 115657. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115657>.
6. Shukla, V.; Joshi, G.P.; Rawat, M.S.M. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: A review. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 303–314. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9189-6>.
7. Popovici, V.; Matei, E.; Cozaru, G.C.; Bucur, L.; Gîrd, C.E.; Schröder, V.; Ozon, E.A.; Karamelas, O.; Musuc, A.M.; Atkinson, I.; et al. Evaluation of *Usnea barbata* (L.) Weber ex F.H. Wigg Extract in Canola Oil Loaded in Bioadhesive Oral Films for Potential Applications in Oral Cavity Infections and Malignancy. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1601. <https://doi.org/10.3390/antiox11081601>.
8. Hamida, R.S.; Ali, M.A.; Abdelmeguid, N.E.; Al-Zaban, M.I.; Baz, L.; Bin-Meferij, M.M. Lichens—A Potential Source for Nanoparticles Fabrication: A Review on Nanoparticles Biosynthesis and Their Prospective Applications. *J. Fungi* **2021**, *7*, 291. <https://doi.org/10.3390/jof7040291>.
9. Yang, Z.; Hu, Y.; Yue, P.; Li, H.; Wu, Y.; Hao, X.; Peng, F. Structure, stability, antioxidant activity, and controlled-release of selenium nanoparticles decorated with lichenan from *Usnea longissima*. *Carbohydr. Polym.* **2023**, *299*, 120219. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120219>.
10. Alavi, M.; Karimi, N.; Valadbeigi, T. Antibacterial, Antibiofilm, Antiquorum Sensing, Antimotility, and Antioxidant Activities of Green Fabricated Ag, Cu, TiO₂, ZnO, and Fe₃O₄ NPs via *Protoparmeliopsis muralis* Lichen Aqueous Extract against Multi-Drug-Resistant Bacteria. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 4228–4243. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b00274>.
11. Baláž, M.; Goga, M.; Hegedüs, M.; Daneu, N.; Kováčová, M.; Tkáčiková, L.; Balážová, L.; Bačkor, M. Biomechanicochemical Solid-State Synthesis of Silver Nanoparticles with Antibacterial Activity Using Lichens. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 13945–13955. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03211>.
12. Olivier-Jimenez, D.; Chollet-Krugler, M.; Rondeau, D.; Beniddir, M.A.; Ferron, S.; Delhay, T.; Allard, P.M.; Wolfender, J.L.; Sipman, H.J.M.; Lücking, R.; et al. A database of high-resolution MS/MS spectra for lichen metabolites. *Sci. Data* **2019**, *28*, 294. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0305-1>.
13. Stocker-Wörgötter, E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: Culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 188–200. <https://doi.org/10.1039/b606983p>.
14. Okuyama, E.; Umeyama, K.; Yamazaki, M.; Kinoshita, Y.; Yamamoto, Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med.* **1995**, *61*, 113–115. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958027>.
15. Ingólfssdóttir, K.; Wiedemann, B.; Birgisdóttir, M.; Nenninger, A.; Jónsdóttir, S.; Wagner, H. Inhibitory effects of baeomycesic acid from the lichen *Thamnomia subuliformis* on 5-lipoxygenase in vitro. *Phytomedicine* **1997**, *4*, 125–128. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(97\)80056-6](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(97)80056-6).
16. Emsen, B.; Togar, B.; Turkez, H.; Aslan, A. Effects of two lichen acids isolated from *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf in cultured human lymphocytes. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **2018**, *73*, 303–312. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0209>.
17. Goga, M.; Kello, M.; Vilkova, M.; Petrova, K.; Backor, M.; Adlassnig, W.; Lang, I. Oxidative stress mediated by gyrophoric acid from the lichen *Umbilicaria hirsuta* affected apoptosis and stress/survival pathways in HeLa cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 221. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2631-4>.
18. Silva, H.A.M.F.; Aires, A.L.; Soares, C.L.R.; Sá, J.L.F.; Martins, M.C.B.; Albuquerque, M.C.P.A.; Silva, T.G.; Brayner, F.A.; Alves, L.C.; Melo, A.M.M.A.; et al. Barbatic acid from *Cladia aggregata* (lichen): Cytotoxicity and in vitro schistosomicidal evaluation and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Toxicol. In Vitro* **2020**, *65*, 104771. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104771>.
19. Karunaratne, V.; Bombuwela, K.; Kathirgamanathar, S.; Thadhani, V.M. Lichens: A chemically important biota. *J. Natl. Sci. Found. Sri Lanka* **2005**, *33*, 169–186.
20. Lücking, R.; Leavitt, S.D.; Hawksworth, D.L. Species in lichen-forming fungi: Balancing between conceptual and practical considerations, and between phenotype and phylogenomics. *Fungal Divers.* **2021**, *109*, 99–154. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00477-7>.
21. Singh, G.; Armaleo, D.; Dal Grande, F.; Schmitt, I. Depside and Depsidone Synthesis in Lichenized Fungi Comes into Focus through a Genome-Wide Comparison of the Olivetoric Acid and Physodic Acid Chemotypes of *Pseudevernia furfuracea*. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1445. <https://doi.org/10.3390/biom11101445>.

22. Ingólfssdóttir, K.; Gudmundsdóttir, G.F.; Ogmundsdóttir, H.M.; Paulus, K.; Haraldsdóttir, S.; Kristinsson, H.; Bauer, R. Effects of tenuiorin and methyl orsellinate from the lichen *Peltigera leucophlebia* on 5-/15-lipoxygenases and proliferation of malignant cell lines in vitro. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 654–658. <https://doi.org/10.1078/094471102321616481>.
23. Gökalsın, B.; Sesal, N.C. Lichen secondary metabolite evermic acid as potential quorum sensing inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *32*, 150. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2105-5>.
24. Ristic, S.; Rankovic, B.; Kosanić, M.; Stamenkovic, S.; Stanojković, T.; Sovrlić, M.; Manojlović, N. Biopharmaceutical Potential of Two Ramalina Lichens and their Metabolites. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17*, 651–658. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160401144825>.
25. Nguyen, K.H.; Chollet-Krugler, M.; Gouault, N.; Tomasi, S. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1490–1508. <https://doi.org/10.1039/c3np70064j>.
26. Solárová, Z.; Liskova, A.; Samec, M.; Kubatka, P.; Büsselberg, D.; Solár, P. Anticancer Potential of Lichens' Secondary Metabolites. *Biomolecules* **2020**, *10*, 87. <https://doi.org/10.3390/biom10010087>.
27. Yilmaz, M.; Türk, A.O.; Tay, T.; Kivanç, M. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **2004**, *59*, 249–254. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-3-423>.
28. Pompilio, A.; Pomponio, S.; Di Vincenzo, V.; Crocetta, V.; Nicoletti, M.; Piovano, M.; Garbarino, J.A.; Di Bonaventura, G. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. *Future Microbiol.* **2013**, *8*, 281–292. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.142>.
29. Wang, X.N.; Yu, W.T.; Lou, H.X. Antifungal constituents from the Chinese moss *Homalia trichomanoides*. *Chem. Biodivers.* **2005**, *2*, 139–145. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200490165>.
30. Goel, M.; Dureja, P.; Rani, A.; Uniyal, P.L.; Laatsch, H. Isolation, characterization and antifungal activity of major constituents of the Himalayan lichen *Parmelia reticulata* Tayl. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2299–2307. <https://doi.org/10.1021/jf1049613>.
31. Honda, N.K.; Pavan, F.R.; Coelho, R.G.; de Andrade Leite, S.R.; Micheletti, A.C.; Lopes, T.I.; Misutsu, M.Y.; Beatriz, A.; Brum, R.L.; Leite, C.Q. Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 328–332. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.07.018>.
32. Ingólfssdóttir, K.; Chung, G.A.; Skúlason, V.G.; Gissurarson, S.R.; Vilhelmsdóttir, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**, *6*, 141–144. [https://doi.org/10.1016/s0928-0987\(97\)00078-x](https://doi.org/10.1016/s0928-0987(97)00078-x).
33. Tatipamula, V.B.; Annam, S.S.P. Antimycobacterial activity of acetone extract and isolated metabolites from folklore medicinal lichen *Usnea laevis* Nyl. against drug-sensitive and multidrug-resistant tuberculosis strains. *J. Ethnopharmacol.* **2022**, *282*, 114641. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114641>.
34. Gaikwad, S.; Verma, N.; Sharma, B.O.; Behera, B.C. Growth promoting effects of some lichen metabolites on probiotic bacteria. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 2624–2631. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0785-x>.
35. Vu, T.H.; Le Lamer, A.C.; Lalli, C.; Boustie, J.; Samson, M.; Lohézic-Le Dévéhat, F.; Le Seyec, J. Depsides: Lichen metabolites active against hepatitis C virus. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120405>.
36. Zofou, D.; Kengne, A.B.; Tene, M.; Ngemenya, M.N.; Tane, P.; Titanji, V.P. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of crude extracts and compounds from the stem bark of *Kigelia africana* (Lam.) Benth (Bignoniaceae). *Parasitol. Res.* **2011**, *108*, 1383–1390. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2363-y>.
37. Zofou, D.; Tene, M.; Tane, P.; Titanji, V.P. Antimalarial drug interactions of compounds isolated from *Kigelia africana* (Bignoniaceae) and their synergism with artemether, against the multidrug-resistant W2mef *Plasmodium falciparum* strain. *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 539–544. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2519-9>.
38. Beshbishy, A.M.; Batiha, G.E.; Alkazmi, L.; Nadwa, E.; Rashwan, E.; Abdeen, A.; Yokoyama, N.; Igarashi, I. Therapeutic Effects of Atranorin towards the Proliferation of *Babesia* and *Theileria* Parasites. *Pathogens* **2020**, *9*, 127. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020127>.
39. Cetin, H.; Tufan-Cetin, O.; Turk, A.O.; Tay, T.; Candan, M.; Yanikoglu, A.; Sumbul, H. Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae). *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 350–355. <https://doi.org/10.1080/14786411003774296>.
40. Bugni, T.S.; Andjelic, C.D.; Pole, A.R.; Rai, P.; Ireland, C.M.; Barrows, L.R. Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia* **2009**, *80*, 270–273. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.03.003>.
41. Kumar, K.C.; Müller, K. Lichen metabolites. 1. Inhibitory action against leukotriene B₄ biosynthesis by a non-redox mechanism. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 817–820. <https://doi.org/10.1021/np9803777>.
42. Melo, M.G.; Araújo, A.A.; Rocha, C.P.; Almeida, E.M.; Siqueira, R.e.S.; Bonjardim, L.R.; Quintans, L.J. Purification, physicochemical properties, thermal analysis and antinociceptive effect of atranorin extracted from *Cladonia kalbii*. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 1977–1980. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1977>.
43. Siqueira, R.S.; Bonjardim, L.R.; Araújo, A.A.; Araújo, B.E.; Melo, M.G.; Oliveira, M.G.; Gelain, D.P.; Silva, F.A.; DeSantana, J.M.; Albuquerque-Júnior, R.L.; et al. Antinociceptive activity of atranorin in mice orofacial nociception tests. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **2010**, *65*, 551–561. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-9-1004>.
44. Duong, T.H.; Paramita Devi, A.; Tran, N.M.; Phan, H.V.; Huynh, N.V.; Sichaem, J.; Tran, H.D.; Alam, M.; Nguyen, T.P.; Nguyen, H.H.; et al. Synthesis, α -glucosidase inhibition, and molecular docking studies of novel N-substituted hydrazide derivatives of atranorin as antidiabetic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127359. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127359>.

45. Ramsay, K.S.; Wafo, P.; Ali, Z.; Khan, A.; Oluyemisi, O.O.; Marasini, B.P.; Khan, I.A.; Bonaventure, N.T.; Choudhary, M.I.; Attar-Rahman. Chemical constituents of *Stereospermum acuminatissimum* and their urease and α -chymotrypsin inhibitions. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.10.014>.
46. Papadopoulou, P.; Tzakou, O.; Vagias, C.; Kefalas, P.; Roussis, V. Beta-orcinol metabolites from the lichen *Hypotrachyna revoluta*. *Molecules* **2007**, *12*, 997–1005. <https://doi.org/10.3390/12050997>.
47. Melo, M.G.; dos Santos, J.P.; Serafini, M.R.; Caregnato, F.F.; Pasquali, M.A.; Rabelo, T.K.; da Rocha, R.F.; Quintans, L.; Araújo, A.A.; da Silva, F.A.; et al. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicol. In Vitro* **2011**, *25*, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.11.014>.
48. Jayaprakasha, G.K.; Rao, L.J. Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **2000**, *55*, 1018–1022. <https://doi.org/10.1515/znc-2000-11-1227>.
49. Harikrishnan, A.; Veena, V.; Lakshmi, B.; Shanmugavalli, R.; Theres, S.; Prashantha, C.N.; Shah, T.; Oshin, K.; Togam, R.; Nandi, S. Atranorin, an antimicrobial metabolite from lichen *Parmotrema rampoddense* exhibited in vitro anti-breast cancer activity through interaction with Akt activity. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, *39*, 1248–1258. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1734482>.
50. Zhou, R.; Yang, Y.; Park, S.Y.; Nguyen, T.T.; Seo, Y.W.; Lee, K.H.; Lee, J.H.; Kim, K.K.; Hur, J.S.; Kim, H. The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility and tumorigenesis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8136. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08225-1>.
51. Jeon, Y.J.; Kim, S.; Kim, J.H.; Youn, U.J.; Suh, S.S. The Comprehensive Roles of Atranorin, A Secondary Metabolite from the Antarctic Lichen *Stereocaulon caespitosum*, in HCC Tumorigenesis. *Molecules* **2019**, *24*, 1414. <https://doi.org/10.3390/molecules24071414>.
52. Galanty, A.; Koczurkiewicz, P.; Wnuk, D.; Paw, M.; Karnas, E.; Podolak, I.; Węgrzyn, M.; Borusiewicz, M.; Madeja, Z.; Czyż, J.; et al. Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and melanoma cancer cells. *Toxicol. In Vitro* **2017**, *40*, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.008>.
53. Dias, D.A.; Urban, S. Phytochemical investigation of the Australian lichens *Ramalina glaucescens* and *Xanthoria parietina*. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 959–964.
54. Ni, Z.; Nie, X.; Zhang, H.; Wang, L.; Geng, Z.; Du, X.; Qian, H.; Liu, W.; Liu, T. Atranorin driven by nano materials SPION lead to ferroptosis of gastric cancer stem cells by weakening the mRNA 5-hydroxymethylcytidine modification of the Xc-/GPX4 axis and its expression. *Int. J. Med. Sci.* **2022**, *19*, 1680–1694. <https://doi.org/10.7150/ijms.73701>.
55. Bačkorová, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Jendželovský, R.; Fedoročko, P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol. In Vitro* **2011**, *25*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.004>.
56. Bačkorová, M.; Jendželovský, R.; Kello, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Fedoročko, P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.017>.
57. Solár, P.; Hřčková, G.; Koptašíková, L.; Velebný, S.; Solárová, Z.; Bačkor, M. Murine breast carcinoma 4T1 cells are more sensitive to atranorin than normal epithelial NMuMG cells in vitro: Anticancer and hepatoprotective effects of atranorin in vivo. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *250*, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.012>.
58. Cardile, V.; Graziano, A.C.E.; Avola, R.; Piovano, M.; Russo, A. Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *263*, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.12.007>.
59. Brandão, L.F.; Alcantara, G.B.; Matos, M.e.F.; Bogo, D.; Freitas, D.o.S.; Oyama, N.M.; Honda, N.K. Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 176–183. <https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00739>.
60. Russo, A.; Caggia, S.; Piovano, M.; Garbarino, J.; Cardile, V. Effect of vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: Role of Hsp70 protein. *Chem.-Biol. Interact.* **2012**, *195*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.10.005>.
61. Plsíková, J.; Stepankova, J.; Kasparkova, J.; Brabec, V.; Backor, M.; Kozurkova, M. Lichen secondary metabolites as DNA-interacting agents. *Toxicol. In Vitro* **2014**, *28*, 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.11.003>.
62. Reddy, R.G.; Veeraval, L.; Maitra, S.; Chollet-Krugler, M.; Tomasi, S.; Dévéhat, F.L.; Boustie, J.; Chakravarty, S. Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 1527–1534. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.08.010>.
63. Fernández, E.; Reyes, A.; Hidalgo, M.E.; Quilhot, W. Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein. *J. Photochem. Photobiol. B* **1998**, *42*, 195–201. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(98\)00070-0](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(98)00070-0).
64. Hidalgo, M.E.; Fernández, E.; Quilhot, W.; Lissi, E.A. Photohemolytic activity of lichen metabolites. *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, *21*, 37–40. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)80161-2](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)80161-2).
65. Haraldsdóttir, S.; Guolaugsdóttir, E.; Ingólfssdóttir, K.; Ogmundsdóttir, H.M. Anti-proliferative effects of lichen-derived lipoxygenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin in vitro. *Planta Med.* **2004**, *70*, 1098–1100. <https://doi.org/10.1055/s-2004-832657>.
66. Bucar, F.; Schneider, I.; Ogmundsdóttir, H.; Ingólfssdóttir, K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 602–606. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.03.004>.

67. Martins, M.C.; Silva, M.C.; Silva, H.A.; Silva, L.R.; Albuquerque, M.C.; Aires, A.L.; Falcão, E.P.; Pereira, E.C.; de Melo, A.M.; da Silva, N.H. Barbatic Acid Offers a New Possibility for Control of *Biomphalaria Glabrata* and *Schistosomiasis*. *Molecules* **2017**, *22*, 568. <https://doi.org/10.3390/molecules22040568>.
68. Micheletti, A.C.; Honda, N.K.; Ravaglia, L.M.; Matayoshi, T.; Spielmann, A.A. Antibacterial potencial of 12 Lichen species. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2021**, *93*, (4):S0001-37652021000700904. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191194>.
69. Reddy, S.D.; Siva, B.; Kumar, K.; Babu, V.S.P.; Sravanthi, V.; Boustie, J.; Nayak, V.L.; Tiwari, A.K.; Rao, C.H.V.; Sridhar, B.; et al. Comprehensive Analysis of Secondary Metabolites in *Usnea longissima* (Lichenized Ascomycetes, Parmeliaceae) Using UPLC-ESI-QTOF-MS/MS and Pro-Apoptotic Activity of Barbatic Acid. *Molecules* **2019**, *24*, 2270. <https://doi.org/10.3390/molecules24122270>.
70. Yamamoto, Y.; Miura, Y.; Kinoshita, Y.; Higuchi, M.; Yamada, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H.; Koshimizu, K. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1388–1390. <https://doi.org/10.1248/cpb.43.1388>.
71. Lang, T.Q.; Zhang, Y.; Chen, F.; Luo, G.Y.; Yang, W.D. Characterization of chemical components with diuretic potential from *Pyrrosia petiolosa*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2021**, *23*, 764–771. <https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1786065>.
72. Maulidiyah Maulidiyah, M.N.; Nazila, W.; Musdalifah, A.; Salim, L.O.A.; Nurdin, M. Isolation and antibacterial activity of diffractaic acid compound from lichen *Usnea blepharea* Motyka. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2021**, *11*, 121–130.
73. Furmanek, Ł.; Czarnota, P.; Seaward, M.R.D. A review of the potential of lichen substances as antifungal agents: The effects of extracts and lichen secondary metabolites on *Fusarium* fungi. *Arch. Microbiol.* **2022**, *204*, 523. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03104-4>.
74. Bayir, Y.; Odabasoglu, F.; Cakir, A.; Aslan, A.; Suleyman, H.; Halici, M.; Kazaz, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine* **2006**, *13*, 584–590. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.07.002>.
75. Emsen, B.; Aslan, A.; Turkez, H.; Taghizadehghalehjoughi, A.; Kaya, A. The anti-cancer efficacies of diffractaic, lobaric, and usnic acid: In vitro inhibition of glioma. *J. Cancer Res Ther* **2018**, *14*(5):941-951, <https://doi.org/10.4103/0973-1482.177218>
76. Kumar, K.C.; Müller, K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 821–823. <https://doi.org/10.1021/np980378z>.
77. Truong, T.L.; Nga, V.T.; Huy, D.T.; Chi, H.B.; Phung, N.K. A new depside from *Usnea aciculifera* growing in Vietnam. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 1179–1180.
78. Brisdelli, F.; Perilli, M.; Sellitri, D.; Piovano, M.; Garbarino, J.A.; Nicoletti, M.; Bozzi, A.; Amicosante, G.; Celenza, G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: An in vitro study. *Phytother. Res.* **2013**, *27*, 431–437. <https://doi.org/10.1002/ptr.4739>.
79. Ozgencli, I.; Budak, H.; Ciftci, M.; Anar, M. Lichen Acids May Be Used as a Potential Drug for Cancer Therapy; by Inhibiting Mitochondrial Thioredoxin Reductase Purified from Rat Lung. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2018**, *18*, 1599–1605. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180525095520>.
80. Silva, C.V.N.S.; Barbosa, J.A.P.; Ferraz, M.S.; Silva, N.H.; Honda, N.K.; Rabello, M.M.; Hernandes, M.Z.; Bezerra, B.P.; Cavalcanti, I.M.F.; Ayala, A.P.; et al. Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP-β-CD inclusion complex encapsulated in microspheres. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *92*, 494–503. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.073>.
81. Oh, J.M.; Kim, Y.J.; Gang, H.S.; Han, J.; Ha, H.H.; Kim, H. Antimicrobial Activity of Divaricatic Acid Isolated from the Lichen *Evernia mesomorpha* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* **2018**, *23*, 3068. <https://doi.org/10.3390/molecules23123068>.
82. Silva, H.A.M.F.; Siqueira, W.N.; Sá, J.L.F.; Silva, L.R.S.; Martins, M.C.B.; Aires, A.L.; Amâncio, F.F.; Pereira, E.C.; Albuquerque, M.C.P.A.; Melo, A.M.M.A.; et al. Laboratory assessment of divaricatic acid against *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Acta Trop.* **2018**, *178*, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.019>.
83. Silva, H.; Aires, A.L.; Soares, C.L.R.; Siqueira, W.N.; Lima, M.V.; Martins, M.C.B.; Albuquerque, M.; Silva, T.G.; Brayner, F.A.; Alves, L.C.; et al. Schistosomicidal effect of divaricatic acid from *Canoparmelia texana* (Lichen): In vitro evaluation and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* **2021**, *222*, 106044. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106044>.
84. Shcherbakova, A.; Strömstedt, A.A.; Göransson, U.; Gnezdilov, O.; Turanov, A.; Boldbaatar, D.; Kochkin, D.; Ulrich-Merzenich, G.; Koptina, A. Antimicrobial and antioxidant activity of *Evernia prunastri* extracts and their isolates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *37*, 129. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03099-y>.
85. Girardot, M.; Millot, M.; Hamion, G.; Billard, J.L.; Juin, C.; Ntoutoume, G.; Sol, V.; Mambu, L.; Imbert, C. Lichen Polyphenolic Compounds for the Eradication of *Candida albicans* Biofilms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 698883. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.698883>.
86. Lauinger, I.L.; Vivas, L.; Perozzo, R.; Stairiker, C.; Tarun, A.; Zloh, M.; Zhang, X.; Xu, H.; Tonge, P.J.; Franzblau, S.G.; et al. Potential of lichen secondary metabolites against Plasmodium liver stage parasites with FAS-II as the potential target. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1064–1070. <https://doi.org/10.1021/np400083k>.
87. Fernández-Moriano, C.; Divakar, P.K.; Crespo, A.; Gómez-Serranillos, M.P. Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *105*, 262–277. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.030>.

88. Lee, S.; Suh, Y.J.; Yang, S.; Hong, D.G.; Ishigami, A.; Kim, H.; Hur, J.S.; Chang, S.C.; Lee, J. Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Evernic Acid in an MPTP-Induced Parkinson's Disease Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2098. <https://doi.org/10.3390/ijms22042098>.
89. Burlando, B.; Ranzato, E.; Volante, A.; Appendino, G.; Pollastro, F.; Verotta, L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Med.* **2009**, *75*, 607–613. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185329>.
90. Kizil, H.E.; Agar, G.; Anar, M. Antiproliferative effects of Evernic acid on A549 and healthy human cells: An in vitro study. *J. Biotechnol.* **2015**, *208*, S28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.074>.
91. Kizil, H.E.; Ađar, G.; Anar, M. Cytotoxic and antiproliferative effects of evernic acid on HeLa cell lines: A candidate anticancer drug. *J. Biotechnol.* **2014**, *185*, S29. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.098>.
92. Studzińska-Sroka, E.; Majchrzak-Celińska, A.; Zalewski, P.; Szwajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Kaproń, B.; Plech, T.; Żarowski, M.; Cielecka-Piontek, J. Lichen-Derived Compounds and Extracts as Biologically Active Substances with Anticancer and Neuroprotective Properties. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1293. <https://doi.org/10.3390/ph14121293>.
93. de Pedro, N.; Cantizani, J.; Ortiz-López, F.J.; González-Menéndez, V.; Cautain, B.; Rodríguez, L.; Bills, G.F.; Reyes, F.; Genilloud, O.; Vicente, F. Protective effects of isolecanoric acid on neurodegenerative in vitro models. *Neuropharmacology* **2016**, *101*, 538–548. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.09.029>.
94. Thadhani, V.M.; Choudhary, M.I.; Ali, S.; Omar, I.; Siddique, H.; Karunaratne, V. Antioxidant activity of some lichen metabolites. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 1827–1837. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.529546>.
95. Paluszczak, J.; Kleszcz, R.; Studzińska-Sroka, E.; Krajka-Kuźniak, V. Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2018**, *441*, 109–124. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3178-7>.
96. Roser, L.A.; Erkoc, P.; Ingelfinger, R.; Henke, M.; Ulshöfer, T.; Schneider, A.-K.; Laux, V.; Geisslinger, G.; Schmitt, I.; Fürst, R.; et al. Lecanoric acid mediates anti-proliferative effects by an M phase arrest in colon cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *148*, 112734. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112734>.
97. Bogo, D.; de Matos, M.F.; Honda, N.K.; Pontes, E.C.; Oguma, P.M.; da Santos, E.C.; de Carvalho, J.E.; Nomizo, A. In vitro antitumour activity of orsellinates. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **2010**, *65*, 43–48. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-1-208>.
98. Rama Krishna, B.; Ramakrishna, S.; Rajendra, S.; Madhusudana, K.; Mallavadhani, U.V. Synthesis of some novel orsellinates and lecanoric acid related depsides as α -glucosidase inhibitors. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2019**, *21*, 1013–1027. <https://doi.org/10.1080/10286020.2018.1490274>.
99. Seo, C.; Sohn, J.H.; Ahn, J.S.; Yim, J.H.; Lee, H.K.; Oh, H. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory effects of depsidone and pseudodepsidone metabolites from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2801–2803. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.108>.
100. Türk, H.; Yilmaz, M.; Tay, T.; Türk, A.O.; Kivanç, M. Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin, and olivetoric acid constituents. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **2006**, *61*, 499–507. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-7-806>.
101. Emsen, B.; Turkez, H.; Togar, B.; Aslan, A. Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of olivetoric and physodic acid in cultured human amnion fibroblasts. *Hum. Exp. Toxicol.* **2017**, *36*, 376–385. <https://doi.org/10.1177/0960327116650012>.
102. Emsen, B.; Aslan, A.; Togar, B.; Turkez, H. In vitro antitumor activities of the lichen compounds olivetoric, physodic and psoromic acid in rat neuron and glioblastoma cells. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 1748–1762. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1126620>.
103. Emsen, B.; Sadi, G.; Bostanci, A.; Gursoy, N.; Emsen, A.; Aslan, A. Evaluation of the biological activities of olivetoric acid, a lichen-derived molecule, in human hepatocellular carcinoma cells. *Rend. Lincei. Sci. Fis. E Nat.* **2021**, *32*, 135–148. <https://doi.org/10.1007/s12210-021-00976-4>.
104. Koparal, A.T.; Ulus, G.; Zeytinoglu, M.; Tay, T.; Türk, A.O. Angiogenesis inhibition by a lichen compound olivetoric acid. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 754–758. <https://doi.org/10.1002/ptr.3035>.
105. Bellio, P.; Segatore, B.; Mancini, A.; Di Pietro, L.; Bottoni, C.; Sabatini, A.; Brisdelli, F.; Piovano, M.; Nicoletti, M.; Amicosante, G.; et al. Interaction between lichen secondary metabolites and antibiotics against clinical isolates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.12.005>.
106. Bauer, J.; Waltenberger, B.; Noha, S.M.; Schuster, D.; Rollinger, J.M.; Boustie, J.; Chollet, M.; Stuppner, H.; Werz, O. Discovery of depsides and depsidones from lichen as potent inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 using pharmacophore models. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 2077–2081. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200345>.
107. Oettl, S.K.; Gerstmeier, J.; Khan, S.Y.; Wiechmann, K.; Bauer, J.; Atanasov, A.G.; Malainer, C.; Awad, E.M.; Uhrin, P.; Heiss, E.H.; et al. Imbricatic acid and perlatolic acid: Multi-targeting anti-inflammatory depsides from *Cetrelia monachorum*. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076929>.
108. Carlos, I.Z.; Quilles, M.B.; Carli, C.B.; Maia, D.C.; Benzatti, F.P.; Lopes, T.I.; Gianini, A.S.; Brum, R.L.; Vilegas, W.; dos Santos, L.C.; et al. Lichen metabolites modulate hydrogen peroxide and nitric oxide in mouse macrophages. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **2009**, *64*, 664–672. <https://doi.org/10.1515/znc-2009-9-1010>.
109. Sisodia, R.; Geol, M.; Verma, S.; Rani, A.; Dureja, P. Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27*, 2235–2239. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.811410>.

110. Lai, D.; Odimegwu, D.C.; Esimone, C.; Grunwald, T.; Proksch, P. Phenolic compounds with in vitro activity against respiratory syncytial virus from the Nigerian lichen *Ramalina farinacea*. *Planta Med.* **2013**, *79*, 1440–1446. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1350711>.
111. Tatipamula, V.B.; Annam, S.S.P.; Nguyen, H.T.; Polimati, H.; Yejella, R.P. Sekikaic acid modulates pancreatic β -cells in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats by inhibiting digestive enzymes. *Nat. Prod. Res.* **2021**, *35*, 5420–5424. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1775226>.
112. Zhang, Y.; Tan, C.Y.; Spjut, R.W.; Fuchs, J.R.; Kinghorn, A.D.; Rakotondraibe, L.H. Specialized metabolites of the United States lichen *Niebla homalea* and their antiproliferative activities. *Phytochemistry* **2020**, *180*, 112521. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112521>.
113. Studzińska-Sroka, E.; Hołderna-Kędzia, E.; Galanty, A.; Bylka, W.; Kacprzak, K.; Ćwiklińska, K. In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds isolated from *Cladonia uncialis*. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29*, 2302–2307. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1005616>.
114. Guo, J.; Li, Z.L.; Wang, A.L.; Liu, X.Q.; Wang, J.; Guo, X.; Jing, Y.K.; Hua, H.M. Three new phenolic compounds from the lichen *Thamnolia vermicularis* and their antiproliferative effects in prostate cancer cells. *Planta Med.* **2011**, *77*, 2042–2046. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280096>.
115. Yılmaz, M.; Sariözlü, N.Y.; Candan, M.; Tay, N. Screening of antibacterial, antituberculosis and antifungal effects of lichen *Usnea florida* and its thamnolic acid constituent. *Biomed. Res.* **2017**, *28*, 3108–3113.
116. Odabasoglu, F.; Yildirim, O.S.; Aygun, H.; Halici, Z.; Halici, M.; Erdogan, F.; Cadirci, E.; Cakir, A.; Okumus, Z.; Aksakal, B.; et al. Diffractaic acid, a novel proapoptotic agent, induces with olive oil both apoptosis and antioxidative systems in Ti-implanted rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *674*, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.11.019>.
117. Kosanic, M.; Rankovic, B.; Stanojkovic, T.; Vasiljevic, P.; Manojlovic, N. Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia. *EXCLI J.* **2014**, *13*, 1226–1238.
118. Candan, M.; Yilmaz, M.; Tay, T.; Kivanç, M.; Türk, H. Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Xanthoparmelia pokornyi* and its gyrophoric and stenosporic acid constituents. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **2006**, *61*, 319–323. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-5-603>.
119. Correché, E.R.; Enriz, R.D.; Piovano, M.; Garbarino, J.; Gómez-Lechón, M.J. Cytotoxic and apoptotic effects on hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens. *Altern. Lab. Anim.* **2004**, *32*, 605–615. <https://doi.org/10.1177/026119290403200611>.
120. Lohézic-Le Dévéhat, F.; Legouin, B.; Couteau, C.; Boustie, J.; Coiffard, L. Lichenic extracts and metabolites as UV filters. *J. Photochem. Photobiol. B* **2013**, *120*, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.01.009>.
121. Varol, M.; Türk, A.; Candan, M.; Tay, T.; Koparal, A.T. Photoprotective Activity of Vulpinic and Gyrophoric Acids toward Ultraviolet B-Induced Damage in Human Keratinocytes. *Phytother. Res.* **2016**, *30*, 9–15. <https://doi.org/10.1002/ptr.5493>.
122. Shim, J.H. Anti-Aging Effects of Gyrophoric Acid on UVA-Irradiated Normal Human Dermal Fibroblasts. *Nat. Prod. Commun.* **2020**, *15*, 1934578X20919545. <https://doi.org/10.1177/1934578X20919545>.
123. Huo, X.; Qiao, L.; Chen, Y.; Chen, X.; He, Y.; Zhang, Y. Discovery of Novel Multi-target Inhibitor of angiotensin type 1 receptor and neprilysin inhibitors from Traditional Chinese Medicine. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16205. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52309-z>.
124. Salgado, F.; Caballero, J.; Vargas, R.; Cornejo, A.; Areche, C. Continental and Antarctic Lichens: Isolation, identification and molecular modeling of the depside tenuiorin from the Antarctic lichen *Umbilicaria antarctica* as tau protein inhibitor. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *34*, 646–650. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1492576>.
125. Sun, W.; Zhang, B.; Zheng, H.; Zhuang, C.; Li, X.; Lu, X.; Quan, C.; Dong, Y.; Zheng, Z.; Xiu, Z. Trivaric acid, a new inhibitor of PTP1b with potent beneficial effect on diabetes. *Life Sci.* **2017**, *169*, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.11.012>.
126. Sun, W.; Zhuang, C.; Li, X.; Zhang, B.; Lu, X.; Zheng, Z.; Dong, Y. Varic acid analogues from fungus as PTP1B inhibitors: Biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3382–3385. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.06.001>.
127. Zheng, Z.; Zhang, S.; Lu, X.; Ma, Y.; Fan, Y.; Shi, Y.; Dong, A.; Duan, B. Trivaric acid, a potent depside human leukocyte elastase inhibitor. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 2247–2251. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00642>.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Capítulo 2

Screening farmacológico *in vitro* de especies líquénicas pertenecientes al clado cetrarioide (F/Parmeliaceae) como primer cribado para posterior aplicación en modelos celulares

Publicación incluida

Phytochemical Characterization and Pharmacological Properties of Lichen Extracts from Cetrarioid Clade by Multivariate Analysis and Molecular Docking.

**Phytochemical Characterization and Pharmacological Properties of Lichen
Extracts from Cetrarioid Clade by Multivariate Analysis and Molecular
Docking**

Ureña-Vacas I, González-Burgos E, De Vita S, Divakar PK, Bifulco G, Gómez-Serranillos MP.

Evid Based Complement Alternat Med. 2022 Jun 2; 2022:5218248.

[https://doi.org/ 10.1155/2022/5218248](https://doi.org/10.1155/2022/5218248)

Research Article

Phytochemical Characterization and Pharmacological Properties of Lichen Extracts from Cetrarioid Clade by Multivariate Analysis and Molecular Docking

Isabel Ureña-Vacas ¹, Elena González-Burgos ¹, Simona De Vita ²,
Padreep K. Divakar ¹, Giuseppe Bifulco ² and M. Pilar Gómez-Serranillos ¹

¹Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramon y Cajal S/n, Ciudad Universitaria, Madrid 28040, Spain

²Department of Pharmacy, University of Salerno, Via Giovanni Paolo II 134, Fisciano (SA) 84084, Italy

Correspondence should be addressed to M. Pilar Gómez-Serranillos; pserra@ucm.es

Received 10 March 2022; Revised 25 April 2022; Accepted 19 May 2022; Published 2 June 2022

Academic Editor: Ahmed Mediani

Copyright © 2022 Isabel Ureña-Vacas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction. Lichens, due to the presence of own secondary metabolites such as depsidones and depsides, became a promising source of health-promoting organisms with pharmacological activities. However, lichens and their active compounds have been much less studied. Therefore, the present study aims to evaluate for the first time the antioxidant capacity and enzyme inhibitory activities of 14 lichen extracts belonging to cetrarioid clade in order to identify new natural products with potential pharmacological activity. **Materials and Methods.** In this study, an integrated strategy was applied combining multivariate statistical analysis (principal component analysis and hierarchical cluster analysis), phytochemical identification, activity evaluation (*in vitro* battery of antioxidant assays FRAP, DPPH, and ORAC), and enzyme inhibitory activity against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) and molecular profiling with *in silico* docking studies of the most promising secondary metabolites. **Results.** Among fourteen lichen samples, *Dactylina arctica* stands out for its higher antioxidant capacities, followed by *Nephromopsis stracheyi*, *Tuckermannopsis americana*, *Vulpicida pinastri*, and *Asahinea scholanderi*. Moreover, *Asahinea scholanderi* and *Cetraria cucullata* extracts were the best inhibitors of AChE and BuChE. The major secondary metabolites identified by HPLC were alectoronic acid and α -collatolic acid for *Asahinea scholanderi* and usnic acid and protolichesterinic acid for *Cetraria cucullata*. Molecular docking studies revealed that alectoronic acid exhibited the strongest binding affinity with both AChE and BuChE with and without water molecules. **Conclusions.** Our results concluded that these species could be effective in the treatment of neurodegenerative diseases, being mandatory further investigation in cell culture and *in vivo* models.

1. Introduction

Lichens are a symbiotic association between a mycobiont (fungus) and a photosynthetic organism (algae and/or cyanobacteria). The use of lichens in traditional medicine has been fundamental to different cultures over the centuries. From classical traditional medicine systems (i.e., Ayurveda, Siddha, Unani, and Traditional Chinese Medicine (TCM)) to contemporary ethnic groups, lichens have been used for diverse medicinal purposes such as treating wounds, skin infections, respiratory, digestive, and

gynecological diseases [1]. The estimated number of lichen species worldwide is around 28,000, being Parmeliaceae family the largest one of lichenized fungi (80 genera, 2,800 species). Among the five main clades (parmelioid, cetrarioid, usneoid, alectoroid, and hypogymnioid), cetrarioid clade stands out for the number of described genera (17 genera), second only to the parmelioid clade, which is the largest one (27 genera) [2].

Through traditional knowledge, it is known that some cetrarioid lichens have been used for different disorders via oral or topical administration. Hence, *Cetraria islandica*

(L.) Ach. has been used for congestion, tuberculosis, asthma, inflammation, and high blood pressure [3, 4], *Flavocetraria cucullata* (Bellardi) Kärnefelt and Thell. for its antiasthmatic properties [4], *Nephromopsis nivalis* (L.) Divakar, A. Crespo and Lumbsch and *Vulpicida juniperus* (L.) J.-E. Mattsson and MJ Lai for its role as antibiotics [1], and *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E. Mattsson and M. J. Lai for pulmonary tuberculosis, wounds, skin infections, cancer, and spasms [5].

In recent years, the scientific interest on the health-promoting benefits of lichens has grown as these organisms have shown interesting and promising activities including cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory [6–9]. These activities are attributed especially to the presence of own secondary metabolites such as depsidones and depsides [9]. However, studies focusing on therapeutic and protective strategy based on the antioxidant ability of lichens are very limited [10].

Altered cellular redox homeostasis due to an excessive reactive oxygen species (ROS) production and an impaired antioxidant system leads to oxidative damage of lipids, proteins, and DNA and even, cell death. Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of many diseases such as Alzheimer's disease [11]. Antioxidant compounds are good to prevent or delay oxidative stress-mediated toxicity through different mechanisms including accept or donate electrons to neutralize free radicals, upregulate the endogenous antioxidant system, and act as metal chelators [12, 13]. There is a growing interest in pharmaceutical, chemical, and food industries for natural antioxidants which is attributed to the tendency of society toward natural products and to the evidence of toxicity by synthetic antioxidants [14–16].

In addition to oxidative stress signaling in Alzheimer's disease, this major neurodegenerative disease has been associated with a deficiency in acetylcholine in brain. The enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) turn acetylcholine into the inactive metabolites, choline, and acetate. Therefore, inhibitors of cholinesterase enzymes are key in the prevention of Alzheimer's disease progression [17].

Since the pharmacological activity of lichens from cetrarioid clade has been scarcely studied, the purposes of the present work were (1) to evaluate the antioxidant activity and total phenol content of 14 lichen extracts, (2) to apply a multivariate analysis using principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) to select which methanol lichen extracts have the best antioxidant activity, and (3) to evaluate AChE and BuChE enzyme inhibitory activities of all these 14 lichen extracts and assess molecular docking studies with the major secondary metabolites identified in the two most promising potential inhibitors lichen species for Alzheimer's disease.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents. All reagents were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade methanol, ferrous sulfate (FeSO_4), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. Lichen Collection and Extract Preparation. Lichen samples (Table 1, Figure 1) were collected in different countries and continents (America, Asia, and Europe). These samples were preserved in the Herbarium of the Faculty of Pharmacy (MAF), University Complutense of Madrid. Expert lichenologists (Dr. P.K. Divakar and Prof. A. Crespo) authenticated these species.

Lichen thallus (50 mg) was extracted successively (shaken 20 s, every 15 min) with pure methanol for HPLC (2 ml) during 2 h. After overnight maceration, extracts were filtered (0.45 μm pore) and concentrated by evaporation at room temperature. Finally, dry extracts were stored until its use.

2.3. Total Phenolic Content. Total phenolic content was quantified by visible-light spectrophotometry using Folin–Ciocalteu colorimetric method [18]. Lichen extracts (1 mg/ml, 10 μL) were mixed with Folin–Ciocalteu reagent (200 μL). After 5-minute incubation, 7% Na_2CO_3 dissolution (90 μL) was added. Gallic acid was used as standard for calibration curve. Absorbance was measured at 595 nm on a SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Results were expressed as μg of gallic acid equivalent per mg of extract.

2.4. In Vitro Antioxidant Assays

2.4.1. Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay. FRAP assay is based on the ability of antioxidants to reduce ferric ion into ferrous ion [19]. Lichen extracts (1 mg/ml in methanol, 110 μL) were mixed with FRAP reagent [acetate buffer solution (pH 3.6), 2,4,6-Tris (2-pyridyl-s-triazine (TPTZ) (10 mM) in HCl (40 mM), and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM)]. A calibration curve of $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ was used as standard. After 30 min of incubation, spectrophotometric measurements at 595 nm were performed on a SPECTROstar Nano Microplate Reader. Results were expressed as μmol of Fe^{2+} eq/g sample.

2.4.2. 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) Assay. Free radical-scavenging capacity was determined according to DPPH method [20]. This method is based on the ability of antioxidants to neutralize DPPH radical. Trolox was used as standard for calibration curve. Different concentrations of lichen extracts (from 100 to 900 mg/ml, stock solution 1 mg/ml in methanol) and DPPH solution (550 μM , 20 μL) were mixed and incubated at 37°C for 30 minutes. Absorbance was measured at 517 nm using a SPECTROstar Nano Microplate Reader. Inhibition of DPPH radical was expressed as IC_{50} values ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.4.3. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Method. The ORAC assay was performed as previously described by Dávalos et al. (2004) [21]. Different concentrations of lichen samples from 10 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (stock solution 1 mg/ml in methanol) were prepared in phosphate buffer solution (75 mM, pH 7.4) and incubated with sodium fluorescein

TABLE 1: Species of lichens from cetrarioid clade selected for this study (lichen name, origin, and MAF code).

Lichen species	Origin	MAF CODE
<i>Allocetraria ambigua</i> (C. Bab.) Kurok. and M.J. Lai	North Sikkim, India	22788
<i>Asahinea scholanderi</i> (Llano)	Russia	95154
<i>Cetraria commixta</i> (Nyl.) Th. Fr	Serra da Estrela, Beira Alta, Portugal	21548
<i>Cetraria crespoeae</i> (Barreno and Vazquez) Karnefelt	Las Batuecas, Cáceres, Spain	10172
<i>Cetraria cucullata</i> (Bell.) Ach.	Krefelder Hütte, Austria	11754
<i>Cetraria ericetorum</i> . Opiz	Krefelder Hütte, Austria	11748
<i>Cetraria nivalis</i> (L.) Ach	Krefelder Hütte, Austria	11752
<i>Dactylina arctica</i> (Hook) Nyl.	North of Central Siberia, Krasnoyarsk Territory, Russia	96262
<i>Nephromopsis laureri</i> (Kremp.) Kurok.	Southern Siberia, Russia	22787
<i>Nephromopsis pallescens</i> (Schaer.) Y.S. Park	Himachal Pradesh, Dehla, India	22786
<i>Nephromopsis stracheyi</i> (C. Bab.) Müll. Arg.	North Sikkim, India	22785
<i>Tuckermannopsis americana</i> (Spreng) Hale	Maine, USA	19828
<i>Tuckneraria ahtii</i> Randlane and Saag	North Sikkim, India	22789
<i>Vulpicida pinastris</i> (Scop.) J.E. Mattsson and M.J. Lai	Alto del Peñón, Zamora, Spain	22790



FIGURE 1: Thallus of the studied lichens of cetrarioid clade.

(70 nM) for 10 minutes. Finally, 2,2'-azobis (2-amidinopropane)-dihydrochloride (APPH) was added to all samples. Fluorescence was recorded at 37°C for 98 min at 485 nm excitation wavelength and at 520 nm emission wavelength in a microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Results were expressed as $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$ dry extract.

2.5. Enzyme Inhibitory Activities: Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BuChE). The enzyme inhibitory activities AChE and BuChE were determined using Ellman method (1961) [22]. Lichen extracts (10 mg/ml in DMSO) were mixed at different concentrations (in PBS) with 5,5'-dithiobis

(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (1.2 mM final concentration), AChE/BuChE (0.0008 U/well final concentration), Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8.0), and bovine serum albumin (BSA) [(0.1% (w/v))]. After 5-min preincubation at room temperature, substrates acetylcholine iodide for AChE and butyrylthiocholine for BuChE (3 mM final concentration) were added. Absorbance was measured at 412 nm for 3 min in a SPECTROstar Nano Microplate Reader.

2.6. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Dry lichen extracts were dissolved in methanol (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration). Samples were filtered twice and injected (20 μL) in an HPLC instrumentation. The solvents were

prefiltered under vacuum through 0.45 μm pore size filters. The analysis was carried out using an Agilent 1260 instrument (Agilent Technologies, CA, USA), with a photodiode array detector (190–800 nm). The HPLC separations were performed on a reversed-phase Mediterranean Sea18 column at 40°C (150 mm \times 4.6 mm, 3 μm particle size; Teknokroma, Barcelona, Spain) using 1% orthophosphoric acid in milli-Q water (A) and supergradient HPLC-grade methanol (B) as solvents. The gradient elution with a flow rate of 0.6 ml/min started from 70% A to 30% after 15 min and down to 10% A after 45 min; initial conditions were reached after 60 minutes. The UV-Vis spectra and absorption maxima of sample components were recorded at 190–400 nm, and the peaks were detected at 254 nm. The analyses were run in duplicates. Agilent ChemStation was used to process chromatographic data [23, 24].

Main peaks were identified by comparing their retention times as well as the published spectroscopic data of scientific literature. The following standard compounds were used, and their T_R and λ_{max} were analyzed. Usnic acid was purchased from Sigma-Aldrich® ($T_R = 32.39$ min, $\lambda_{\text{max}} = 232/282$ nm). In addition, the extract of *Parmotrema nilgherrense* (Nyl.) Hale which contains alectoronic acid ($T_R = 29.28$ min, $\lambda_{\text{max}} = 214/254/316$ nm) and α -collatolic acid ($T_R = 32.96$ min, $\lambda_{\text{max}} = 214\text{--}216/256/316$ nm) and the extract of *Cetraria ericetorum* Opiz, which contains protolichesterinic acid ($T_R = 41.2$ min, $\lambda_{\text{max}} = 230$ nm), were used.

2.7. Docking Experiments. The crystal structures of human AChE bound to selective inhibitor donepezil (PDB: 6O4W [25]) and human BuChE bound to the inhibitor N-((1-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl) piperidin-3-yl) methyl)-N-(2-(dimethylamino) ethyl)-2 naphthamide (PDB: 5NN0 [26]) were considered for this study in a hydrated and a dehydrated state. The protein structures were prepared using Protein Preparation Wizard tool available in Schrödinger Suite (Schrödinger Suite 2017-1: Protein Preparation Wizard, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) [27]. The chemical structures of acetylcholine (ACh) and the tested lichen secondary metabolites were built using Maestro Build Panel (Schrödinger Release 2017-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) and processed with LigPrep (Schrödinger Release 2017-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017).

The co-crystallized ligands and ACh were used as benchmarks for molecular docking experiments and to evaluate influence of water molecules inside binding cavity. Both inhibitors and ACh were re-docked against AChE and BuChE in the presence and in the absence of water molecules [25, 26]. The molecular docking experiments were carried out using Glide [28–30] in the extra precision mode (XP) software. The necessary grids were built assuming the center-of-mass of the ligand as the center of docking grid and expanding the box at 10 Å along x -, y -, and z -axis. The expanded sampling mode was used, and 10,000 ligand poses were kept for the initial phase, followed by a selection of 800 poses for energy minimization. In this step, 30 final poses were saved for each ligand, with a scaling factor of 0.8 related to van der Waals radii with a partial charge cutoff of 0.15.

2.8. Statistical Analysis. All assays were measured in triplicate, and data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed by Sigma Plot 11.0 using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test (5% significance level). Moreover, linear regression analysis and Pearson correlation coefficients were determined to correlate total phenolic content and antioxidant capacity.

Furthermore, a multivariate statistical analysis using principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) was done using IBM SPSS statistics version 25. PCA is used to reduce the dimension of the data and to highlight the similarities and sort out the outliers. Due to the differences between the units of variables, we performed a PCA based on correlation matrix, in order to scale data and eliminate the influence of variances. PCA analysis model was carried out with a fixed number of factor (2) and choosing 25 maximum iterations for convergence. Unrotated factor solution and the scree plot were displayed. PCA score plot and loading plot were described. Hierarchical cluster analysis (HCA) was performed using the centroid method as clustering algorithm and the square Euclidean distance as distance measure. Variables were autoscaled (transformation into z -scores). Levene's test was carried out to check for homogeneity of variance. ANOVA tests were used to identify noted differences among the clusters. Lichen extracts have been grouped based on the antioxidant and phenolic content similarity. MVCA methods have been validated using leave-n-out cross-validation. Component's accountability and \cos^2 values were also calculated to validate the quality of representation by PCA model.

3. Results and Discussion

ROS overproduction is related to neurodegenerative disease progress via oxidative damage and mitochondria interaction [13]. Brain is especially susceptible to ROS damage because of its deficient level in antioxidant defenses, high oxygen consumption, presence of auto-oxidized neurotransmitter and redox active transition metals, and high content of polyunsaturated fatty acids in neuron membranes [12]. Since different ROS types are involved in neurodegenerative disease pathophysiology, the use of an exogenous combination of antioxidants is the most current and promising research strategy to deal with ROS injury [13]. Lichen extracts contain different compounds, most of them are exclusive, and they have polyphenolic structure with reported antioxidant properties. Parmeliaceae family is the largest one of lichenized fungi and, by number, highlights within it cetrarioid clade. The pharmacological research in cetrarioid clade is very limited. Therefore, the antioxidant activity of fourteen lichen extracts from cetrarioid clade was evaluated using different antioxidant assays.

Initially, extraction yields (dry extract weight/lichen thallus weight \times 100) were calculated for each methanol lichen extracts as shown in Table 2. The highest yields were found for *Dactylina arctica* (11.3%), *Asahinea scholanderi* (10.3%), and *Cetraria commixta* (10.3%). On the other hand, the lowest yield values were for *Cetraria nivalis* (5.6%) and *Cetraria crespoeae* (6.2%).

Total phenolic content (TPC), using Folin–Ciocalteu method, was evaluated for all methanol lichen extracts. As shown in Table 2, the amount of total phenolics ranged from 39.3 $\mu\text{g GA/mg}$ for *Cetraria cucullata* to 113.5 $\mu\text{g GA/mg}$ for *Dactylina arctica*. The lichen species *Nephromopsis stracheyi* (84.2 $\mu\text{g GA/mg}$) and *Asahinea scholanderi* (83.1 $\mu\text{g GA/mg}$) also showed high total phenolics values. On the other hand, *Cetraria ericetorum* (41.7 $\mu\text{g GA/mg}$), *Cetraria nivalis* (44.7 $\mu\text{g GA/mg}$), *Cetraria commixta* (44.9 $\mu\text{g GA/mg}$), and *Nephromopsis laureri* (45.1 $\mu\text{g GA/mg}$) had low levels of phenolics. Similar results have been observed for other lichen species of cetrarioid clade such as *Cetraria islandica* and *Vulpicida canadiensis* which showed TPC values of 57.3 and 34.9 $\mu\text{g GA/mg}$, respectively [10]. Moreover, total phenolic content has been also previously evaluated for lichen species of other clades such as parmelioid clade. For these lichens, total phenolic content ranges from 171 $\mu\text{g GA/mg}$ for *Parmotrema tiliacea* to 20 $\mu\text{g GA/mg}$ for *Parmotrema acetabulum* [31].

The antioxidant activity of lichen extracts was measured using three different methods: ferric-reducing antioxidant power (FRAP assay), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay, and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method (Table 2). Since there are multiple ROS inside living systems and *in vitro* methods for evaluation of antioxidant activity have different mechanisms of action, it is recommended to use diverse antioxidant test models [16, 32]. Hence, DPPH and FRAP methods evaluate the capacity of antioxidant molecules to transfer an electron to reduce radicals, metals, or/and carbonyls (single-electron transfer, SET), whereas ORAC assay measures the ability of antioxidant molecules to scavenge free radicals by proton donation (hydrogen atom transfer, HAT) [16]. DPPH radical-scavenging activity varied from 283.7 $\mu\text{g/mL}$ for *Vulpicida pinastri* to 2293.7 $\mu\text{g/mL}$ for *Cetraria crespoae*. Total antioxidant activity assayed by FRAP test ranged from 7.3 $\mu\text{mol of Fe}^{2+}$ eq/g sample for *Cetraria ericetorum* to 29.6 $\mu\text{mol of Fe}^{2+}$ eq/g sample for *Dactylina arctica*. Finally, the highest value for the ORAC test was obtained for *Dactylina arctica* (8.2 $\mu\text{mol TE/mg dry extract}$) and the lowest ORAC value was for *Nephromopsis pallescens* (0.4 $\mu\text{mol TE/mg dry extract}$). Previous studies have also demonstrated antioxidant properties for other cetrarioid species using DPPH and ORAC techniques. Hence, *Cetraria islandica*, which is the most studied species of the clade, showed DPPH values which varied from 678.38 $\mu\text{g/mL}$ to 1183 $\mu\text{g/mL}$ depending on the study [10, 33]. Moreover, *Vulpicida canadiensis* and *Vulpicida pinastri* exhibited significant DPPH results with IC_{50} values of 99 and 75 $\mu\text{g/mL}$, respectively [10, 34]. Furthermore, regarding ORAC assays, *Cetraria islandica* has shown an ORAC value of 3.06 $\mu\text{mol TE/mg dry extract}$ and *Vulpicida canadiensis* of 0.77 $\mu\text{mol TE/mg dry extract}$ [10].

Beyond this clade, other clades of Parmeliaceae family have been investigated for its antioxidant activity. Hence, Sieteiglesias et al. evaluated a total of fifteen methanol lichen extracts from Parmelioid clade. The species with the highest antioxidant potential were *Hypotrachyna formosana* (DPPH value of 49.5 $\mu\text{g/mL}$) and *Parmotrema perlatum* (FRAP value of 24.89 $\mu\text{mol of Fe}^{2+}$ eq/g sample and ORAC value of 22.1 $\mu\text{mol TE/mg dry extract}$) [31]. Moreover, another study

with Parmeliaceae lichens revealed that *Flavoparmelia euplecta* (ORAC value of 3.30 $\mu\text{mol TE/mg dry}$), *Hypotrachyna cirrhata* (FRAP value of 316 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq/g sample), and *Myelochroa irrugans* (DPPH value of IC_{50} 384 $\mu\text{g/mL}$) were the most promising antioxidant lichen extracts [35].

Next, the extract antioxidant potency (EAP) index which is calculated as sample score/best score \times 100 was determined to rank the antioxidant potency of each methanol lichen extract. The highest EAP index was for *Dactylina arctica* (93.5) followed by *Nephromopsis stracheyi* (66.8), *Vulpicida pinastri* (61.8), and *Tuckermannopsis americana* (59.6) (Table 2).

To understand the bivariate correlation between phenolic content and each antioxidant method, the linear correlation coefficients (r) and the coefficient of determination (R^2) were calculated. The study showed a significant and high correlation ($p < 0.01$) between phenolic content and ORAC assay ($r = 0.851$; $R^2 = 72.42\%$) and a significant and moderate correlation ($p < 0.05$) between phenolic content and FRAP method ($r = 0.645$; $R^2 = 41.60\%$). The lowest one was between DPPH and TPC ($r = -0.397$, $p > 0.05$) (Figure 2). Low correlation between total phenolic content and DPPH assay may be related to antagonistic or synergistic reactions between phenol compounds and other phytochemicals found in lichen extracts [36]. Flavonoids, tannins, and proanthocyanins could contribute to its antioxidant capacity [37].

Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were determined to classify the fourteen lichen extracts based on its antioxidant properties (FRAP, ORAC, and DPPH assays) and phenolic content. PCA was applied to data based on a matrix correlation to eliminate the influence of the variance between variables with different units (i.e., DPPH and ORAC). Each parameter carried equal weight in principal component analysis. The PCA allowed for the detection of similarities between samples and for establishing the main association between the variables. The PCA results from Bartlett's test of sphericity indicate that variables are correlated with $p < .001$, and then our dataset was confirmed to be suitable for a data reduction technique. Principal component 1 (PC1) explained up to 69.38% of total variance, whereas principal component 2 (PC2) accounted for 17.65%, being 87.03% of the total variance (Figure 3(a)). Total variance explained table and scree plot were included in Supplementary Figure S1. The distance between lichen samples on the score plot explains the degree of differences and similarities in antioxidant activity and phenolic content. *Dactylina arctica*, *Asahinea scholanderi*, and *Nephromopsis stracheyi* were placed on right half up of the plot, *Tuckermannopsis americana* and *Vulpicida pinastri* were also at the right part, but half down of the plot, and finally, the other lichen species from cetrarioid clade were placed on right left half the plot, up (*Cetraria nivalis*, *Cetraria commixta*, *Cetraria crespoae*, *Tuckneraria ahtii*) and down (*Nephromopsis laureri*, *Alloctraria ambigua*, *Nephromopsis pallescens*, and *Cetraria cucullata*). Figure 3(b) shows the relationship between the parameters studied. TPC, FRAP, and ORAC were clustered together, near each other, on the right side of the loading

TABLE 2: Yields, antioxidant activity (DPPH, ORAC, and FRAP), total phenolic content, and EAP index of methanol lichen extracts belonging to cetrarioid clade.

Lichen species	Yields (% w/w)	DPPH IC50 (µg/mL)	ORAC value (µmol TE/mg dry extract)	FRAP (µmol of Fe ²⁺ sample)	Total phenolic content (µg GA/mg)	EAP Index	Rank
<i>Alloctetraria ambigua</i> (C. Bab.) Kurok. and M.J. Lai	7.8 ± 3.6	895.9 ± 96.5 ^{h,i,k,l,n}	1.3 ± 0.2 ^{d,f,j}	19.9 ± 2.6 ^{c,d,e,f,g,j}	52.4 ± 6.2	42.1	7
<i>Asahinea scholanderi</i> (Llano)	10.3 ± 1.3	1069.25 ± 45.8 ^{h,i,k,l,n}	2.8 ± 0.1 ^{a,c,d,e,f,g,i,j,m,n}	16.8 ± 2.2 ^{c,f,g,j}	83.1 ± 5.6 ^{a,c,d,e,f,g,i,n}	50.1	5
<i>Cetraria commixta</i> (Nyl.) Th. Fr	10.3 ± 1.2	1657.9 ± 110.4 ^{ab,ef,h,j,i,k,l,n}	1.5 ± 0.03 ^{d,e,f,j,m}	8.4 ± 2.3	44.9 ± 1.9	26.4	13
<i>Cetraria crespoeae</i> (Barreno and Vazquez) Kárnéfelt	6.2 ± 1.6	2293.7 ± 54.9 ^{ab,ce,ef,g,h,i,j,k,l,m,n}	0.6 ± 0.02	12.6 ± 0.4	49.3 ± 8.6	26.5	14
<i>Cetraria cucullata</i> (Bell.) Ach.	8.7 ± 0.8	1262.8 ± 33.7 ^{a,f,h,i,j,k,l,n}	0.7 ± 0.1	11.7 ± 1.7	39.3 ± 1.5	27.3	12
<i>Cetraria ericetorum</i> . Opiz	6.2 ± 0.1	830.4 ± 60.8 ^{gh,l,n}	3.6 ± 0.3	7.3 ± 0.6	41.7 ± 1.2	38	8
<i>Cetraria nivalis</i> (L.) Ach	5.6 ± 1.6	1485.1 ± 96.1 ^{ab,ef,h,i,j,k,l,n}	1.5 ± 0.1 ^{d,e,f,j}	10.4 ± 1.7	44.7 ± 4.2	29.6	11
<i>Dactylina arctica</i> (Hook) Nyl.	11.3 ± 0.3	346.3 ± 7.9	8.2 ± 0.6 ^{ab,de,ef,g,i,j,l,m,n}	29.6 ± 1.8 ^{ab,cd,de,f,g,i,j,m}	113.5 ± 6.7 ^{a,b,cd,de,f,g,i,j,k,l,m,n}	93.5	1
<i>Nephromopsis laureri</i> (Kremp.) Kurok.	7.5 ± 2.7	593.5 ± 53.5 ⁿ	1.5 ± 0.1 ^{d,ef,j,m}	16.6 ± 2.1 ^{c,f,g}	45.1 ± 5.1	44.6	6
<i>Nephromopsis pallescens</i> (Schaer.) Y.S. Park	8.1 ± 2.3	896.95 ± 137.1 ⁿ	0.4 ± 0.04	11.6 ± 0.1	69.9 ± 5.7 ^{c,ef,g,i}	36.1	9
<i>Nephromopsis stracheyi</i> (C. Bab.) Müll. Arg.	9.2 ± 3.1	595.3 ± 64.3 ⁿ	3.8 ± 0.4 ^{ab,cd,ef,g,i,j,l,m,n}	27.1 ± 1.3 ^{a,b,cd,ef,g,i,j,m}	84.2 ± 6.5 ^{a,c,de,f,g,i,l,n}	66.8	2
<i>Tuckermannopsis americana</i> (Spreng) Hale	9.8 ± 0.7	445.9 ± 45.8	2.3 ± 0.2 ^{a,c,de,f,g,i,j,m,n}	25.1 ± 1.9 ^{b,c,de,f,g,i,j,m}	60 ± 8.1	59.6	4
<i>Tuckernaria ahtii</i> Randlane and Saag	7.8 ± 3.6	1693.2 ± 112.2 ^{ab,ef,h,i,j,k,l,m,n}	0.8 ± 0.1	14.3 ± 1.2 ^f	63 ± 6.2	32.3	10
<i>Vulpicida pinastri</i> (Scop.) J.E. Mattsson and M.J. Lai	9.1 ± 1.7	283.7 ± 31.7	1.5 ± 0.1 ^{d,ef,j,m}	25.4 ± 2.3 ^{b,c,de,f,g,i,j,m}	48.9 ± 4.8	61.8	3

Statistical significance ($p < 0.05$) is presented in letter superscripts: (a) versus *Alloctetraria ambigua*; (b) versus *Asahinea scholanderi*; (c) versus *Cetraria commixta*; (d) versus *Cetraria crespoeae*; (e) versus *Cetraria cucullata*; (f) versus *Cetraria ericetorum*; (g) versus *Cetraria nivalis*; (h) versus *Cetraria arctica*; (i) versus *Dactylina arctica*; (j) versus *Nephromopsis pallescens*; (k) versus *Nephromopsis stracheyi*; (l) versus *Tuckermannopsis americana*; (m) versus *Tuckernaria ahtii*; and (n) versus *Vulpicida pinastri*.

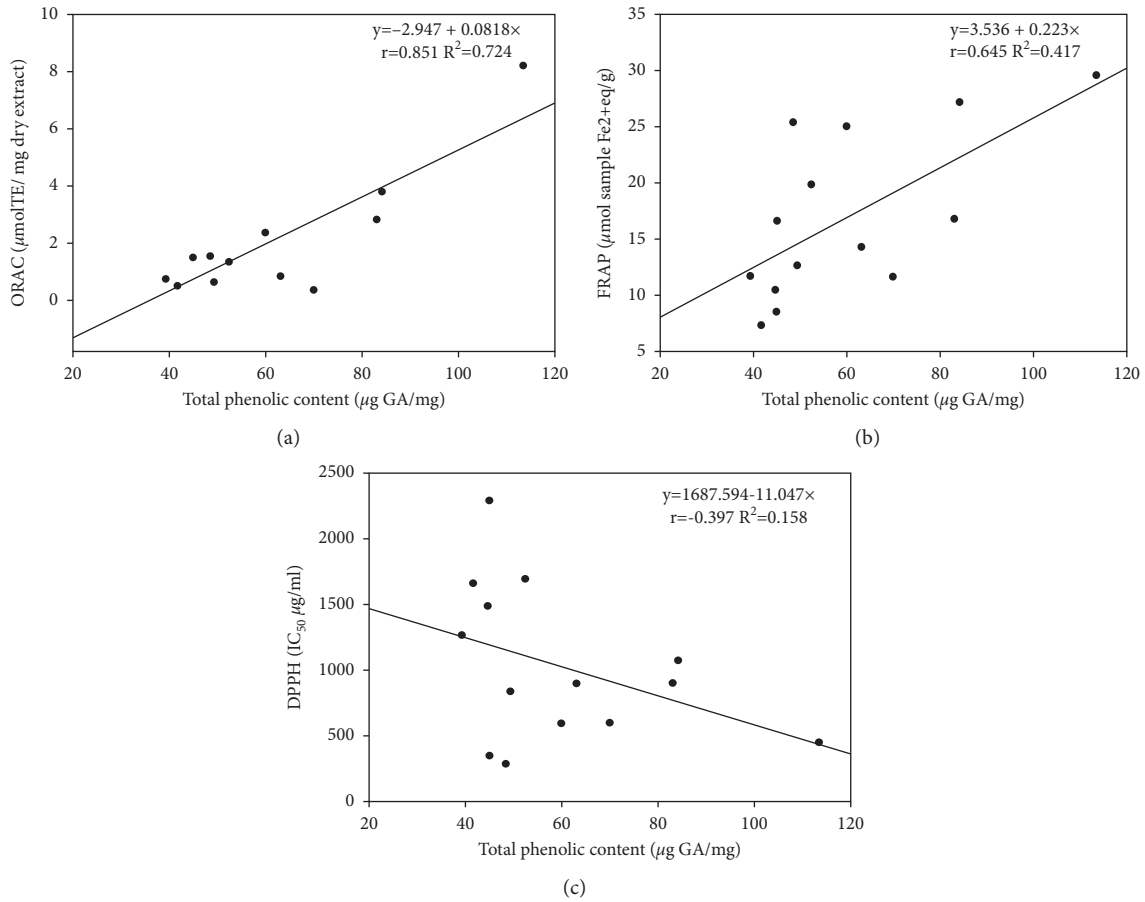


FIGURE 2: Linear correlation between total phenolic content and antioxidant capacity of lichens belonging to cetrarioid clade measured by (a) ORAC assay, (b) FRAP assay, and (c) DPPH assay.

plot. Higher values of these variables indicate better total antioxidant activity. Oppositely, in the left hand of the loading plot at the very top of the figure, we find DPPH. This variable (expressed in IC_{50} values) inversely influences total antioxidant activity. Both plots allowed us to explain our results. The location of *D. arctica* diametrically opposite to the rest of the lichen samples was explained by the high levels of TPC, ORAC, FRAP versus low IC_{50} values of DPPH activity. Contrary to *D. arctica*, we observed *Cetraria cucullata*, *Cetraria nivalis*, *Cetraria commixta*, *Cetraria crespoae*, *Cetraria ericetorum*, *Tuckneraria ahtii*, and *Nephromopsis pallescens* which exhibited low total antioxidant capacity (ORAC, FRAP, DPPH) and low content of TPC. Only well-projected variables and individuals can be interpreted by PCA model. The parameter that measures the quality of the representation is \cos^2 . High \cos^2 values indicate a good representation of the principal component. Conversely, low \cos^2 values show that variable and observations are not perfectly represented by the principal components [38]. Component's accountability expressed in percentages and \cos^2 values were included in Supplementary Tables S1 and S2. In our analysis, \cos^2 values for *A. scholanderi*, *C. ericetorum*, and *N. pallescens* were lower than 0.5 for both components and any assumptions drawn from this model related to these species have to be further investigated.

The hierarchical cluster analysis (HCA), based on Euclidean distance, was used to examine similarities between lichen species and antioxidant activity. Samples are grouped in clusters in terms of their nearness or similarity. Dendrogram is shown in Figure 4 and the mean values of antioxidant activity and total phenol content of clusters of the HCA are in Table 3. Lichen species from cetrarioid clade were grouped into three clusters which confirm the PCA results. Cluster 1 included the lichen species *Nephromopsis stracheyi*, *Asahinea scholanderi*, *Tuckermannopsis americana*, *Vulpicida pinastri*, *Allocetraria ambigua*, and *Nephromopsis laureri*. This cluster was subdivided into two subclusters 1A and 1B. Subcluster 1A was constituted by *Nephromopsis stracheyi* and *Asahinea scholanderi*, which have moderate phenolic content and antioxidant capacity as shown in Table 3. Species from subcluster 1B presented low values of TPC but better values of DPPH suggesting the contribution of other compounds to its antioxidant capacity. On the other hand, seven lichen species (*Cetraria commixta*, *Cetraria nivalis*, *Cetraria cucullata*, *Cetraria crespoae*, *Cetraria ericetorum*, *Tuckneraria ahtii*, and *Nephromopsis pallescens*) composed cluster 2. The cluster 2 included lichen species, mostly consisted of *Cetraria* species, characterized by the lowest antioxidant properties and the lowest phenolic content values [31, 39, 40]. Cluster 3 is

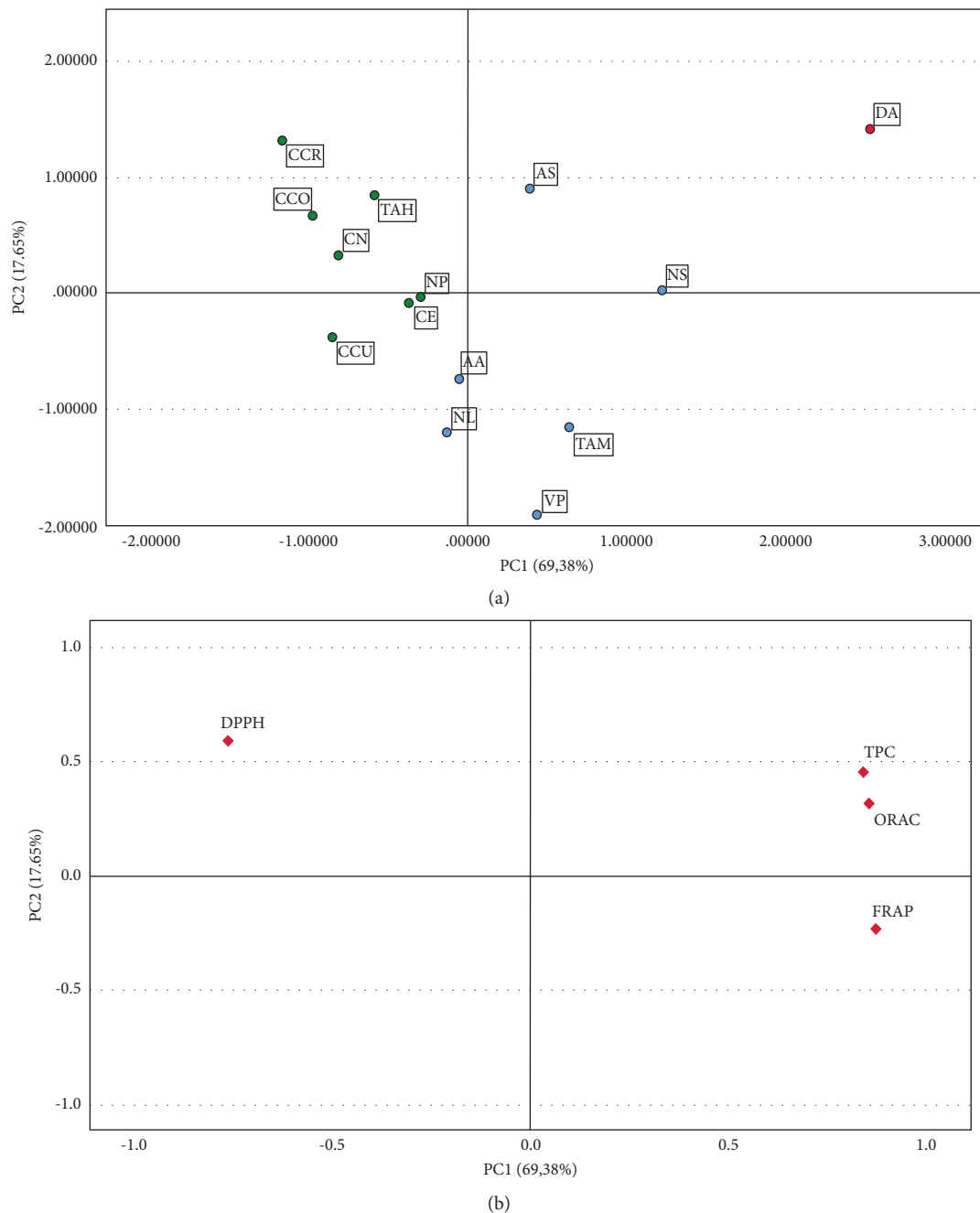


FIGURE 3: Reduction of multidimensional variables by principal component analysis (PCA) for fourteen different lichen species from cetrarioid clade. PCA allowed for the detection of similarities between samples and for establishing the main association between the variables. (a) PCA scores plot. (b) Loading plot. AA (*Allocetraria ambigua*), AS (*Asahinea scholanderi*), CCO (*Cetraria commixta*), CCR (*Cetraria crespoae*), CCU (*Cetraria cucullata*), CE (*Cetraria ericetorum*), CN (*Cetraria nivalis*), DA (*Dactylina arctica*), NL (*Nephromopsis laureri*), NP (*Nephromopsis pallescens*), NS (*Nephromopsis stracheyi*), TAH (*Tuckneraria ahtii*), TAM (*Tuckermannopsis americana*), and VP (*Vulpicida pinastri*).

composed of a single species *Dactylina arctica*. The dendrogram showed that this species had a greater distance to the other clusters and therefore more differences. In phylogenetic studies, the species of *Dactylina* genus constitute their own subclade within cetrarioid clade [41].

Lichen extracts from cetrarioid clade were also screened for enzyme inhibitory activities [AChE and BuChE]. The IC_{50} values for each enzyme are shown in Table 4. The highest

inhibitory activity of AChE was found for *Asahinea scholanderi* ($IC_{50} = 0.11$ mg/mL), *Tuckneraria ahtii* ($IC_{50} = 0.15$ mg/mL), and *Cetraria nivalis* ($IC_{50} = 0.16$ mg/mL), whereas the methanol extracts of *Cetraria commixta* and *Nephromopsis stracheyi* were less active ($IC_{50} = 0.35$ mg/mL). On the other hand, the lichens *Asahinea scholanderi* ($IC_{50} = 0.29$ mg/mL), *Cetraria cucullata* ($IC_{50} = 0.31$ mg/mL), and *Dactylina arctica* ($IC_{50} = 0.42$ mg/mL) were found to have the highest BuChE

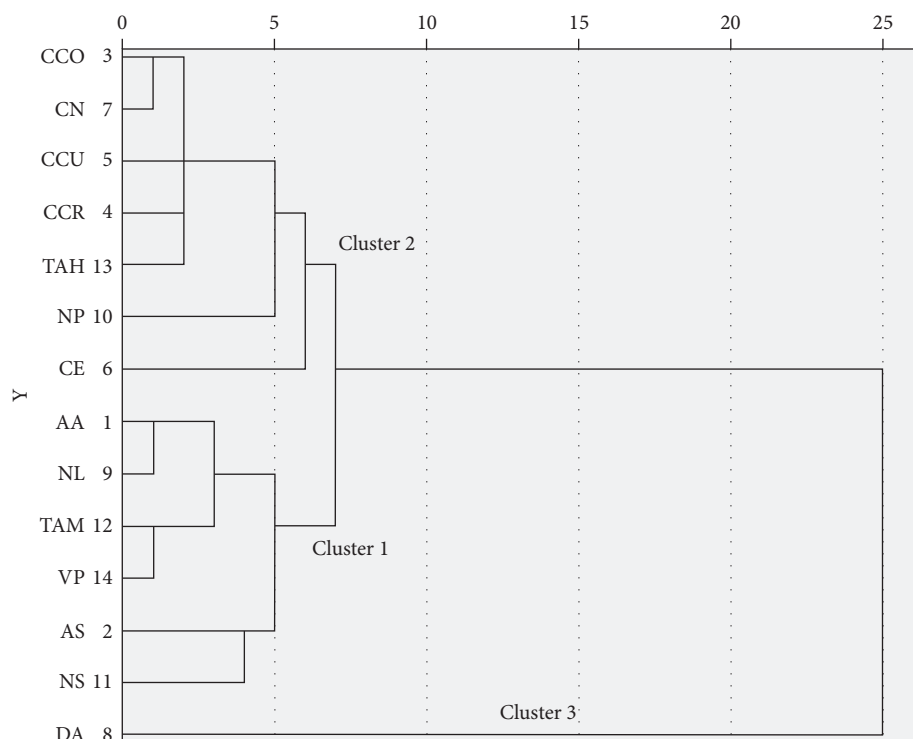


FIGURE 4: Dendrogram for lichen extracts from cetrarioid clade obtained from the hierarchical cluster analysis. Based on Euclidean distance, HCA examined similarities between lichen species and antioxidant activity. Samples are grouped in clusters in terms of their nearness or similarity. AA (*Allocetraria ambigua*), AS (*Asahinea scholanderi*), CCO (*Cetraria commixta*), CCR (*Cetraria crespoae*), CCU (*Cetraria cucullata*), CE (*Cetraria ericetorum*), CN (*Cetraria nivalis*), DA (*Dactylina arctica*), NL (*Nephromopsis laureri*), NP (*Nephromopsis pallescens*), NS (*Nephromopsis stracheyi*), TAH (*Tuckneraria ahtii*), TAM (*Tuckermannopsis americana*), and VP (*Vulpicida pinastris*).

TABLE 3: *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of clusters of lichen species obtained by hierarchical cluster analysis (HCA).

	Cluster 1A	Cluster 1B	Cluster 2	Cluster 3	<i>p</i> -value*	<i>p</i> -value**
DPPH (IC ₅₀ μg/mL)	832.3 ± 335.4	554.8 ± 260.3	1445.7 ^{a,b,d} ± 506.6	346.3 ± 0.2	0.002	<0.001
ORAC (μmol TE/mg dry extract)	3.3 ^d ± 0.7	1.7 ^{a,d} ± 0.44	1.3 ^{a,d} ± 1.1	8.2 ± 0.1	0.028	<0.001
FRAP (μmol of Fe ²⁺ eq/g sample)	22 ^d ± 7.3	21.8 ^d ± 4.3	10.9 ^{a,d} ± 2.4	29.6 ± 0.2	<0.001	<0.001
Total phenolic content (μg GA/mg)	83.7 ^d ± 0.8	51.6 ^{a,d} ± 6.3	50.4 ^{a,d} ± 11.6	113.5 ± 0.2	<0.001	<0.001

Results were expressed as mean ± SD. * Levene's F test for equality of variances. ** One-way ANOVA test. Statistical significance (*p* < 0.05) is presented in superscripts letter: (a) versus cluster 1A; (b) versus cluster 1B; (c) versus cluster 2, and (d) versus cluster 3.

TABLE 4: Acetylcholinesterase inhibition (IC₅₀ values) and butyrylcholinesterase inhibition (IC₅₀ values) of methanol lichen extracts belonging to cetrarioid clade.

Lichen species	AChE IC ₅₀ (mg/mL ± SD)	BuChE IC ₅₀ (mg/mL ± SD)
<i>Allocetraria ambigua</i> (C. Bab.) Kurok. and M.J. Lai	0.18 ± 0.015 ^b	0.56 ± 0.016 ^{b,e,h,k}
<i>Asahinea scholanderi</i> (Llano)	0.11 ± 0.006	0.29 ± 0.004
<i>Cetraria commixta</i> (Nyl.) Th. Fr	0.35 ± 0.017 ^{a,b,d,e,f,g,h,i,j,l,m,n}	0.49 ± 0.018 ^{b,e,k}
<i>Cetraria crespoae</i> (Barreno and Vazquez) Karnefelt	0.24 ± 0.05 ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,l,m,n}	1.26 ± 0.004 ^{a,b,c,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n}
<i>Cetraria cucullata</i> (Bell.) Ach.	0.18 ± 0.014 ^b	0.31 ± 0.001 ^{b,e,k}
<i>Cetraria ericetorum</i> . Opiz	0.19 ± 0.016 ^b	0.52 ± 0.013 ^{b,e,k}
<i>Cetraria nivalis</i> (L.) Ach	0.16 ± 0.013 ^b	0.75 ± 0.018 ^{a,b,c,e,f,h,i,k,l}
<i>Dactylina arctica</i> (Hook) Nyl.	0.22 ± 0.005 ^{b,g,m}	0.42 ± 0.008 ^{b,e,k}
<i>Nephromopsis laureri</i> (Kremp.) Kurok.	0.17 ± 0.017 ^b	0.65 ± 0.007 ^{b,c,e,f,h,i,k,l}
<i>Nephromopsis pallescens</i> (Schaer.) Y.S. Park	0.22 ± 0.009 ^{b,g,l,m}	0.79 ± 0.025 ^{a,b,c,e,f,h,i,k,l}
<i>Nephromopsis stracheyi</i> (C. Bab.) Müll. Arg.	0.35 ± 0.002 ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,l,m,n}	0.51 ± 0.004 ^{b,d,e,f,h,i,j}
<i>Tuckermannopsis americana</i> (Spreng) Hale	0.17 ± 0.009 ^b	0.49 ± 0.025 ^{b,e,k}
<i>Tuckneraria ahtii</i> Randlane and Saag	0.15 ± 0.003 ^b	0.70 ± 0.006 ^{a,b,c,e,f,h,k,l}
<i>Vulpicida pinastris</i> (Scop.) J.E. Mattsson and M.J. Lai	0.19 ± 0.003 ^b	0.89 ± 0.018 ^{a,b,c,e,f,g,h,i,k,l,m}

Statistical significance (*p* < 0.05) is presented in superscript letters: (a) versus *Allocetraria ambigua*; (b) versus *Asahinea scholanderi*; (c) versus *Cetraria commixta*; (d) versus *Cetraria crespoae*; (e) versus *Cetraria cucullata*; (f) versus *Cetraria ericetorum*; (g) versus *Cetraria nivalis*; (h) versus *Dactylina arctica*; (i) versus *Nephromopsis laureri*; (j) versus *Nephromopsis pallescens*; (k) versus *Nephromopsis stracheyi*; (l) versus *Tuckermannopsis americana*; (m) versus *Tuckneraria ahtii*; (n) versus *Vulpicida pinastris*.

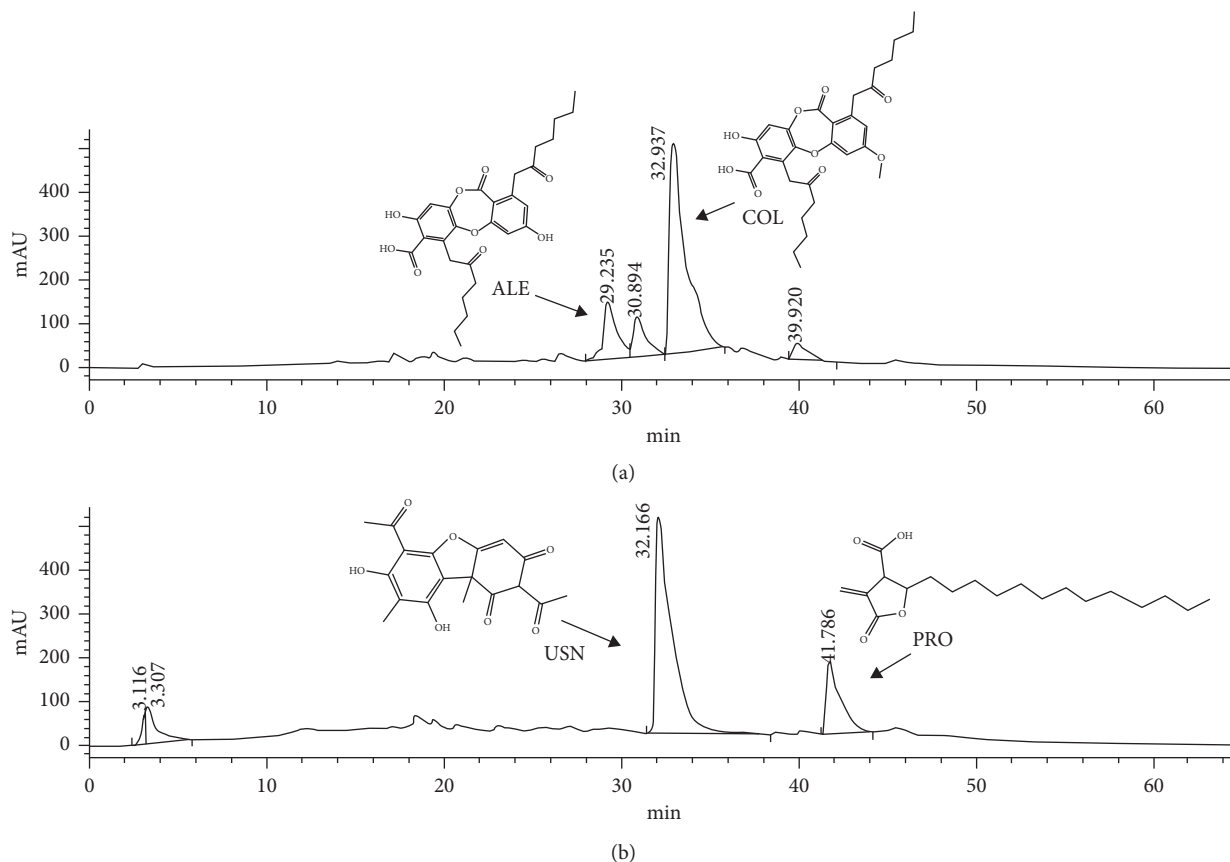


FIGURE 5: Representative HPLC-UV chromatogram ($\lambda = 254$ nm). Injected samples: lichen methanol extracts at $250 \mu\text{g/ml}$ using a gradient elution with a 0.6 ml/min flow rate of 1% orthophosphoric acid in milli-Q water (a) and supergradient HPLC-methanol (b). (a) *Asahinea scholanderi* and (b) *Cetraria cucullata*. Retention times (t_R) for each compound: ALE (29.24 min), COL (32.94 min), USN (32.17 min), and PRO (41.79 min). ALE (alectoronic acid), COL (α -collatolic acid), PRO (protolichesterinic acid), and USN (usnic acid).

TABLE 5: Retention time (t_R , HPLC) and UV spectral data of secondary metabolites identified in methanol extracts of lichens *A. scholanderi* and *C. cucullata*.

Secondary metabolite	Molecular formula	t_R (min)	λ_{max} (nm)
α -Collatolic acid	$\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_9$	32.79 ± 0.2	216/256/ 316
Alectoronic acid	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_9$	29.1 ± 0.18	214/254/ 316
Usnic acid	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$	32.28 ± 0.16	232/282
Protolichesterinic acid	$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_4$	41.48 ± 0.4	230

TABLE 6: Predicted binding affinity between the compounds and the AChE.

Compound	Docking score (kcal/mol)	
	With H_2O	Without H_2O
Acetylcholine	-8.5	-7.4
Donepezil	-18.5	-15.7
Alectoronic acid	-10.8	-11.1
Atranorin	-8.7	-8.8
(2S,3R)-Protolichesterinic acid	-8.4	-7.9
Alpha-collatolic acid	-7.2	-9.9
Usnic acid	-5.2	-6.9

inhibitory activity. However, *Cetraria crespoae* ($\text{IC}_{50} = 1.26 \text{ mg/ml}$), *Vulpicida pinastri* ($\text{IC}_{50} = 0.89 \text{ mg/ml}$), and *Nephromopsis pallescens* ($\text{IC}_{50} = 0.79 \text{ mg/ml}$) presented the lowest inhibitory activity of BuChE. The enzyme inhibitory activity for all methanol lichen extracts was high for AChE than for BuChE.

Previous studies showed AChE and BuChE inhibition potential of different lichen extracts. Hence, *Hypotrachyna formosana* inhibited AChE (31.8% for $25 \mu\text{g/ml}$, 39.5% for $50 \mu\text{g/ml}$, and 45.7% for $100 \mu\text{g/ml}$) and with less potency

the enzyme BuChE (24.4% for $25 \mu\text{g/ml}$, 35.2% for $50 \mu\text{g/ml}$, and 41.2% for $100 \mu\text{g/ml}$) [31]. Also, Lee et al. reported AChE inhibition properties for *Umbilicaria esculenta* (22.4% for 1 mg/ml) [42]. However, although previous works have investigated AChE and BuChE inhibitory activity, research is very recent and limited.

The most active species on enzyme inhibition were *Cetraria cucullata* and *Asahinea scholanderi*. Identifying their secondary metabolites was carried out through HPLC analysis. Chemical composition analysis revealed as major secondary metabolites alectoronic acid (ALE) and α -collatolic acid (COL) in *A. scholanderi* (Figure 5(a)), and usnic

TABLE 7: Predicted binding affinity between the compounds and the BuChE.

Compound	Docking score (kcal/mol)	
	With H ₂ O	Without H ₂ O
Acetylcholine	-4.1	-5.1
N-((1-(2,3-Dihydro-1H-inden-2-yl) piperidin-3-yl) methyl)-N-(2-(dimethylamino) ethyl)-2-naphthamide	-15.9	-10.5
Alectoronic acid	-6.2	-6.6
Atranorin	-6.2	-6.9
(2S,3R)-Protolichesterinic acid	-5.4	-5.7
Alpha-collatolic acid	-5.5	-6.7
Usnic acid	-4.3	-7.5

acid (USN) and protolichesterinic acid (PRO) in *C. cucullata* (Figure 5(b)). Main peaks were identified by comparing their

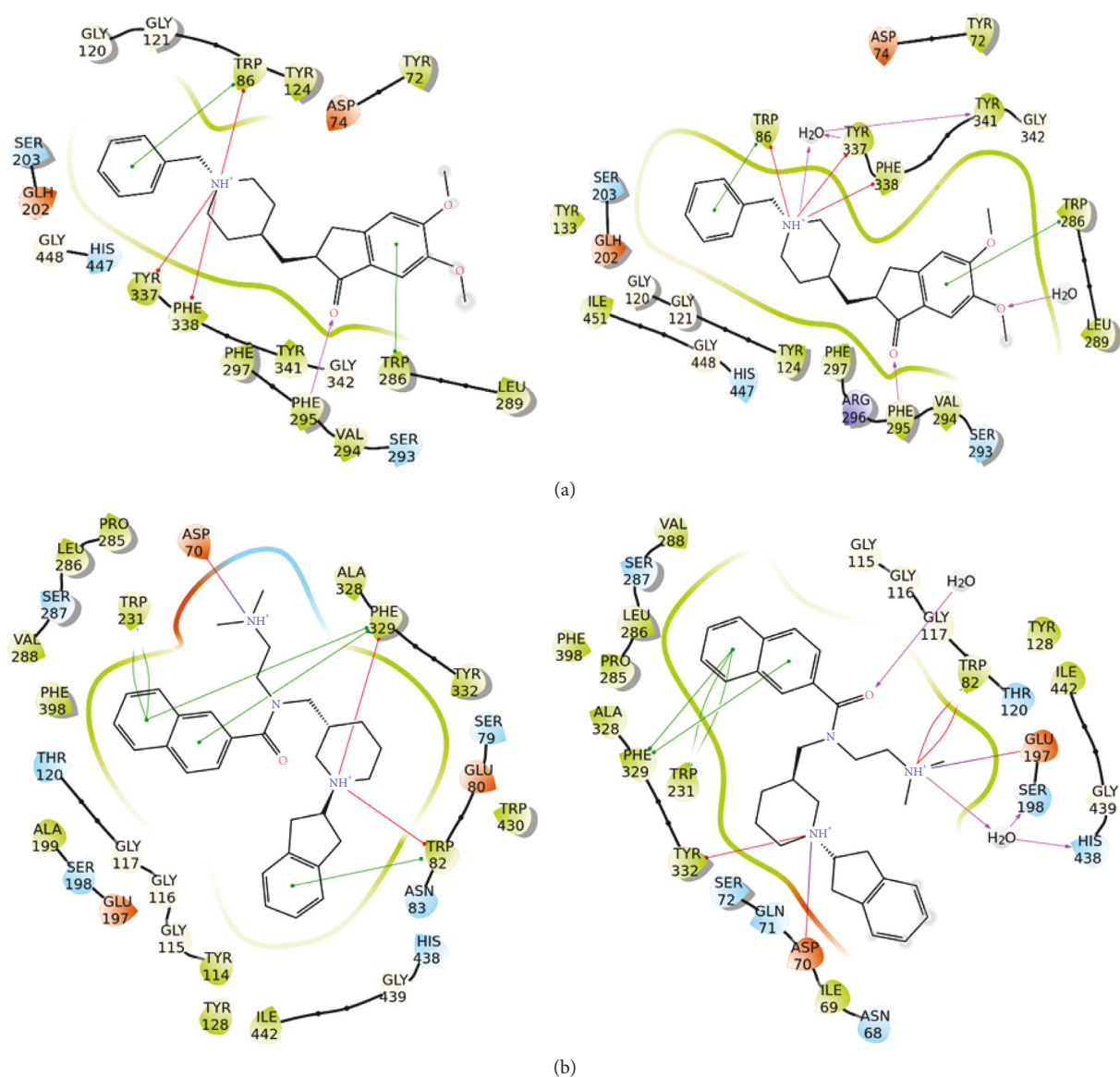


FIGURE 6: Protein-ligand interactions of the complexes formed by (a) AChE and donepezil and (b) BuChE and N-((1-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl) piperidin-3-yl) methyl)-N-(2-(dimethylamino) ethyl)-2-naphthamide with (right panels) and without water molecules (left panels) inside the binding pocket. Hydrogen bonds are represented by pink arrows, π - π stackings are represented by green lines, red lines are π -cation interactions, and red-to-blue lines are salt bridges. Hydrophobic residues are in green, polar residues are in cyan, negatively charged residues are in red, positively charged ones are in blue, and glycine residues and water molecules are in white.

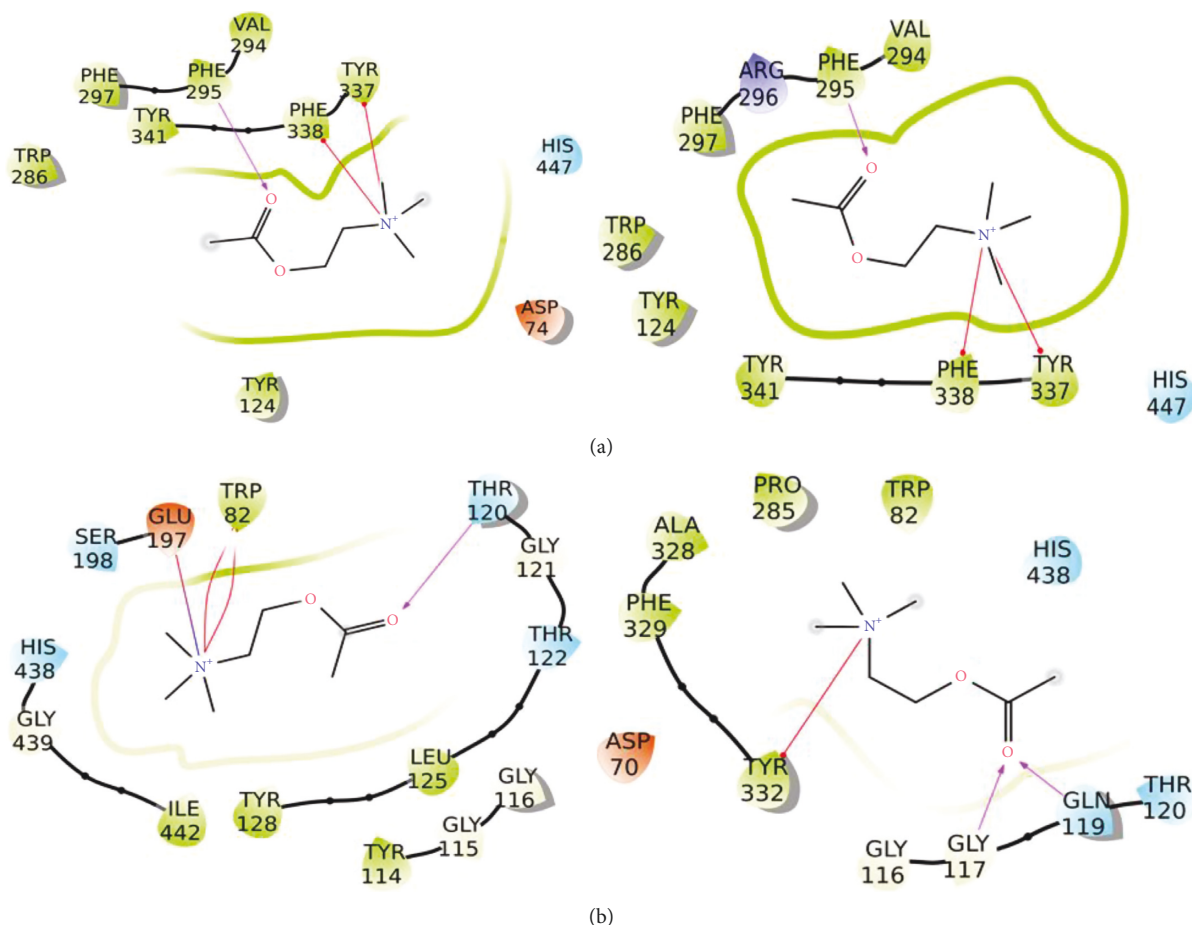


FIGURE 7: Protein-ligand interactions of acetylcholine with (a) AChE and (b) BuChE with (right panels) and without water molecules (left panels) inside the binding pocket. Hydrogen bonds are represented by pink arrows, red lines are π -cation interactions, and red-to-blue lines are salt bridges. Hydrophobic residues are in green, polar residues are in cyan, negatively charged residues are in red, positively charged ones are in blue, and glycine residues are in white.

retention times with pure compounds (and lichen extracts with known composition) used as standards. Retention times, λ maximum spectra, and molecular formula are also included in Table 5.

To better understand how the major secondary metabolites identified in *Asahinea scholanderi* (alecoronic acid and α -collatolic acid) and *Cetraria cucullata* (usnic acid and protolichesterinic acid) could inhibit AChE and BuChE enzymes, molecular docking studies were performed. Initially, Ach and the co-crystallized ligands were docked and re-docked against both AChE and BuChE. The binding was investigated with and without water molecules. In detail, the absolute binding affinity of Ach was higher for AChE (both hydrated and dehydrated) than for BuChE (Tables 6 and 7). The differences in pattern interaction with or without solvent molecules were evident in AChE, where Ach was better oriented in the hydrated binding site. In the case of co-crystallized molecules, both showed good re-docking results in terms of binding affinity and interactions with target (Tables 6 and 7, Figure 6). Moreover, the water network drove the compound in correct orientation in BuChE, creating a perfect overlapping between the docking pose and the co-crystallized ligand.

For AChE, the key interactions inside the binding pocket are Trp86, Trp286, Tyr337, and Phe338 (π - π stacking); Tyr341 (hydrophobic); Tyr72, Ser293, and Phe295 (H-bond), and Ser203 and His447 (catalytic site). Among secondary metabolites, the highest affinity for AChE was found for alecoronic acid in the presence and absence of water molecules. This affinity and interaction network were similar and even superior to that of Ach (Figures 7 and 8; Table 6). However, donepezil which is clinically indicated for the treatment of Alzheimer's disease is more effective against AChE (docking score -18.5 kcal/mol with water and -15.7 kcal/mol without water) due to the presence of a positively charged nitrogen that promotes additional hydrogen bonds and π -cation interactions with the target (Figure 6(a)). Though results are not comparable to donepezil, alecoronic acid is a promising drug candidate to inhibit AChE. On the other hand, (2S,3R)-protolichesterinic acid is well inserted in the hydrophobic binding pocket; however, its moderate binding affinity and limited interactions with key amino acids discourage the hypothesis of a relevant binding to AChE (Figure S2).

For BuChE, the binding cavity is delimited by Asn68, Asp74, Trp86, Gln119, Ser198, Trp231, Ala277, Leu286,

inhibitory activity against AChE (IC_{50} of 27.1 $\mu\text{g/ml}$) [45]. Also, lobaric acid, isolated from *Heterodermia* sp., inhibited AChE (IC_{50} of 26.86 μM) and BuChE (IC_{50} of 36.76 μM) [46]. Moreover, a new diacetate depsidone identified in *Lobaria pulmonaria* showed a moderate activity in AChE inhibition assays [47]. Indeed, docking studies with depsidones showed that depsidone scaffold could be used for the design of AChE inhibitors [45, 48].

Docking results can be related to *in vitro* enzyme inhibition assays. AChE inhibition values were better than BuChE, and moreover, docking scores for their compounds showed that less energy would be necessary for bonding with AChE. Indeed, *in vitro* assays showed that *A. scholanderi* has more activity than *C. cucullata* on both enzymes. Identified compounds of *A. scholanderi* (alectoronic acid and α -collatolic acid) showed better docking scores than *C. cucullata* ones (protolichesterinic acid and usnic acid).

4. Conclusions

Fourteen methanol extracts from lichens of cetrarioid clade were evaluated for its antioxidant capacity using multivariate statistical techniques and cholinesterase inhibitory activities combined with molecular docking. *Dactylina arctica* showed the highest total phenolic content and the highest ORAC value and FRAP value. Using PCA, 87.03% of the total variance was explained by two principal components. Moreover, HCA grouped lichen species into three clusters, highlighting the one that includes only the species *Dactylina arctica*, due to their antioxidant activity and total phenolic content, higher than the others.

On the other hand, *Asahinea scholanderi* and *Cetraria cucullata* extracts were the best inhibitors of AChE and BuChE. HPLC studies revealed that the major secondary metabolites of these lichen species were alectoronic acid and α -collatolic acid for *Asahinea scholanderi* and usnic acid and protolichesterinic acid for *Cetraria cucullata*. Molecular docking studies revealed that the compound alectoronic acid exhibited strong interactions with both AChE and BuChE with and without water molecules in the binding site. The compound (2S,3R)-protolichesterinic acid may also lead to good results as cholinesterase inhibitor because of the high lipophilicity of the binding cavity.

Our results concluded that *Dactylina arctica* stands out for its higher antioxidant capacities, followed by *Nephromopsis stracheyi*, *Tuckermannopsis americana*, *Vulpicida pinastri*, and *Asahinea scholanderi*, and the extracts *Asahinea scholanderi* and *Cetraria cucullata* act as AChE and BuChE inhibitors, being mandatory further investigation in cell culture and *in vivo* models to show their potential effectiveness in the treatment of neurodegenerative diseases.

Abbreviations

Ach: Acetylcholine
ANOVA: One-way analysis of variance
AChE: Acetylcholinesterase
BuChE: Butyrylcholinesterase

DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EAP: Extract antioxidant potency
FRAP: Ferric-reducing antioxidant power
GA: Gallic acid
HCA: Hierarchical cluster analysis
ORAC: Oxygen radical absorbance capacity
ROS: Reactive oxygen species
PCA: Principal component analysis
TPC: Total phenolic content.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Authors' Contributions

Isabel Ureña-Vacas was involved in conceptualization, investigation, formal analysis, data curation, and original draft writing. Elena González-Burgos contributed to investigation, formal analysis, validation, original draft preparation, and supervision. Simona Da Vita was involved in investigation, formal analysis, validation, and original draft writing. P.K. Divakar reviewed and edited the manuscript and did project administration. Giuseppe Bifulco was involved in conceptualization, reviewing and editing the manuscript, and supervision. M. Pilar Gómez-Serranillos: was involved in conceptualization, reviewing and editing the manuscript, and supervision.

Acknowledgments

The authors are thankful for the financial support from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (PID2019-105312GB-I00) and the Santander-University Complutense of Madrid project (PR87/19-22637). I.M.U.V. thanks the University Complutense of Madrid for her predoctoral research grant CT42/18-CT43/18.

Supplementary Materials

Figure S1: Scree plot and % of variance of the principal components extracted. Figure S2: protein-ligand interactions for (2S, 3R)-protolichesterinic acid with AChE with (A) and without (B) water molecules included in the binding site. The only hydrogen bond is represented by a pink arrow. Hydrophobic residues are in green, polar residues are in cyan, negatively charged residues are in red, positively charged ones are in blue, and glycine residues are in white. Figure S3: protein-ligand interactions for (2S,3R)-protolichesterinic acid with BuChE with (A) and without (B) water molecules included in the binding site. The only hydrogen bond is represented by a pink arrow. Hydrophobic residues are in green, polar residues are in cyan, negatively charged residues are in red, and glycine residues and water

molecules are in white. Table S1: component's accountability (%) and quality of representation of each variable by the PCA model. Table S2: quality of representation for observations by the PCA model. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] M.-X. Yang, S. Devkota, L.-S. Wang, and C. Scheidegger, "Ethnolichenology—the use of lichens in the himalayas and southwestern parts of China," *Diversity*, vol. 13, no. 7, p. 330, 2021.
- [2] A. Thell, A. Crespo, P. K. Divakar et al., "A review of the lichen family parmeliaceae - history, phylogeny and current taxonomy," *Nordic Journal of Botany*, vol. 30, no. 6, pp. 641–664, 2012.
- [3] M. R. González-Tejero, M. J. Martínez-Lirola, M. Casares-Porcel, and J. Molero-Mesa, "Three lichens used in popular medicine in Eastern Andalucía (Spain)," *Economic Botany*, vol. 49, no. 1, pp. 96–98, 1995.
- [4] A. Agelet and J. Vallès, "Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of pallars (pyrenees, catalonia, iberian peninsula). part iii. medicinal uses of non-vascular plants," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 84, no. 2-3, pp. 229–234, 2003.
- [5] B. Kosanić and M. Kosanic, "Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites," in *Lichen Secondary Metabolites. Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*, pp. 1–26, Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 2015.
- [6] E. A. Yeash, L. Letwin, L. Malek, Z. Suntres, K. Knudsen, and L. P. Christopher, "Biological activities of undescribed North American lichen species," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 97, no. 14, pp. 4721–4726, 2017.
- [7] A. Dieu, L. Mambu, Y. Champavier et al., "Antibacterial activity of the lichens usnea florida and flavoparmelia caperata (parmeliaceae)," *Natural Product Research*, vol. 34, no. 23, pp. 3358–3362, 2019.
- [8] B. Emsen, O. Ozdemir, T. Engin, B. Togar, S. Cavusoglu, and H. Turkez, "Inhibition of growth of U87MG human glioblastoma cells by usnea longissima Ach," *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 91, no. 3, Article ID e20180994, 2019.
- [9] E. González-Burgos, C. Fernández-Moriano, and M. P. Gómez-Serranillos, "Current knowledge on parmelia genus: ecological interest, phytochemistry, biological activities and therapeutic potential," *Phytochemistry*, vol. 165, Article ID 112051, 2019.
- [10] C. Fernández-Moriano, P. K. Divakar, A. Crespo, and M. P. Gómez-Serranillos, "Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two parmeliaceae lichens: identification of active compounds," *Phytomedicine*, vol. 22, no. 9, pp. 847–855, 2015.
- [11] I. Liguori, G. Russo, F. Curcio et al., "Oxidative stress, aging, and diseases," *Clinical Interventions in Aging*, vol. 13, pp. 757–772, 2018.
- [12] J. N. Copley, G. L. Close, D. M. Bailey, and G. W. Davison, "Exercise redox biochemistry: conceptual, methodological and technical recommendations," *Redox Biology*, vol. 12, pp. 540–548, 2017.
- [13] J. Luo, K. Mills, S. le Cessie, R. Noordam, and D. van Heemst, "Ageing, age-related diseases and oxidative stress: what to do next?" *Ageing Research Reviews*, vol. 57, Article ID 100982, 2020.
- [14] P. R. Venskutonis, "Food additives: the dilemma of synthetic or natural," *Acta Alimentaria Hung*, vol. 33, pp. 1–5, 2004.
- [15] R. Chakraborty, S. Sen, C. Sridhar, Y. S. R. Reddy, and B. De, "Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect," *International Journal of Pharmaceutical Sciences Reviews and Research*, vol. 3, pp. 91–100, 2010.
- [16] R. S. Miguel-Chávez, "Phenolic antioxidant capacity: a review of the state of the art," in *Phenolic Compounds—Biological Activity* InTech, Rijeka, Croatia, 2017.
- [17] A. A. Rao, G. R. Sridhar, and U. N. Das, "Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and alzheimer's disease," *Medical Hypotheses*, vol. 69, no. 6, pp. 1272–1276, 2007.
- [18] F. Saura-Calixto, J. Serrano, and I. Goñi, "Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet," *Food Chemistry*, vol. 101, no. 2, pp. 492–501, 2007.
- [19] A. Avan, S. Demirci Çekiç, S. Uzunboy, and R. Apak, "Spectrophotometric determination of phenolic antioxidants in the presence of thiols and proteins," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 8, p. 1325, 2016.
- [20] R. Amarowicz, R. B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, and J. A. Weil, "Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the canadian prairies," *Food Chemistry*, vol. 84, no. 4, pp. 551–562, 2004.
- [21] A. Dávalos, C. Gómez-Cordovés, and B. Bartolomé, "Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC—fluorescein) assay," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 1, pp. 48–54, 2004.
- [22] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochemical Pharmacology*, vol. 7, no. 2, pp. 88–90, 1961.
- [23] G. Amo de Paz, J. Raggio, M. P. Gómez-Serranillos et al., "HPLC isolation of antioxidant constituents from xanthoparmelia spp.," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 53, no. 2, pp. 165–171, 2010.
- [24] C. Fernández-Moriano, P. K. Divakar, A. Crespo, and M. P. Gómez-Serranillos, "Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 105, pp. 262–277, 2017.
- [25] O. Gerlits, K.-Y. Ho, X. Cheng et al., "A new crystal form of human acetylcholinesterase for exploratory room-temperature crystallography studies," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 309, Article ID 108698, 2019.
- [26] U. Košak, B. Brus, D. Knez et al., "The magic of crystal structure-based inhibitor optimization: development of a butyrylcholinesterase inhibitor with picomolar affinity and in vivo activity," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 61, no. 1, pp. 119–139, 2017.
- [27] G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, and W. Sherman, "Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments," *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, vol. 27, no. 3, pp. 221–234, 2013.
- [28] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy et al., "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. method and assessment of docking accuracy," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 47, no. 7, pp. 1739–1749, 2004.
- [29] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky et al., "Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein–ligand complexes," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 49, no. 21, pp. 6177–6196, 2006.
- [30] T. A. Halgren, R. B. Murphy, R. A. Friesner et al., "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2.

- enrichment factors in database screening,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 47, no. 7, pp. 1750–1759, 2004.
- [31] V. Sieteiglesias, E. González-Burgos, P. Bermejo-Bescós, P. K. Divakar, and M. P. Gómez-Serranillos, “Lichens of parmelioid clade as promising multitarget neuroprotective agents,” *Chemical Research in Toxicology*, vol. 32, no. 6, pp. 1165–1177, 2019.
- [32] M. N. Alam, N. J. Bristi, and M. Rafiqzaman, “Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity,” *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 21, no. 2, pp. 143–152, 2013.
- [33] D. Grujičić, I. Stošić, M. Kosanić, T. Stanojković, B. Ranković, and O. Milošević-Djordjević, “Evaluation of in vitro antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *cetraria islandica*,” *Cytotechnology*, vol. 66, no. 5, pp. 803–813, 2014.
- [34] B. Legouin, F. Lohézic-Le Dévéhat, S. Ferron et al., “Specialized metabolites of the lichen *vulpicida pinastris* act as photoprotective agents,” *Molecules*, vol. 22, no. 7, p. 1162, 2017.
- [35] C. Fernández-Moriano, M. P. Gómez-Serranillos, and A. Crespo, “Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. a systematic review,” *Pharmaceutical Biology*, vol. 54, no. 1, pp. 1–17, 2016.
- [36] C. Rice-Evans and N. Miller, “Measurement of the antioxidant status of dietary constituents, low density lipoproteins and plasma,” *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 57, no. 4-5, pp. 499–505, 1997.
- [37] M. Mendili, M. Bannour, M. E. M. Araújo, S. Aschi-Smiti, M. R. D. Seaward, and A. Khadhria, “Secondary metabolites and antioxidant capacity of the tunisian lichen *diploschistes ocellatus* (ascomycota),” *International Journal of Medicinal Mushrooms*, vol. 21, no. 8, pp. 817–823, 2019.
- [38] F. Husson, S. Le, and J. Pagès, *Exploratory Multivariate Analysis by Example Using Rp*. 230, 2nd edition, Chapman and Hall/CRC, London, UK, 2017.
- [39] C. M. Plaza, L. E. D. De Torres, R. K. Lücking, M. Vizcaya, and G. E. Medina, “Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from venezuelan andes,” *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, vol. 2, no. 5, pp. 138–147, 2014.
- [40] J. Azieana, M. N. Zainon, and A. Noriham, “Total phenolic and flavonoid content and antioxidant activities of ten malaysian wild mushrooms,” *Open Access Library*, vol. 4, no. 11, pp. 1–9, 2017.
- [41] P. K. Divakar, A. Crespo, E. Kraichak et al., “Using a temporal phylogenetic method to harmonize family- and genus-level classification in the largest clade of lichen-forming fungi,” *Fungal Diversity*, vol. 84, no. 1, pp. 101–117, 2017.
- [42] J.-S. Lee, G.-H. Min, and J.-S. Lee, “Nutritional and physicochemical characteristics of the antidementia acetylcholinesterase-inhibiting methanol extracts from *umbilicaria esculenta*,” *Mycobiology*, vol. 37, no. 3, pp. 203–206, 2009.
- [43] E. De la Mora, S. N. Dighe, G. S. Deora, B. P. Ross, F. Nachon, and X. Brazzolotto, “Discovery and structure-activity relationships of a highly selective butyrylcholinesterase inhibitor by structure-based virtual screening,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 59, no. 16, pp. 7683–7689, 2016.
- [44] K. Cetin Cakmak and İ. Gülçin, “Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid-an activity-structure insight,” *Toxicology reports*, vol. 6, pp. 1273–1280, 2019.
- [45] H. Luo, C. Li, and J. C. Kim, “Biruloquinone, an acetylcholinesterase inhibitor produced by lichen-forming fungus *cladonia macilenta*,” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, no. 2, pp. 161–166, 2013.
- [46] V. M. Thadhani, Q. Naaz, M. I. Choudhary, A. M. Mesaik, and V. Karunaratne, “Enzyme inhibitory and immunomodulatory activities of the depsidone lobaric acid extracted from the lichen *Heterodermia* sp,” *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, vol. 42, no. 2, pp. 193–196, 2014.
- [47] B. Pejin, G. Tommonaro, C. Iodice, V. Tesevic, and V. Vajs, “Acetylcholinesterase inhibition activity of acetylated depsidones from *lobaria pulmonaria*,” *Natural Product Research*, vol. 26, no. 17, pp. 1634–1637, 2012.
- [48] A. Ece and B. Pejin, “A computational insight into acetylcholinesterase inhibitory activity of a new lichen depsidone,” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 30, no. 4, pp. 528–532, 2015.

Supplementary Tables

Supplementary **Table 1.** Component's accountability (%) and quality of representation of each variable by the PCA model

Variables	Component's accountability (%)		Quality of representation(cos ²)	
	PC1	PC2	PC1	PC2
DPPH	20.874	49.164	0.579	0.347
ORAC	26.265	14.178	0.729	0.100
FRAP	27.424	7.609	0.761	0.054
TPC	25.438	29.048	0.706	0.205

Supplementary **Table 2.** Quality of representation for observations.

Observations	Quality of representation (cos ²)	
	PC1	PC2
AA	0.015	0.731
AS	0.342	0.448
CCO	0.907	0.038
CCR	0.647	0.210
CCU	0.940	0.048
CE	0.122	0.002
CN	0.851	0.102
DA	0.916	0.073
NL	0.040	0.885
NP	0.156	0.001
NS	0.951	0.000
TAM	0.511	0.429
TAH	0.508	0.269
VP	0.168	0.784

Abbreviations: AA (*Alloctraria ambigua*), AS (*Asahinea scholanderi*), CCO (*Cetraria commixta*), CCR (*Cetraria crespoae*), CCU (*Cetraria cucullata*), CE (*Cetraria ericetorum*), CN (*Cetraria nivalis*), DA (*Dactylina arctica*), NL (*Nephromopsis laureri*), NP (*Nephromopsis pallescens*), NS (*Nephromopsis stracheyi*), TAH (*Tuckneraria ahtii*), TAM (*Tuckermannopsis americana*), VP (*Vulpicida pinastri*).

Capítulo 3

Validación farmacológica en modelo celular de la actividad anticolinesterásica de extractos y compuestos más prometedores

Publicación enviada

Discovery of Natural Acetylcholinesterase inhibitors from the Cetrarioid lichens *Cetraria cucullata* and *Asahinea scholanderi* and its secondary metabolites

Discovery of Natural Acetylcholinesterase inhibitors from the Cetrarioid lichens *Cetraria cucullata* and *Asahinea scholanderi* and its secondary metabolites

Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP.

Formato: Communication. Enviado para publicar (2023)

Discovery of Natural Acetylcholinesterase inhibitors from the Cetrarioid lichens *Cetraria cucullata* and *Asahinea scholanderi* and its secondary metabolites.

Isabel Ureña-Vacas, Elena González-Burgos *, Pradeep Kumar Divakar and María Pilar Gómez-Serranillos

Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy-Complutense University of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain; isabelur@ucm.es (I.U.-V.); pkdivaka@ucm.es (P.K.D.); pserra@ucm.es (M.P.G.-S.)

* Correspondence: elenagon@ucm.es

Abstract: Finding effective therapies against Alzheimer's disease progression is one of the most challenging tasks for XXI-Century science. The limited therapeutic options create a harsh scenario for the coming years. Among the approved drugs to slow down the progression of this disease are included the cholinesterase enzyme inhibitors. New and safer compounds are being investigated from nature. Lichens stand out for the singularity of their chemical composition that have shown different therapeutical applications. Previous work has demonstrated the *in vitro* and *in silico* anti-acetylcholinesterase (AChE) activity of *Cetraria cucullata*, *Asahinea scholanderi* and its secondary metabolites. The aim of this work is to study for the first time the effects of lichen extracts and pure compounds (usnic acid from *C. cucullata*, and alectoronic acid from *A. scholanderi*) on AChE activity and relative AChE protein expression in the human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line in order to validate computational methods. Our results confirmed that the depsidone alectoronic acid is the best inhibitor of AChE at non-cytotoxic concentrations. Moreover, this lichen compound reduced AChE protein expression. On the other hand, usnic acid significantly down-regulated relative AChE protein expression which was not extrapolated to activity. In addition, H₂O₂ activated the enzyme without modifying its expression at 250 μM. In an oxidative stress-induced situation, alectoronic acid significantly inhibited H₂O₂-activated AChE, reversing the toxic effects. Further studies on AChE inhibition nature and enzyme localization in AChE activity are needed to comprehend the mechanisms involved in the process.

Keywords: Lichens, neuroprotection, acetylcholinesterase; Alzheimer's disease.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a leading cause of dementia, accounting for 70-80% of all cases [1]. As a progressive and irreversible neurodegenerative disorder, AD is characterized by cognitive impairment that leads to debilitating symptoms such as memory loss, changes in behavior and mood, disorientation, and difficulty with language and daily tasks. These symptoms ultimately make it difficult for patients to lead normal lives and can even result in death [2,3]. The prevalence of AD increases exponentially with age. As life expectancy continues to rise, AD is becoming one of the major challenges facing society from social, health, economic, and psychological perspectives [4].

The complex pathogenesis of Alzheimer's disease makes it a difficult to find effective and relevant therapies. Multiples approaches based on the main hallmarks of this disease are being pursued. These include the clearance of beta-amyloid (A β) plaques and intracellular hyperphosphorylated tau proteins, reduction of oxidative stress and neuroinflammation, and mitigation of mitochondrial dysfunction. Despite significant research in these areas, no significant results have yet been achieved [1,3]. Furthermore, cholinergic transmission is severely impaired in AD patients, in whom choline acetyltransferase levels is found to be decreased, choline uptake is reduced, and acetylcholine degradative enzymatic activity (AChE and BuChE) is increased. In addition, loss of cholinergic neurons and both muscarinic and nicotinic cholinergic receptors have also been detected [5].

Due to the overwhelming impact of the disease, current research is aimed at alleviating the progression of symptoms or treating the underlying biology of the disease. Currently, the only

commercial available drugs are cholinesterase enzyme inhibitors (ChEIs) (donepezil, galantamine and rivastigmine) and a NMDA receptor antagonist (memantine) [6]. The United States Food and Drug Administration (FDA) recently has approved aducanumab, a monoclonal antibody that helps to clear amyloid plaques by attaching amyloid beta. However, the European Medicine Agency (EMA) has refused to authorize it due to lack of benefit /risk balance [7]. Therefore, cholinesterase inhibitors remain to the primary therapy in early and moderate stages of the disease.

The two-membered family of cholinesterase (AChE and BuChE) are serine hydrolases. AChE catalyzes the degradation of acetylcholine to choline in cholinergic synapsis in the central and peripheral nervous system and it is one of the most efficient enzymes based on its high catalytic rate [8,9]. The responsible sites on molecular recognition and substrate or ligand binding are the catalytic active site (CAS) and the peripheral aromatic site (PAS) [8]. AChE inhibitors interact with the catalytic action of the enzyme through competitive inhibition and pseudo-irreversible inhibition, which have a short action, and irreversible inhibition with more central nervous system selectivity and percentage of inhibition in brain [10]. There are three forms of AChE, due to alternative mRNA splicing, which differ in their role and regulation: AChE-T (or -S for synaptic), AChE-H and AChE-R [11]. Moreover, others non-canonical functions of AChE have been reported [12]. AChE is also involved in apoptosis displaying a proapoptotic function through its involvement in apoptosome formation. AChE deficiency or down-regulated AChE expression made cells less sensitivity to apoptotic stimuli [13].

Some of the commercial ChEIs drugs have been associated with weight loss, anorexia and gastrointestinal issues, leading to an increase of research into safer natural-origin products [1]. Several natural products have been identified as potential anticholinesterase agents, such as quercetin, vanillin, caffeic and rosmarinic acid [14-16].

The lichens are made up of a photobiont (algae/ cyanobacterium) and a mycobiont (Ascomycota and Basidiomycota phylum) as main partners, together with specific bacterial microbiomes and lichenicolous fungi [17,18]. The interest in lichens in different research areas has increased in the last recent years. Particularly, lichens present in their composition secondary metabolites (depsides, dibenzofurans, depsidones and vulpinic acids) that are unique and that have shown anti-inflammatory, antidiabetic, antioxidant, cytotoxic, photoprotective and neuroprotective activities [19]. The singularity and uniqueness of some of lichen secondary metabolites have made their studies in diverse biological models like neurodegenerative ones, essential [20].

Previous works of our research group have shown in a preliminary screening of a total of fourteen species of lichens of the cetrarioid clade that the methanol extracts of *Asahinea scholanderi* (Llano) Culb. & C. Culb and *Cetraria cucullata* (Bellardi) Ach. had the highest AChE inhibitory activities [21]. The aim of the present study is to analyze for the first time the effects of lichen extracts and pure compounds (usnic acid from *C. cucullata*, and alectoronic acid from *A. scholanderi*) on AChE activity and relative AChE protein expression in the human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line, in order to validate computational methods (**Figure 1**)

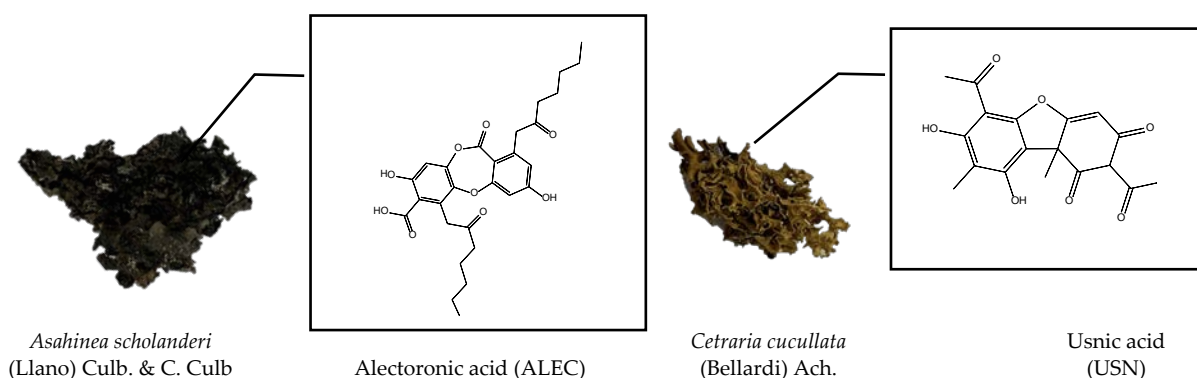


Figure 1. Lichen thallus and chemical structures of studied compounds.

2. Materials and Methods

2.1. Lichen materials and pure compounds

For this study, the cetrarioid lichens *Cetraria cucullata* (Bell.) Ach. (Krefelder Hütte, Austria, July 1973; MAF-Lich 11754) (CC) and *Asahinea scholanderi* (Russia, Agosto 1995; MAF-Lich 95154) (AS) were selected. Identification and authentication were conducted by Dr. P.K. Divakar and Professor A. Crespo. Samples were preserved in the Herbarium of Faculty of Pharmacy (MAF) at Complutense University of Madrid (Spain). Alecoronic acid (ALEC) was isolated from *Cetrelia brausiana* (Mull. Arg) W.L. Culb & C.F. Culb. (W. Himalaya, Knoschula Khark (India), August 2006, MAF-LICH 16943)) and usnic acid (USN) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Cell culture and treatments

Human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) was cultured in DMEM, containing 10% of fetal bovine serum (FBS) and 5% gentamicin at 37°C in a humidified atmosphere with and 5% CO₂/95% air. Culture reagents and materials were purchased from Cultex Laboratories GmbH (Hanover, Germany). For treatments, lichen extracts (1 mg/mL) and pure compounds (10 mM) were dissolved in DMSO (Panreac, Barcelona, Spain) and PBS as stock and serial dilutions were made in medium. Final DMSO concentration was lower than 0.1% at the highest concentration. The pathological model was induced using with H₂O₂ (250 µM, 1 h) acquired in Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3 AChE activity evaluation

The AChE activity was evaluated using colorimetric Ellman method with some modifications. Absorbance was measured at 412 nm every 10 min during 1 h with a SPECTROstar BMG microplate reader [22]. Results were expressed in optical density (OD)/minute(m)/mg protein. Protein levels were determined using the bicinchoninic acid method with bovine serum albumin as standard [23]. All reagents were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.4 Western blotting

After treatments, cellular extracts were prepared with buffer TRIS-HCl (pH 7.4), 1% Triton, 10mM EDTA, 50mM NaCl and the proteins inhibitors [PMSF (35µL/mL), leupeptin (20 µL/mL) and pepstatin (10µL/mL)] (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA). Then, centrifuged at 13,000 g at 4 °C for 5 min. Extracts containing 20µg were resolved by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and then transferred onto a PVDF membranes. After blocking with EveryBlot Blocking Solution (Bio-Rad Laboratories, California, USA), membranes were incubated at 4°C overnight with anti-AChE (1:1000) or anti-β-actin (1:50,000). The blots were incubated with the corresponding secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase for 2 h at room temperature (Santa Cruz Biotechnology, Quimigen, Madrid, Spain). Immunosignals were revealed with ECL Prime detection kit (GE Healthcare, UK) using an Image Quant LAS500 analyzer (GE Healthcare). For semiquantitative analysis, protein levels were normalized to β-actin and intensity of bands were measured using ImageJ software (version 2.1.0).

2.5 Statistical analysis

All data were analyzed using Sigma Plot 11.0 software. For multiple comparisons, Tukey's post hoc test was performed after one-way analysis of variance (ANOVA). Results were expressed as mean ± SD, with p <0.05 values considered to be significant.

3. Results

3.1. Inhibitory activity of lichen extracts and selected lichen compounds on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line.

Non cytotoxic concentrations of lichen extracts and compounds were selected using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (**Figure 2**), being 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *A. scholanderi*, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. cucullata*, 50 μM for alectoronic acid and 5 μM for usnic acid.

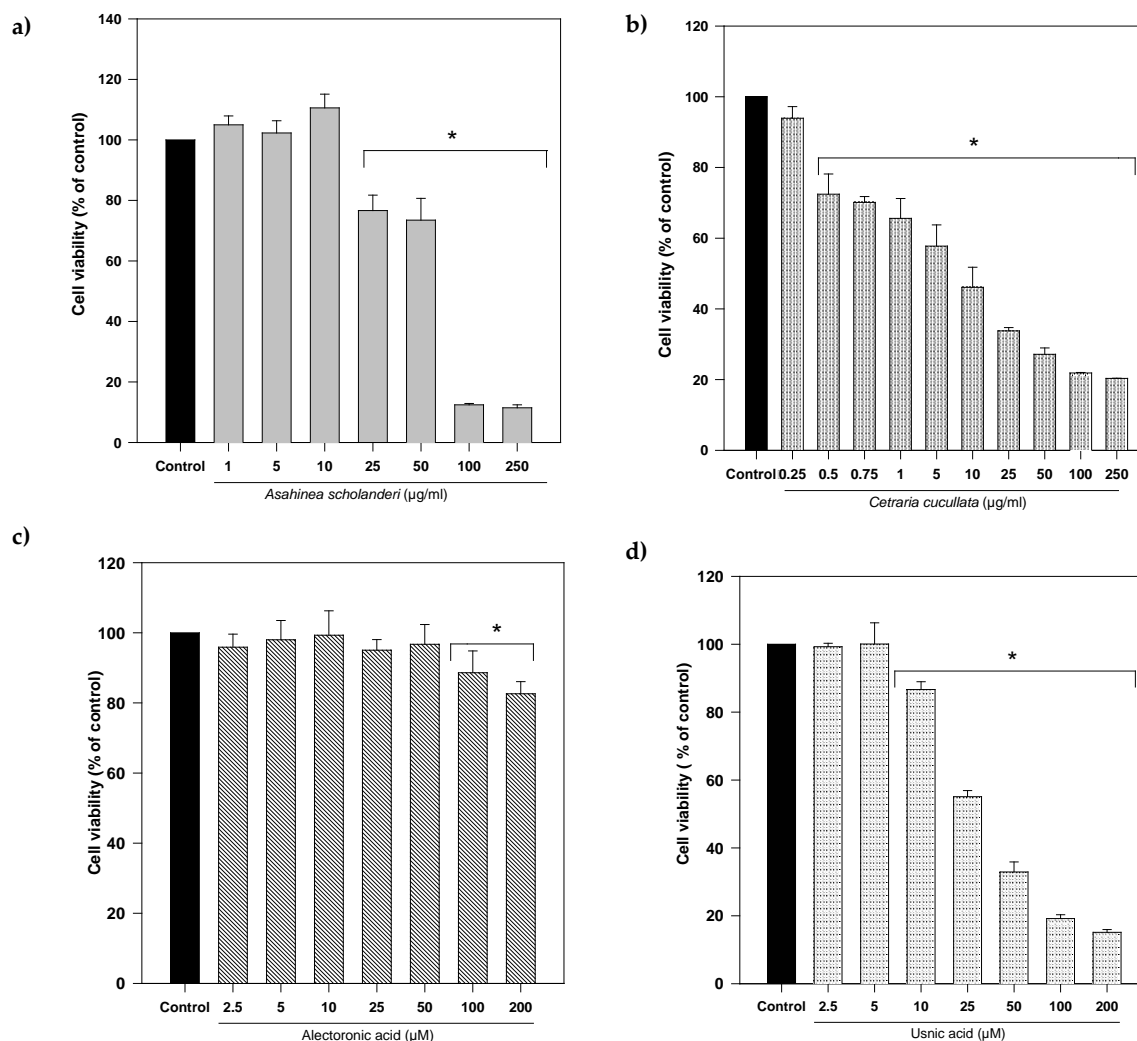


Figure 2. Cell viability on SH-SY5Y cell line-a) *Asahinea scholanderi* extract, b) *Cetraria cucullata* extract, c) Alectoronic acid and d) Usnic acid after 24 h treatments. Cell viability was determined using MTT assay. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) (triplicate experiments). * $p < 0.05$ versus control.

The AChE inhibitory activity of the selected non-cytotoxic concentrations of the lichen extracts and their secondary metabolites was analysed under physiological and oxidative stress conditions (H_2O_2 -induced (250 μM , 1h)). Under physiological conditions, alectoronic acid was the only one that was shown to significantly inhibit the enzyme AChE. Under H_2O_2 induced oxidative stress, the AChE was significantly activated. The lichen extracts of *A. scholanderi* and *C. cucullata* and the secondary metabolite usnic acid exhibited a slight reduction of AChE activity compared to H_2O_2 . However, pretreatments with alectoronic acid inhibited significantly AChE activity by 44% compared to cells treated only with H_2O_2 . Results were shown in **Figure 3**.

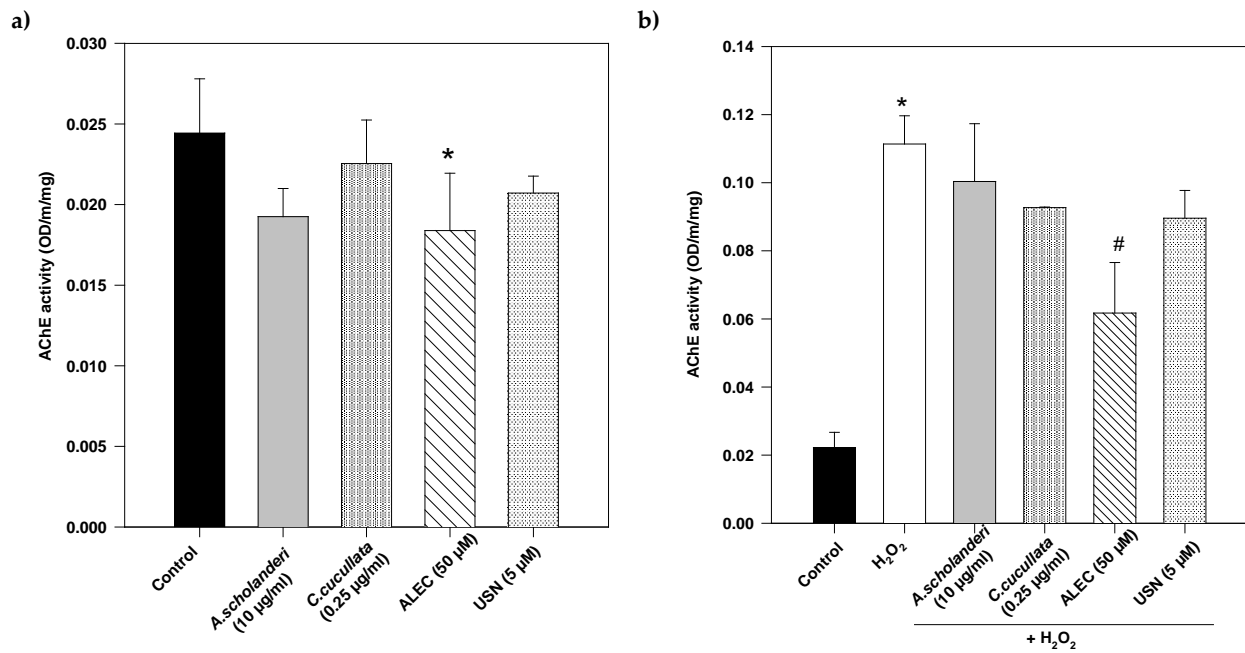


Figure 3. Effects of treatments with lichen extracts and pure compounds on AChE activity in SH-SY5Y cells using acetylcholine 250 μ M as substrate. a) Physiological conditions and b) Oxidative stress conditions. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) (triplicate experiments). * $p < 0.05$ versus control. # $p < 0.05$ versus H_2O_2

3.3. Relative AChE expression with lichen extracts and selected lichen compounds pretreatments in an oxidative stress induced cell model.

The effect of lichen extracts and secondary metabolites on AChE expression was then evaluated by Western blot. Results showed that, at the assayed conditions H_2O_2 did not significantly modify protein AChE expression. Contrary to activity evaluation assay, after pretreatments with the extract of *A. scholanderi* (10 μ g/ml) and the compounds alectoronic (50 μ M) acid and usnic acid (5 μ M), the AChE relative expression was downregulated while pretreatments with the extract of *C. cucullata* (0.25 μ g/ml) did not modify AChE levels compared to H_2O_2 (Figure 4).

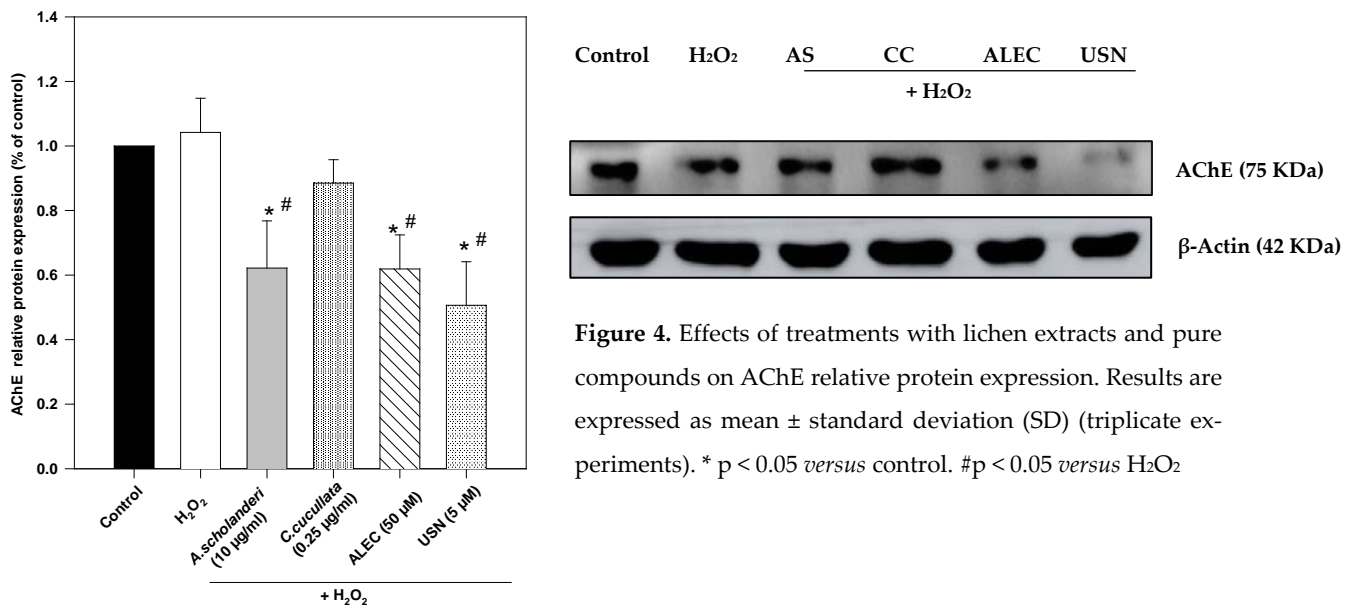


Figure 4. Effects of treatments with lichen extracts and pure compounds on AChE relative protein expression. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) (triplicate experiments). * $p < 0.05$ versus control. # $p < 0.05$ versus H_2O_2

4. Discussion

Despite inconsistent results on the disease-modifying effect of ChE-Is, slowing therapies appear to be the best strategies for now [24]. Nevertheless, due to the essential role of AChE for the functioning of the neural system, products of natural origin have come into the spotlight [25]. Computational methods have been extremely useful to identify-potential compounds of interest for specific targets among a vast library of compounds available. The scientific literature is full of predicted inhibitors and substrates, which can greatly reduce the time required for the screening process. Based on these *in silico* techniques, the anticholinesterase activity of the lichen secondary metabolites alectoronic acid and usnic acid was previously investigated [21]. Moreover, cell-free *in vitro* studies are a fundamental pillar in the research and development of drugs for Alzheimer's disease. In this context, there was demonstrated that the lichens *Asahinea scholanderi* and *Cetraria cucullata* were the most promising with moderate AChE inhibitory activities with IC₅₀ values of 110 µg/ml and 180 µg/ml, respectively. Furthermore several plant extracts and their isolated compounds showed anti-AChE activity with a range of moderate activity of 20<IC₅₀<200 µg/ml [26].

In the present work and to deepen on the action of the lichen extracts of *Asahinea scholanderi* and *Cetraria cucullata* and the compounds alectoronic acid and usnic acid, their effect on AChE activity and protein expression was evaluated on the human neuroblastoma SH-SY5Y cells. The catalytically active AChE is presented in the cytoplasm of human undifferentiated and differentiated SH-SY5Y cells[27].Therefore, the cytotoxicity of these lichen derivatives was first investigated on SH-SY5Y cells. The assayed higher non-cytotoxic concentrations for lichen extracts (10 µg /mL for *A. scholanderi*, 0.25 µg /mL for *C. cucullata*) did not show a significant inhibitory effect on AChE (Figure 2). The only lichen derivative which showed to block its activity was alectoronic acid at 50 µM. Depsidone structure has been purposed as a promising scaffold for new AChE [28]. Indeed, other depsidones from nature origin such as aspergillusidone A which was isolated from *Aspergillus unguis* (Émile-Weill & L.Gaudin) Thom & Raper, a seaweed-associated fungus, displayed AChE inhibition with an IC₅₀ value of 56.8 µM. Moreover, based on *in silico* studies, there have been found interactions between aspergillusidone A and the enzyme active site (electrostatic (Tyr-121, Trp-84, etc.) van der Waals (Tyr-334, Phe-331, Phe-330, Ser-122, etc.) forces and hydrogen bonds between its 4-OH and Trp-84 and its 10-COOH and Tyr-121[29]. On the other hand, docking studies with alectoronic acid exhibited an interaction network similar to Ach with high absolute docking scores (-10.8 and -11.1 kcal/mol, with and without H₂O) [21]. In relation to usnic acid, treatments with this secondary metabolite (5 µM) showed only a slight inhibitory activity in SH-SY5Y cells, unlike other works already published [30]. The concentration studies in this work is similar to that presented in other studies on toxicity performed with benzofurane-like structure compounds [31]. Furthermore, recent studies described that usnic acid had a good inhibition profile due to its hydrophobic interactions with other catalytic amino acids such as Trp84, Tyr 121, and Phe330 [32].

Under H₂O₂-induced oxidative stress conditions, this toxic exhibited a 5.5-fold increase of AChE activity. Schallreuter et al. provided evidence of a H₂O₂-activation in the range of 10⁻⁶ M concentrations due to structural changes of the AChE active site, not the binding one [33]. Other studies demonstrated that H₂O₂ acts as an allosteric activator, increasing AChE activity with treatments of H₂O₂ from 1 µM to 1000 µM [34]. Moreover, in the present work, pretreatments with lichen extracts and pure compounds reduced activated state of AChE by H₂O₂, but only alectoronic acid significantly decreased it (44% restore). Alectoronic acid was the only treatment that showed a good profile for an AChE inhibitor. The slight decrease observed for usnic acid pretreatment could be explained due to its radical scavenging activity, strongly influenced by solvent environment [35-37].Therefore, this compound neutralizes hydrogen peroxide effect.

Finally, the effect of pretreatments with lichen extracts and secondary metabolites was also investigated on AChE expression. Contrary to the expected results, AChE relative expression changed for *A. scholanderi*, alectoronic acid and usnic acid pretreatments, while AChE levels remained unaffected in *C. cucullata* and H₂O₂. As it has previously commented, Alzheimer's disease is a multifactorial disease where neuroinflammation, oxidative stress, tau hyperphosphorylation

and $\alpha\beta$ aggregation play an important role. Several Alzheimer's disease cell and animal models showed an overexpression of AChE, the levels of AChE were enhanced with increased tau phosphorylation in SH-SY5Y cells overexpressing GSK3 β and tau overexpression [38]. Moreover, in LPS-treated murine microglial cell line (BV2), AChE protein expression was significantly elevated in a time and dose-dependent manner [39]. Furthermore, studies with H₂O₂ revealed that 500 μ M induce AChE expression via JNK/AP1/ ATF2 [40]. Our work revealed that 250 μ M of H₂O₂ was able to modify AChE activity but not its levels. As Hartl et al. studies purposes stress-processes influence the alternative splicing of AChE, while AChE-T expression increased with ter-BHP treatment, AChE-R decreased. [41] There are discrepancies in scientific literature due to the divergences in AChE variants and their quantity depending on the brain regions, and the cell type [11]. In this study, the use of an antibody that targets all variants of AChE precludes any assumptions from being made about this approach.

Regarding to the *A. scholanderi* extract and the lichen compounds, AChE levels were down-regulated, especially for usnic acid treatment. Several studies have purposed that AChE deficiency could protect against apoptotic stimuli due to its implication in apoptosome formation [12,13]. Usnic acid has shown to inhibit caspase 3 activity in oxidative stress induced cell model [20]. This downregulation of AChE levels might be beneficial against its predisposal to stress factors.

5. Conclusions

Despite significant scientific efforts, the last EMA's approval for a new drug for AD was approximately 20 years ago. ChE-Is are still the best option for AD patients. Finding new molecules with less adverse effects, long lasting action and CNS selectivity represent an important area of research. Natural products have emerged as promising source of active compounds. *In silico* and cell-free system studies have shown promising inhibitory activity against AChE, but further cell-based and *in vivo* studies are necessary to assess toxicity and validate the activity.

Our results confirmed that the depsidone alecoronic acid acts as an AChE inhibitor in physiological and pathological cell models, being able to reverse (by almost 50%) the activated AChE state induce by H₂O₂ exposure. In addition to these results, down regulation of AChE levels was also affected by alecoronic acid. Although *A. scholanderi* extract and usnic acid pretreatments did not inhibit significantly AChE activity, they did reduce AChE levels. Other non-canonical functions of AChE, such as its involvement in apoptosome formation, could explained the neuroprotective role of usnic acid. Further studies on AChE inhibition and enzyme localization in AChE activity are needed to comprehend the mechanisms involved in the process. To fully understand the potential of natural products as cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, it is crucial to conduct *in vivo* studies and evaluate their effects in different cell models and brain tissues. Additionally, analysis of alternative mRNA splicing variants must be conducted to gain a comprehensive understanding of the divergent results reported in the literature.

Author Contributions: Conceptualization, I.U.-V., E.G.-B. and M.P.G.-S.; Methodology: I.U.-V.; Investigation, I.U.-V.; Formal analysis, I.U.-V. and E.G.-B.; Data Curation, I.U.-V. and E.G.-B.; Writing-Original Draft Preparation, I.U.-V. and E.G.-B.; Validation, E.G.-B.; Writing-Review & Editing, P.K.D. and M.P.G.-S., Supervision, E.G.-B. and M.P.G.-S., Project administration. P.K.D. and M.P.G.-S.

Funding: This work was financed by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (PID2019-105312GB-I00) and the Santander-Complutense University of Madrid (PR87/19-22637). I.U.V was supported by a grant CT42/18-CT43/18 from Complutense University of Madrid for predoctoral research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ahmed, S.; Khan, S.T.; Zargaham, M.K.; Khan, A.U.; Khan, S.; Hussain, A.; Uddin, J.; Khan, A.; Al-Harrasi, A. Potential therapeutic natural products against Alzheimer's disease with Reference of

- Acetylcholinesterase. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2021**, *139*, 111609, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111609>.
2. Arslan, M.E.; Türkez, H.; Mardinoğlu, A. In vitro neuroprotective effects of farnesene sesquiterpene on alzheimer's disease model of differentiated neuroblastoma cell line. *International Journal of Neuroscience* **2021**, *131*, 745-754, doi:10.1080/00207454.2020.1754211.
 3. Arya, A.; Chahal, R.; Rao, R.; Rahman, M.H.; Kaushik, D.; Akhtar, M.F.; Saleem, A.; Khalifa, S.M.A.; El-Seedi, H.R.; Kamel, M.; et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Potential of Various Sesquiterpene Analogues for Alzheimer's Disease Therapy. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:10.3390/biom11030350.
 4. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **2021**, *17*, 327-406, doi:10.1002/alz.12328.
 5. Bautista-Aguilera Ó, M.; Ismaili, L.; Iriepa, I.; Diez-Iriepa, D.; Chabchoub, F.; Marco-Contelles, J.; Pérez, M. Tacrines as Therapeutic Agents for Alzheimer's Disease. V. Recent Developments. *Chem Rec* **2021**, *21*, 162-174, doi:10.1002/tcr.202000107.
 6. Doroszkiewicz, J.; Mroczko, B. New Possibilities in the Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23168902.
 7. EMA/112932/2022. Refusal of the marketing authorisation for Aduhelm (aducanumab). **2022**.
 8. De Boer, D.; Nguyen, N.; Mao, J.; Moore, J.; Sorin, E.J. A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:10.3390/biom11040580.
 9. Taylor, P.; Camp, S.; Radić, Z. Acetylcholinesterase. In *Encyclopedia of Neuroscience*, Squire, L.R., Ed.; Academic Press: Oxford, 2009; pp. 5-7.
 10. Moss, D.E. Improving Anti-Neurodegenerative Benefits of Acetylcholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease: Are Irreversible Inhibitors the Future? *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21103438.
 11. Campanari, M.L.; Navarrete, F.; Ginsberg, S.D.; Manzanares, J.; Sáez-Valero, J.; García-Ayllón, M.S. Increased Expression of Readthrough Acetylcholinesterase Variants in the Brains of Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis* **2016**, *53*, 831-841, doi:10.3233/jad-160220.
 12. Knorr, D.Y.; Georges, N.S.; Pauls, S.; Heinrich, R. Acetylcholinesterase promotes apoptosis in insect neurons. *Apoptosis* **2020**, *25*, 730-746, doi:10.1007/s10495-020-01630-4.
 13. Zhang, X.-J.; Greenberg, D.S. Acetylcholinesterase Involvement in Apoptosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **2012**, *5*.
 14. Min, B.S.; Cuong, T.D.; Lee, J.-S.; Shin, B.-S.; Woo, M.H.; Hung, T.M. Cholinesterase inhibitors from *Cleistocalyx operculatus* buds. *Archives of Pharmacal Research* **2010**, *33*, 1665-1670, doi:10.1007/s12272-010-1016-5.
 15. Conforti, F.; Rigano, D.; Formisano, C.; Bruno, M.; Loizzo, M.R.; Menichini, F.; Senatore, F. Metabolite profile and in vitro activities of Phagnalon saxatile (L.) Cass. relevant to treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2010**, *25*, 97-104, doi:10.3109/14756360903018260.
 16. Choi, S.J.; Oh, S.S.; Kim, C.R.; Kwon, Y.K.; Suh, S.H.; Kim, J.K.; Park, G.G.; Son, S.Y.; Shin, D.H. *Perilla frutescens* Extract Ameliorates Acetylcholinesterase and Trimethyltin Chloride-Induced Neurotoxicity. *J Med Food* **2016**, *19*, 281-289, doi:10.1089/jmf.2015.3540.
 17. Aschenbrenner, I.A.; Cernava, T.; Berg, G.; Grube, M. Understanding Microbial Multi-Species Symbioses. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 180, doi:10.3389/fmicb.2016.00180.

18. Grimm, M.; Grube, M.; Schiefelbein, U.; Zühlke, D.; Bernhardt, J.; Riedel, K. The Lichens' Microbiota, Still a Mystery? *Front Microbiol* **2021**, *12*, 623839, doi:10.3389/fmicb.2021.623839.
19. Goga, M.; Elečko, J.; Marcinčinová, M.; Ručová, D.; Bačkorová, M.; Backor, M. Lichen Metabolites: An Overview of Some Secondary Metabolites and Their Biological Potential. 2018; pp. 1-36.
20. Fernández-Moriano, C.; Divakar, P.K.; Crespo, A.; Gómez-Serranillos, M.P. Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. *Food Chem Toxicol* **2017**, *105*, 262-277, doi:10.1016/j.fct.2017.04.030.
21. Ureña-Vacas, I.; González-Burgos, E.; De Vita, S.; Divakar, P.K.; Bifulco, G.; Gómez-Serranillos, M.P. Phytochemical Characterization and Pharmacological Properties of Lichen Extracts from Cetrarioid Clade by Multivariate Analysis and Molecular Docking. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2022**, *2022*, 5218248, doi:10.1155/2022/5218248.
22. ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHER-STONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **1961**, *7*, 88-95, doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9.
23. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **1985**, *150*, 76-85, doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
24. Marucci, G.; Buccioni, M.; Ben, D.D.; Lambertucci, C.; Volpini, R.; Amenta, F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **2021**, *190*, 108352, doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>.
25. Khan, H.; Marya; Amin, S.; Kamal, M.A.; Patel, S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *101*, 860-870, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.007>.
26. Dos Santos, T.C.; Gomes, T.M.; Pinto, B.A.S.; Camara, A.L.; Paes, A.M.A. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 1192, doi:10.3389/fphar.2018.01192.
27. Onder, S.; Schopfer, L.M.; Jiang, W.; Tacal, O.; Lockridge, O. Butyrylcholinesterase in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *NeuroToxicology* **2022**, *90*, 1-9, doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.02.006>.
28. Ece, A.; Pejin, B. A computational insight into acetylcholinesterase inhibitory activity of a new lichen depsidone. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2015**, *30*, 528-532, doi:10.3109/14756366.2014.949256.
29. Yang, W.C.; Bao, H.Y.; Liu, Y.Y.; Nie, Y.Y.; Yang, J.M.; Hong, P.Z.; Zhang, Y. Depsidone Derivatives and a Cyclopeptide Produced by Marine Fungus *Aspergillus unguis* under Chemical Induction and by Its Plasma Induced Mutant. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23092245.
30. Cetin Cakmak, K., Gulcin, I. Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid-an activity-structure insight. **2019**, *6*, 1273-1280, doi:doi: 10.1016/j.toxrep.2019.11.003.
31. Croce, N.; Pitaro, M.; Gallo, V.; Antonini, G. Toxicity of Usnic Acid: A Narrative Review. *Journal of Toxicology* **2022**, *2022*, 8244340, doi:10.1155/2022/8244340.
32. Areche, C.; Parra, J.R.; Sepulveda, B.; García-Beltrán, O.; Simirgiotis, M.J. UHPLC-MS Metabolomic Fingerprinting, Antioxidant, and Enzyme Inhibition Activities of *Himantormia lugubris* from Antarctica. *Metabolites* **2022**, *12*, doi:10.3390/metabo12060560.

33. Schallreuter, K.U.; Elwary, S.; Gibbons, N.; Rokos, H.; Wood, J.M. Human epidermal acetylcholinesterase (AChE) is regulated by hydrogen peroxide (H₂O₂). *Experimental Dermatology* **2005**, *14*, 155-155, doi:<https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2005.0266j.x>.
34. Garcimartín, A.; López-Oliva, M.E.; González, M.P.; Sánchez-Muniz, F.J.; Benedí, J. Hydrogen peroxide modifies both activity and isoforms of acetylcholinesterase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Redox Biol* **2017**, *12*, 719-726, doi:10.1016/j.redox.2017.04.004.
35. Hoa, N.T.; Van Bay, M.; Mechler, A.; Vo, Q.V. Is Usnic Acid a Promising Radical Scavenger? *ACS Omega* **2020**, *5*, 17715-17720, doi:10.1021/acsomega.0c02306.
36. Jovanović, J.Đ.; Manojlović, N.; Marković, Z. Usnic Acid as a Potential Free Radical Scavenger and its Inhibitory Activity Toward SARS-CoV-2 Proteins. *Journal of Computational Biophysics and Chemistry* **2021**, *20*, 655-666, doi:10.1142/S2737416521500393.
37. Maulidiyah Maulidiyah, A.D., Erviana Ahmad, Andi Musdalifah, Dwiprayogo Wibowo, La Ode Agus Salim, Zul Arham, Faizal Mustapa, Ishmah Farah Adiba Nurdin, Muhammad Nurdin. *Antioxidant activity-guided isolation of usnic acid and diffractaic acid compounds from lichen genus Usnea sp*; Issue: 2: 2021; Volume Volume: 11, pp. 075-083.
38. Cortés-Gómez, M.; Llorens-Álvarez, E.; Alom, J.; Del Ser, T.; Avila, J.; Sáez-Valero, J.; García-Ayllón, M.S. Tau phosphorylation by glycogen synthase kinase 3 β modulates enzyme acetylcholinesterase expression. *J Neurochem* **2021**, *157*, 2091-2105, doi:10.1111/jnc.15189.
39. Xia, Y.; Wu, Q.; Mak, S.; Liu, E.Y.L.; Zheng, B.Z.Y.; Dong, T.T.X.; Pi, R.; Tsim, K.W.K. Regulation of acetylcholinesterase during the lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglial cells. *FASEB J* **2022**, *36*, e22189, doi:10.1096/fj.202101302RR.
40. Zhang, J.Y.; Jiang, H.; Gao, W.; Wu, J.; Peng, K.; Shi, Y.F.; Zhang, X.J. The JNK/AP1/ATF2 pathway is involved in H₂O₂-induced acetylcholinesterase expression during apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **2008**, *65*, 1435-1445, doi:10.1007/s00018-008-8047-9.
41. Härtl, R.; Gleinich, A.; Zimmermann, M. Dramatic increase in readthrough acetylcholinesterase in a cellular model of oxidative stress. *J Neurochem* **2011**, *116*, 1088-1096, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07164.x.

Capítulo 4

Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora de extractos liquénicos en modelos celulares de estrés oxidativo.

Caracterización fitoquímica.

Publicación incluida

Lichen Extracts from Cetrarioid Clade provide neuroprotection against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative stress.

**Lichen Extracts from Cetrarioid Clade provide neuroprotection against
Hydrogen Peroxide-induced Oxidative stress.**

Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP.

Molecules 2022. 27(19),6520.

<https://doi.org/10.3390/molecules27196520>

Article

Lichen Extracts from Cetrarioid Clade Provide Neuroprotection against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress

Isabel Ureña-Vacas, Elena González-Burgos * , Pradeep Kumar Divakar and María Pilar Gómez-Serranillos 

Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: elenagon@ucm.es

Abstract: Oxidative stress is involved in the pathophysiology of many neurodegenerative diseases. Lichens have antioxidant properties attributed to their own secondary metabolites with phenol groups. Very few studies delve into the protective capacity of lichens based on their antioxidant properties and their action mechanism. The present study evaluates the neuroprotective role of *Dactylina arctica*, *Nephromopsis stracheyi*, *Tuckermannopsis americana* and *Vulpicida pinastri* methanol extracts in a hydrogen peroxide (H₂O₂) oxidative stress model in neuroblastoma cell line “SH-SY5Y cells”. Cells were pretreated with different concentrations of lichen extracts (24 h) before H₂O₂ (250 μM, 1 h). Our results showed that *D. arctica* (10 μg/mL), *N. stracheyi* (25 μg/mL), *T. americana* (50 μg/mL) and *V. pinastri* (5 μg/mL) prevented cell death and morphological changes. Moreover, these lichens significantly inhibited reactive oxygen species (ROS) production and lipid peroxidation and increased superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities and glutathione (GSH) levels. Furthermore, they attenuated mitochondrial membrane potential decline and calcium homeostasis disruption. Finally, high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis revealed that the secondary metabolites were gyrophoric acid and lecanoric acid in *D. arctica*, usnic acid, pinastric acid and vulpinic acid in *V. pinastri*, and alectoronic acid in *T. americana*. In conclusion, *D. arctica* and *V. pinastri* are the most promising lichens to prevent and to treat oxidative stress-related neurodegenerative diseases.

Keywords: lichens; neuroprotection; cetrarioid clade; oxidative stress



Citation: Ureña-Vacas, I.; González-Burgos, E.; Divakar, P.K.; Gómez-Serranillos, M.P. Lichen Extracts from Cetrarioid Clade Provide Neuroprotection against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *Molecules* **2022**, *27*, 6520. <https://doi.org/10.3390/molecules27196520>

Academic Editor: Nour Eddine Es-Safi

Received: 25 August 2022

Accepted: 30 September 2022

Published: 2 October 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Oxidative stress is an imbalance in cellular redox homeostasis caused by ROS overproduction and/or antioxidant system dysfunction. The brain is particularly susceptible to oxidative stress and this process is increased with aging. The brain consumes almost 20% of the total basal oxygen, it is rich in polyunsaturated *n*-3 fatty acids and redox-active transition metals, it has a low endogenous antioxidant defense (i.e., catalase), and neurotransmitters such as dopamine can auto-oxidize leading to free radicals [1,2]. Moreover, the mitochondrial electron transport chain consumes around 98% of oxygen and the residual oxygen is converted into radical superoxide (O₂^{•−}) and the non-radical oxidant H₂O₂; excessive mitochondrial-derived ROS accumulation can lead to mitochondrial dysfunction [3]. Furthermore, hydrogen peroxide, the major redox metabolite, diffuses across membranes by water channels, oxidizes and damages biomolecules [4,5]. The main mechanism underlying the neurotoxic effects of hydrogen peroxide occurs through Fenton’s reaction. In this reaction, ferrous iron and hydrogen peroxide react to yield hydroxyl radical. Hydroxyl radical is the most deleterious free radical, reacting with macromolecules by hydroxyl addition and hydrogen abstraction [6]. The altered cellular redox homeostasis causes oxidative injury to lipids, proteins, and DNA and modifications in cellular function that finally contribute to cell death mainly by apoptosis [3]. Oxidative stress is involved as a major pathophysiologic mechanism of age-related neurodegenerative diseases such as Parkinson’s disease, Alzheimer’s disease, and amyotrophic lateral sclerosis [7].

Antioxidants modulate the redox state of cells through single electron transfer (SET), hydrogen atom transfer (HAT), transition metals chelation and the up-regulation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Antioxidants are potentially beneficial in the prevention and treatment of central nervous system pathologies associated with oxidative stress and constitute one of the most promising therapeutical strategies [8].

Lichens have aroused great pharmacological interest in recent years because they produce compounds unique to these species. These bioactive compounds are primarily phenol derivatives such as dibenzofurans, depsidones and depsides. Lichen extracts and their secondary metabolites have shown an interesting antioxidant activity [8,9]. However, studies focusing on therapeutic and protective strategy based on the antioxidant ability of lichens are very limited [9].

Recently, in previous studies of this group, the antioxidant activity of lichen extracts from the cetrarioid clade was evaluated using different in vitro methods (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assays) and multivariate statistical techniques. This study revealed that the lichen species *Dactylina arctica* (Hook) Nyl., *Nephromopsis stracheyi* (C. Bab.) Müll. Arg., *Tuckermannopsis americana* (Sprengel) Hale, and *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E. Mattsson & M. J. Lai. were the ones with the highest antioxidant capacities [10].

The aim of the present work is to evaluate for the first time the neuroprotective activity, based on antioxidant properties, of the methanol lichen extracts *Dactylina arctica*, *Nephromopsis stracheyi*, *Tuckermannopsis americana* and *Vulpicida pinastri* in a hydrogen peroxide-induced oxidative stress model in a neuroblastoma cell line.

2. Results

2.1. Lichen Extracts from Cetrarioid Clade Promoted Neuronal Survival after H₂O₂-Induced Oxidative Stress

Initially, we evaluated the effect of the methanol extracts of the lichens *Dactylina arctica*, *Nephromopsis stracheyi*, *Tuckermannopsis americana* and *Vulpicida pinastri* on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell viability using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. As shown in Figure 1, *T. americana* did not cause cytotoxicity at any assayed concentrations. On the other hand, *N. stracheyi* significantly reduced cell viability at 50 µg/mL (38% of cell viability) whereas *D. arctica* and *V. pinastri* affected cell viability at 25 µg/mL (62.7% and 65.9% of cell viability, respectively) and at 50 µg/mL (43.9% and 52.8% of cell viability, respectively).

Next, we investigated the potential protective effect of non-toxic concentrations of lichen extracts against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. Figure 2A demonstrates that cell viability of the 250 µM for 1 h H₂O₂-treated SH-SY5Y cells significantly decreased by 57.5% compared to control cells (100%). However, pretreatments with methanol lichen extracts of cetrarioid clade promoted neuronal survival compared to hydrogen peroxide-treated cells. With 24 h pretreatment, the percentage of cell viability was increased over 68.9% and 76.8% for *D. arctica* at 5 and 10 µg/mL, respectively, over 65.4% and 63.2% for *N. stracheyi* at 10 and 25 µg/mL, respectively, 58.2% for *T. americana* at 50 µg/mL, and 78.9% for *V. pinastri* at 5 µg/mL. Therefore, we chose the most protective concentrations of each lichen extract to delve into the protective mechanism of these extracts and identify which of them is the most active. Hence, the maximum cell viability protection was 5 µg/mL for *V. pinastri*, 10 µg/mL for *D. arctica* and *N. stracheyi* and 50 µg/mL for *T. americana*.

Figure 2B showed the effect of the most protective lichen extracts on cell morphology. Hydrogen peroxide (250 µM for 1 h) caused morphological changes toward a cellular SH-SY5Y rounding. By contrast, lichen extracts improved morphological changes of neuroblastoma cells as shown in the presence of cellular projections.

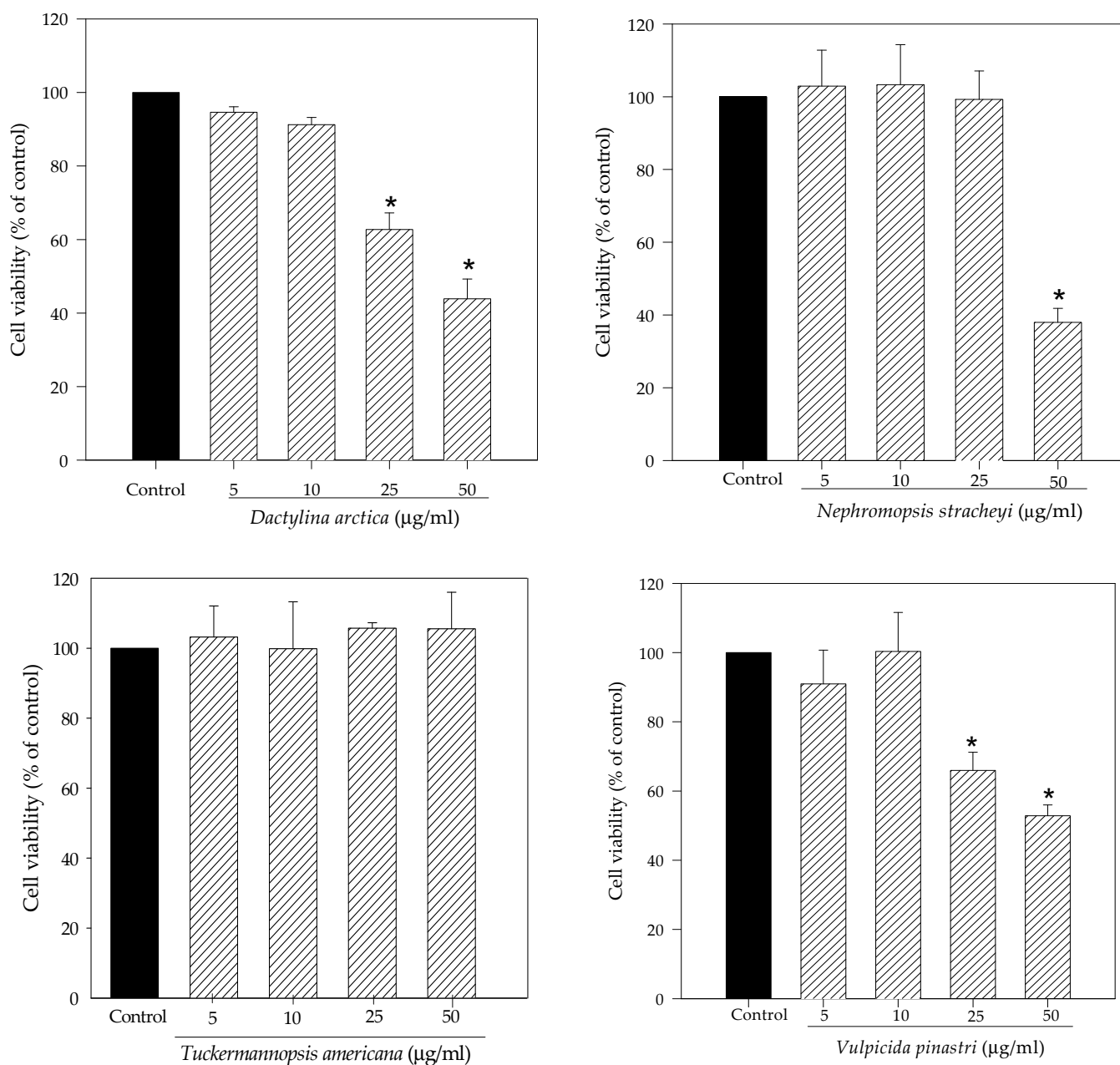


Figure 1. Effect of methanol lichen extracts of cetrarioid clade on cell viability. SH-SY5Y cells were treated with different concentrations of extracts from 5 to 50 µg/mL for 24 h. Cell viability was determined using MTT assay. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) (triplicate experiments). * $p < 0.05$ versus control.

2.2. Lichen Extracts from Cetrarioid Clade Reduced ROS Production after H₂O₂-Induced Oxidative Stress

Figure 3 revealed a significant increase in intracellular ROS production when SH-SY5Y cells were treated with hydrogen peroxide. 1 h treatment with H₂O₂ at 250 µM enhanced ROS generation by 155.5% compared to control cells (100%). On the other hand, 24 h pretreatments with methanol lichen extracts significantly reduced ROS production. In particular, the highest reduction was shown by *D. arctica* (42.4% of reduction compared to hydrogen peroxide treatment), followed by *T. americana* (41.1% of reduction versus H₂O₂), *N. stracheyi* (38.7% of reduction versus H₂O₂) and *V. pinastri* (35.3% of reduction versus H₂O₂).

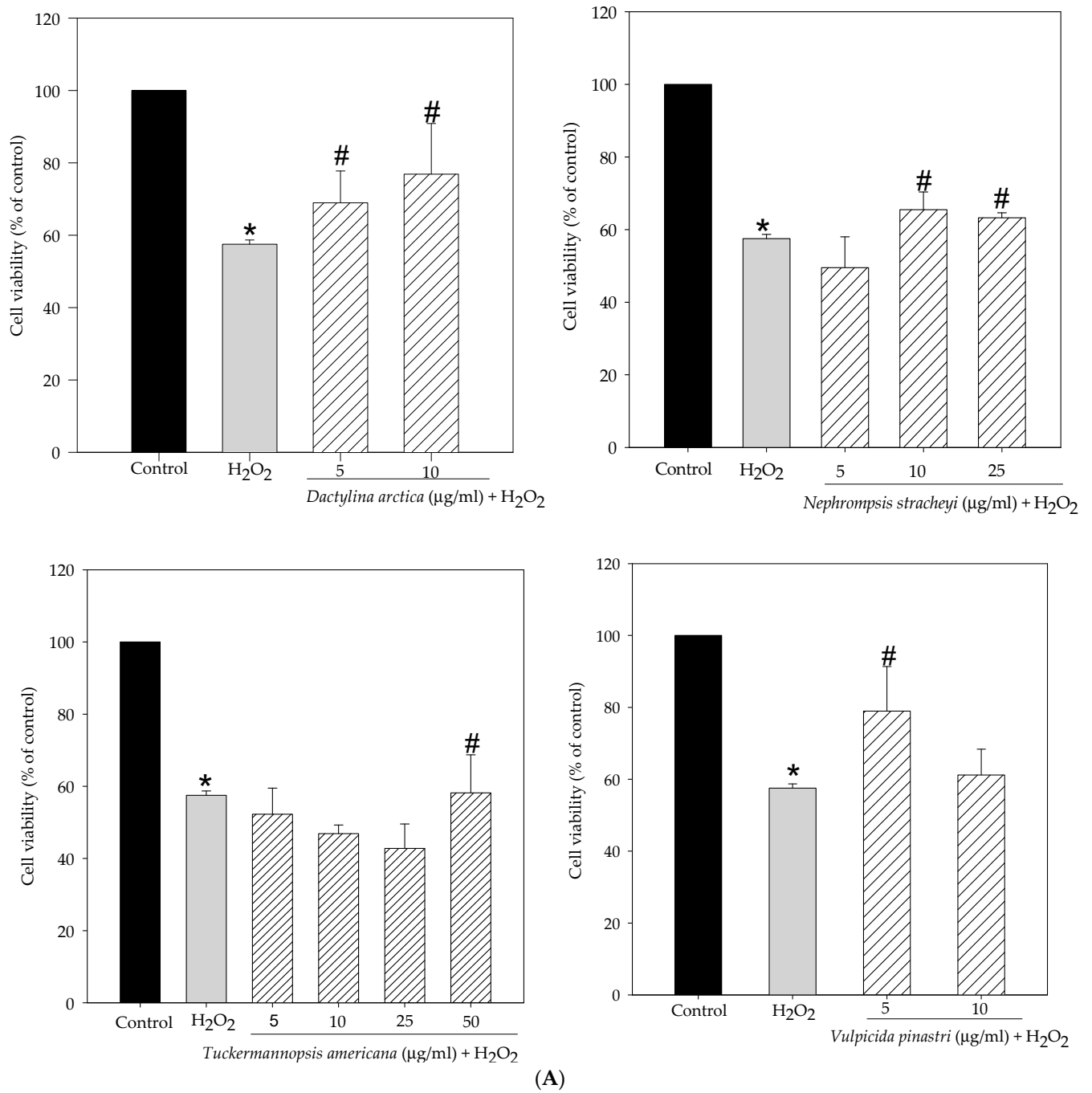


Figure 2. Cont.

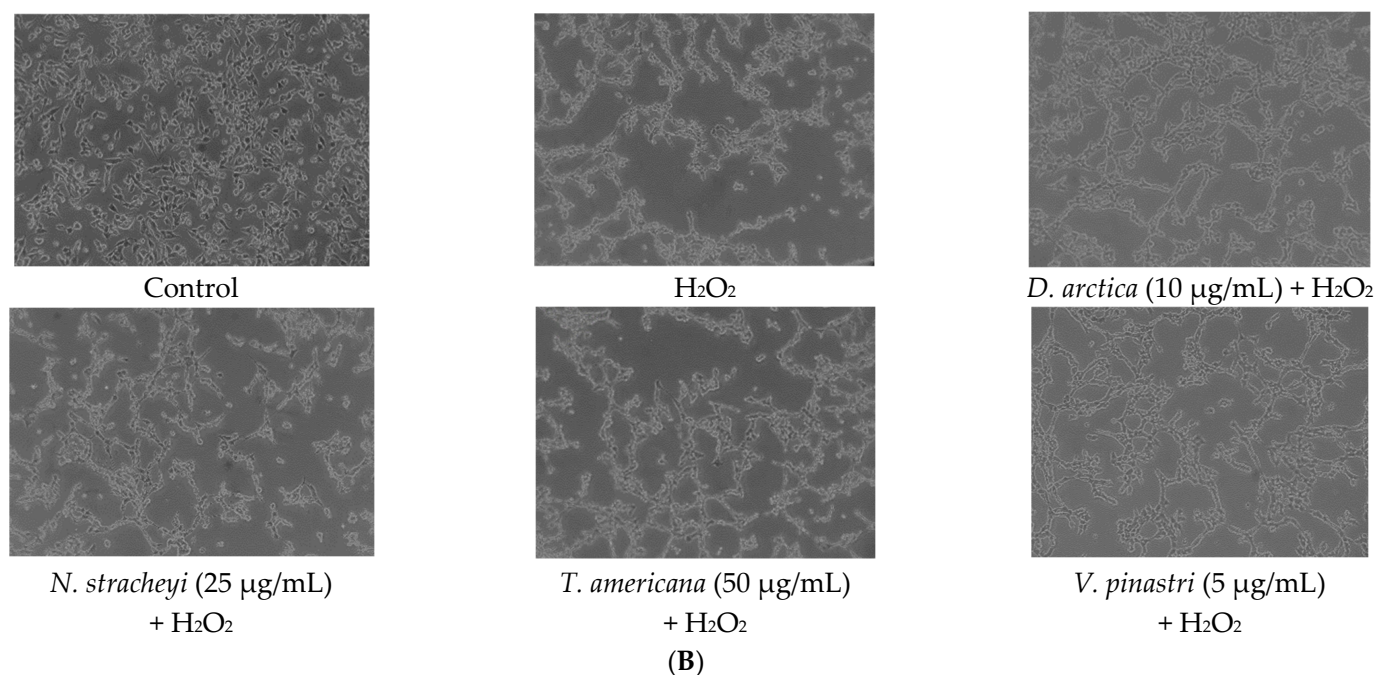


Figure 2. (A) Effect of methanol lichen extracts of cetrarioid clade on cytoprotection in stress oxidative models. SH-SY5Y cells were pretreated with non-cytotoxic concentrations of lichens for 24 h before H₂O₂ (250 µM, 1 h). Cell viability was determined using MTT assay. Results were expressed as mean ± SD (triplicate experiments). * $p < 0.01$ versus control; # $p < 0.01$ versus H₂O₂. (B) SH-SY5Y cells morphology after treatments.

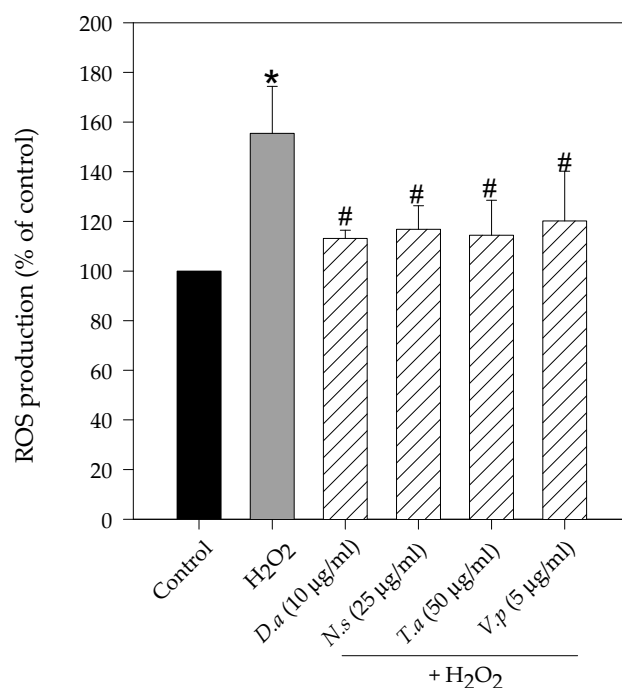


Figure 3. Effect of methanol lichen extracts of cetrarioid clade on intracellular ROS production. SH-SY5Y cells were pretreated with *D. arctica* (*D.a*), *N. stracheyi* (*N.s*), *T. americana* (*T.a*) and *V. pinastri* (*V.p*) for 24 h before H₂O₂ (250 µM, 1 h). The levels of intracellular ROS production were measured using dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) method. Results are expressed as mean ± SD (triplicate experiments). * $p < 0.01$ versus control; # $p < 0.01$ versus H₂O₂.

2.3. Lichen Extracts from Cetrarioid Clade Improved Oxidative Stress Markers and Antioxidant Enzyme Activity

Exposure to hydrogen peroxide significantly increased thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels (174%), impaired GSH content (51%) and reduced SOD (68%) and CAT activity (58.5%) in SH-SY5Y cells compared to control cells (100%) (Figure 4). However, pretreatments with methanol lichen extracts of cetrarioid clade exhibited noteworthy protection against hydrogen peroxide-induced oxidative injury by improving the antioxidant status. Hence, *D. arctica* and *V. pinastri* significantly reduced lipid peroxidation levels (109% and 122%, respectively), restored GSH content (93% and 83.5%, respectively) and increased SOD activity (96% and 87%, respectively). Moreover, *T. americana* also augmented SOD enzyme activity by 92%. All the extracts significantly increased CAT activity, reverting H_2O_2 effects. *D. arctica*, *V. pinastri* and *T. americana* showed the highest values (100.9%, 97% and 95%, respectively), followed by *N. stracheyi*, with moderate CAT activity (81.6%).

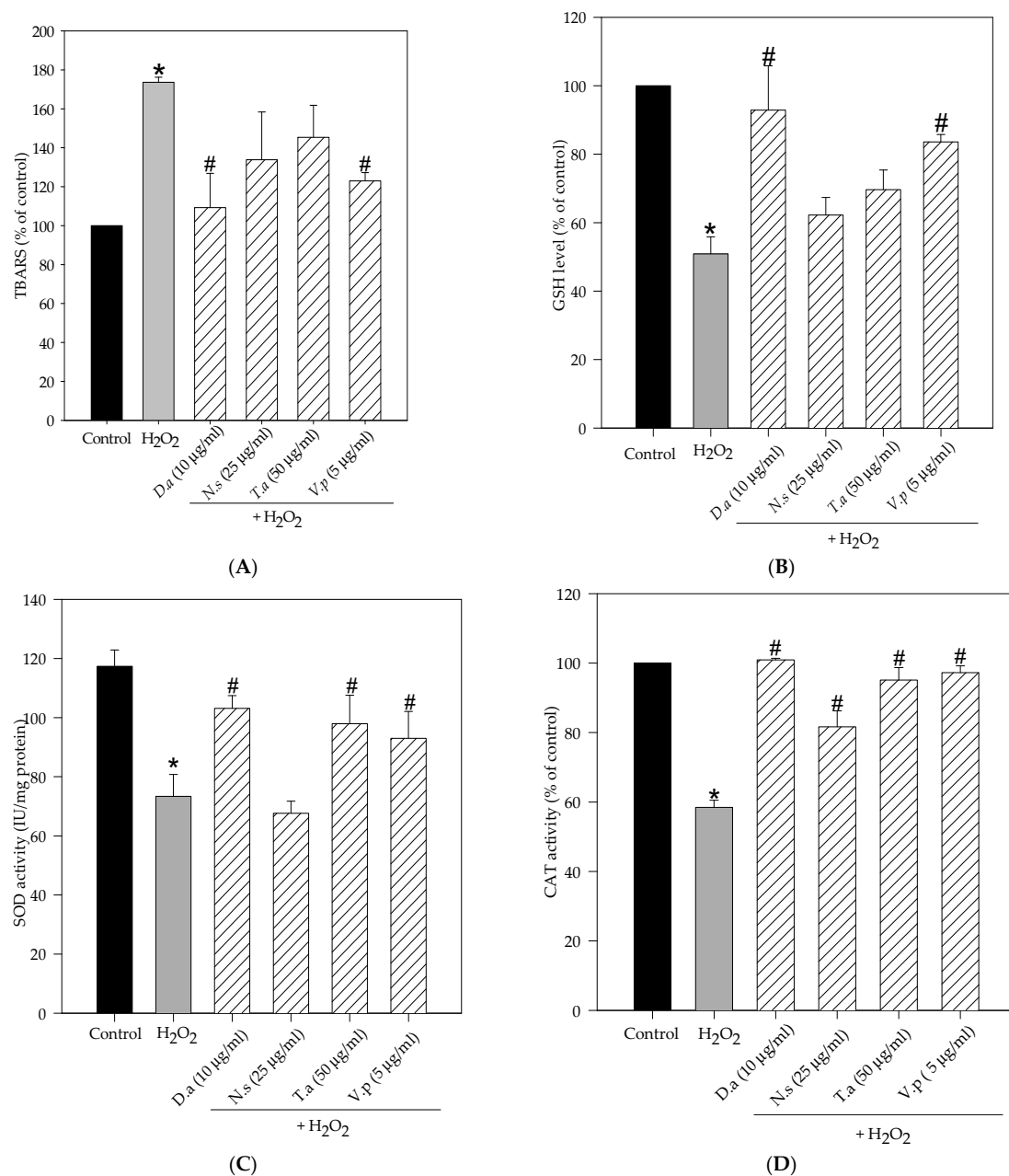


Figure 4. Lichen extracts from cetrarioid clade improved oxidative stress markers and antioxidant enzyme activity. SH-SY5Y cells were pretreated with *Dactylina arctica* (*D.a*), *Nephromopsis stracheyi* (*N.s*),

Tuckermannopsis americana (*T.a*) and *Vulpicida pinastri* (*V.p*) for 24 h before H_2O_2 (250 μ M, 1 h). (A) Lipid peroxidation, (B) GSH levels and (C) SOD activity, (D) CAT activity. Results are expressed as mean \pm SD (triplicate experiments). * $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus H_2O_2 .

2.4. Lichen Extracts from Cetrarioid Clade Protected against H_2O_2 -Induced Mitochondrial Dysfunction

Figure 5 shows the effect of lichen extracts on different mitochondrial parameters (mitochondrial membrane potential and calcium levels). Treatment with hydrogen peroxide (250 μ M, 1 h) caused a significant decrease in the mitochondrial membrane potential (35% compared to 100% control cells) and a significant increase in mitochondrial calcium levels (1.14 relative to control) and cytosolic calcium levels (1007 nM compared to 516 nM control cells). However, pretreatments with lichen extracts prevented H_2O_2 -induced mitochondrial changes. In particular, extracts of *D. arctica* (10 μ g/mL) and *V. pinastri* (5 μ g/mL) significantly increased mitochondrial membrane potential by 67% and 69%, respectively, and significantly reduced cytosolic calcium levels by 557 nM and 721 nM, respectively. Mitochondrial calcium levels were reduced in pretreated cells with selected concentrations of *D. arctica*, *V. pinastri* and *T. americana* extracts (1.08, 1.07, 1.05 relative to control, respectively).

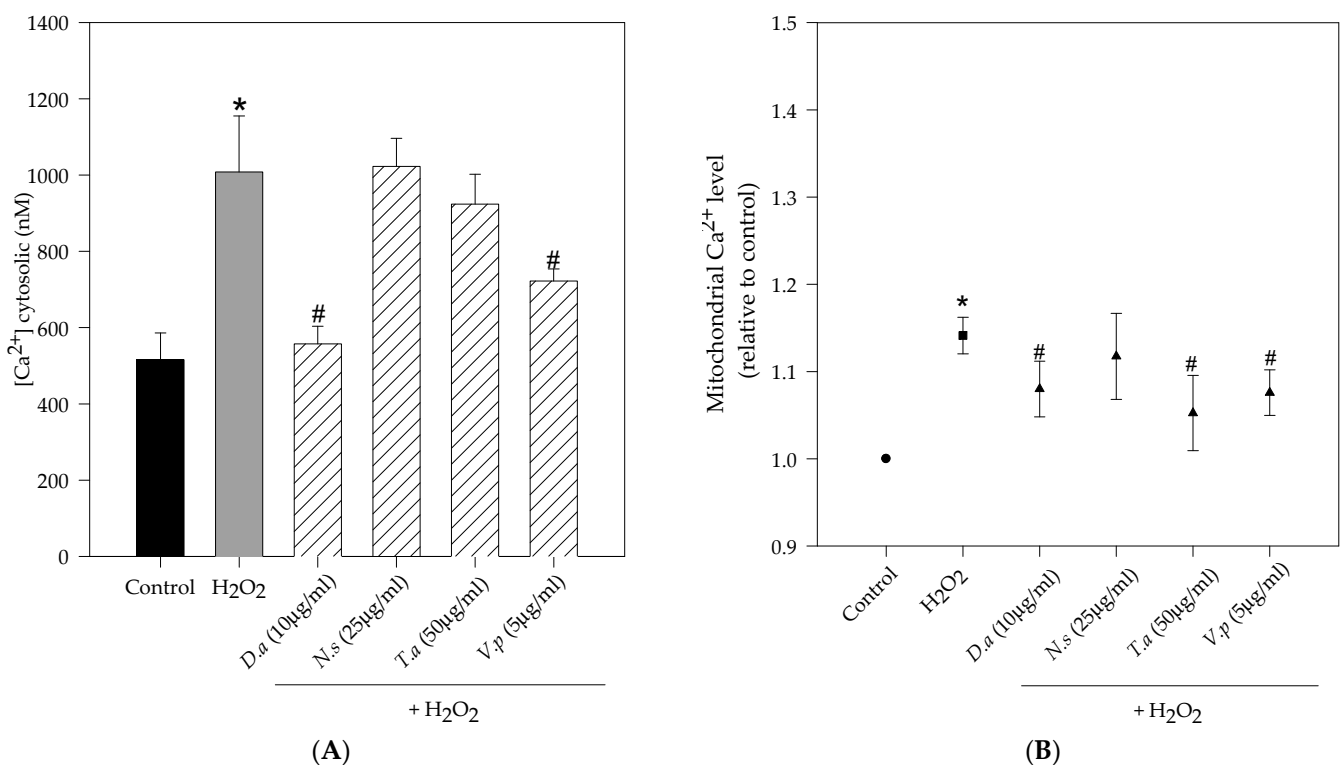


Figure 5. Cont.

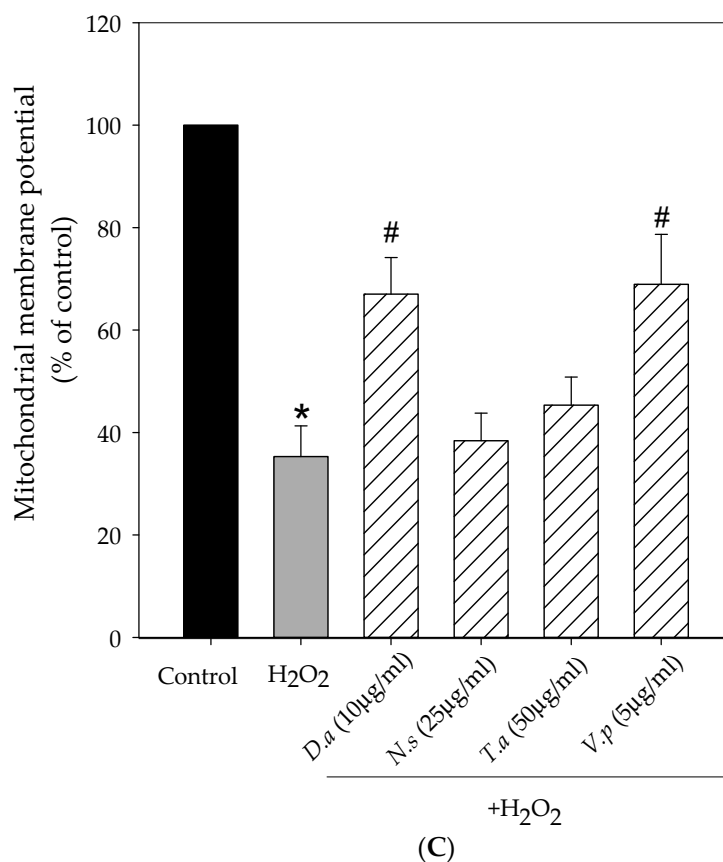


Figure 5. Effect of lichen extracts against H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y. (A) on cytosolic calcium levels. (B) on mitochondrial calcium levels. (C) on mitochondrial membrane potential. Data are expressed as means \pm SD (% of control) * $p < 0.001$ vs. control; # $p < 0.001$ vs. H₂O₂.

2.5. HPLC Profile of Lichen Extracts from Cetrarioid Clade

The most promising lichen extracts were analyzed using the HPLC-UV method, whose representative chromatograms are shown in Figure 6. Secondary metabolites were identified based on their retention times and ultraviolet spectra as compared to standards and previously reported lichen extracts. Table 1 reported retention times and the absorbance maxima (nm) UV spectrum. Results showed that the main compounds in *D. artica* were gyrophoric acid (GYR) and lecanoric acid (LEC). The lichen *T. americana* contained alectoronic acid (ALE). The compounds usnic acid (USN), pinastric acid (PIN) and vulpinic acid (VUL) were the majority in *V. pinastri*.

Table 1. Retention times and UV absorbance maxima (nm) of main secondary metabolites of studied lichens.

Compounds	Retention Time (t _R , min)	UV Detection (λ max, nm)
Alectoronic acid (ALE)	29.1 \pm 0.001	214, 254, 316
Gyrophoric acid (GYR)	25.9 \pm 0.003	212, 270, 304
Lecanoric acid (LEC)	19.4 \pm 0.0312	212, 270, 304
Methyl orsellinate (Me-ORS)	13.9 \pm 0.002	210, 262, 298
Orsellinic acid (ORS)	9.8 \pm 0.011	210, 262, 298
Pinastric acid (PIN)	26.9 \pm 0.047	<210, 246, 392
Usnic acid (USN)	32.3 \pm 0.046	226/234, 282
Vulpinic acid (VUL)	25.1 \pm 0.034	<210, 234, 282, 354

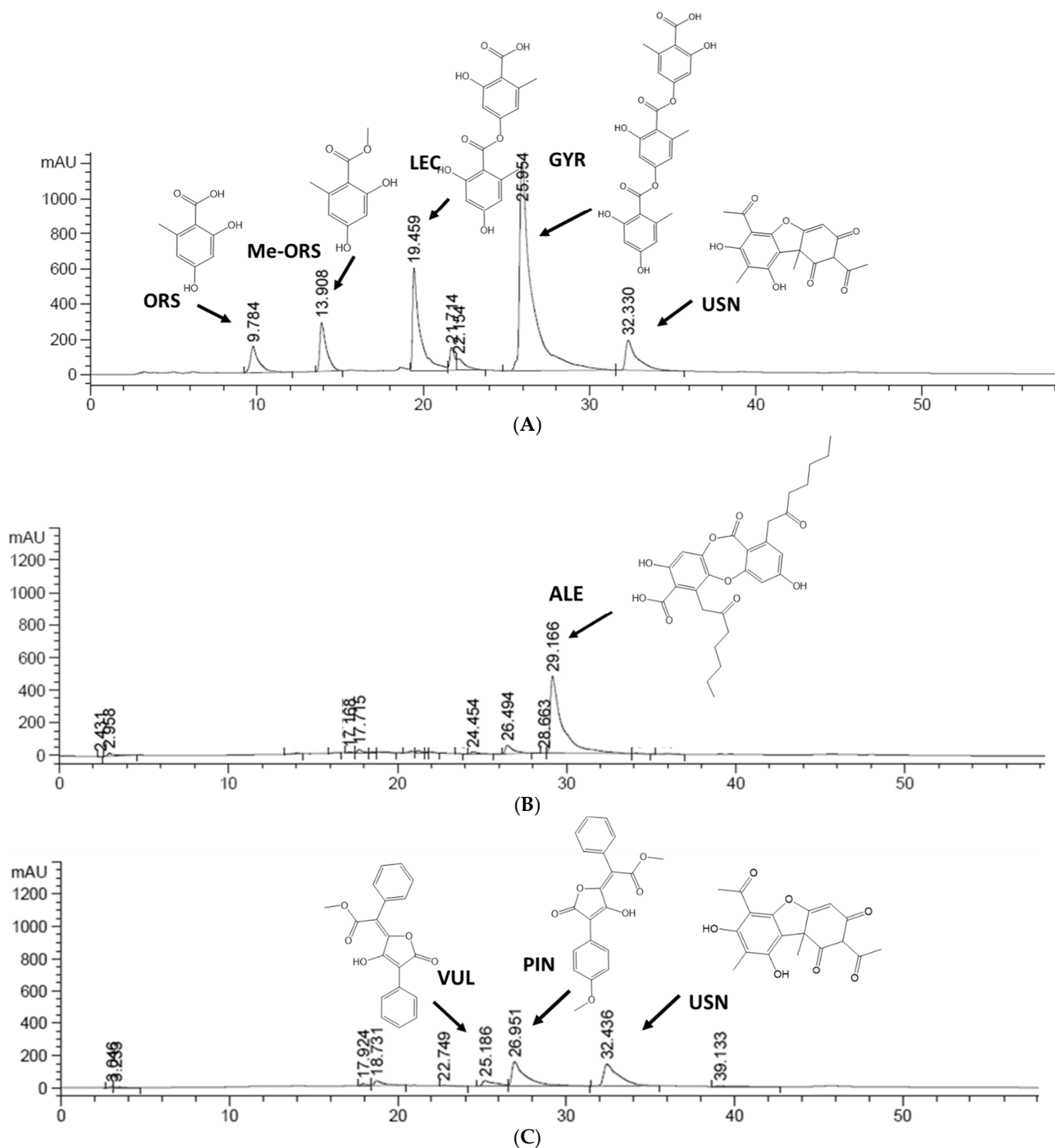


Figure 6. Representative HPLC chromatograms ($\lambda = 254$ nm) (A) *Dactylina artica* (B) *Tuckermannopsis americana* (C) *Vulpicida pinastri*.

3. Discussion

The present work demonstrated that pretreatments with methanol lichen extracts from cetrarioid clade provide neuroprotection against hydrogen peroxide in SH-SY5Y cells as evidenced in ROS reduction, improvement in oxidative stress biomarkers and antioxidant enzyme activity and mitochondrial protection.

The brain is a metabolically active organ that yields high ROS levels compared to other organs. Moreover, neurons are the most sensitive cell types to free radicals [11]. Overproduction of ROS can lead to oxidative macromolecules injury and consequently, to cell death. Activation of necrotic and apoptotic pathways by ROS induces cell death. Among the mechanisms responsible for ROS-causing apoptosis are receptor activation, caspase activation and mitochondrial dysfunction [12]. Oxidative stress (ROS/antioxidant imbalance) has been implicated in the initiation and progression of age-related neurodegenerative diseases [13]. Therefore, the prevention of oxidative stress is one of the most promising strategies for all those diseases that involve an alteration of redox homeostasis. H_2O_2 acts as an inducer of oxidative stress damage, increasing ROS levels and leading to cell death. The current study found that methanol lichen extracts from cetrarioid clade significantly attenuated hydrogen peroxide-induced ROS production in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line and consequently prevented cell death. Hydrogen peroxide can cross cell membranes and cause oxygen-derived free radicals. Hence, hydrogen peroxide can be converted into hydroxyl radicals in the presence of ferrous ions (Fenton reaction) [14]. Lichens contain phenolic compounds in their composition which can act as antioxidants through mechanisms such as radical scavenging activity and metal chelating activity [15–17].

Furthermore, these methanol lichen extracts mitigated changes in biomarkers of oxidative stress (lipid peroxidation reduction and GSH increase). The brain presents the highest rate of lipid metabolism in the body. In Alzheimer's disease and in Parkinson's diseases, there is an overproduction of ROS that induces the oxidation of lipid membrane constituents, leading to lipid hydroperoxides. This process, named lipid peroxidation, constitutes a hallmark for most neurodegenerative disorders. In fact, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are the main target of ROS attack, due to the high number of double bonds in their structure [18,19]. This early event in the brain causes cytotoxic and genotoxic effects. TBARS is a common biomarker of polyunsaturated fatty acids peroxidation. High amounts of lipid peroxidation products have been identified in post-mortem brains of people affected with neurodegenerative diseases. These lipid peroxidation products cause tissue injury and failures of antioxidant systems [20]. The lichen extracts of *V. pinastri* and *D. arctica* markedly reduced lipid peroxidation in neuroblastoma cells. Glutathione (GSH) is the major endogenous antioxidant defense. This primary antioxidant scavenges free radicals through its thiol group of its cysteine residue, and it functions as a co-substrate of the antioxidant enzymes selenium-glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) [21]. GPx reduces lipid peroxides to alcohols and aldehydes. It has been reported that a reduction of GSH to its oxidized form provokes a decrease in intracellular GSH [22]. Restoring the levels of GSH is strongly related to the ROS and lipid peroxidation reduction [18]. Previous studies reported that fumarprotocetraric acid (depsidone), evernic acid (depside) and usnic acid (dibenzofuran-like) inhibited ROS generation, lipid peroxidation and glutathione depletion in neurons and the astrocytes cell model using hydrogen peroxide as an oxidative stress inductor [23,24]. In addition, the Parmeliaceae lichens *Cetraria islandica* and *Vulpicida canadensis* also showed protective effects against H_2O_2 -induced injury in the human astrocytoma cell line U373-MG, as evidenced by reduced ROS production, increased GSH levels and the inhibition of lipid peroxidation [9].

Moreover, lichen extracts increase SOD and CAT activity. The enzyme SOD catalyzes the dismutation of superoxide anion to hydrogen peroxide which is then converted into oxygen and water by the action of the antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase. The enzymatic activity of SOD and CAT showed to be significantly reduced in postmortem brain tissue at an advanced age [22]. Therefore, the results of this study showed that of the four methanol lichen extracts tested, *N. stracheyi* exerted its neuroprotective activity via ROS inhibition and increased CAT activity while *V. pinastri*, *D. arctica*, and *T. americana* prevented ROS overproduction and maintained enzymes activity. Upregulation of enzymes activity could be associated with an increase in its expression. Previously, it has been demonstrated that the depside fumarprotocetraric acid, isolated from *Cetraria islandica*, upregulated the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase-1, and hemoxygenase-

1 expression which was related to Nrf2 signaling pathway activation [23]. Other lichens such as *Parmotrema perlatum* and *Hypotrachyna formosana* have also evidenced to reduce intracellular ROS generation, inhibit the peroxidation of lipids, and increase GSH levels and SOD activity [25].

Mitochondria are a major cellular organelle that play a key role in aging and degenerative diseases and are a target for oxidative damage. Mitochondria are the main source of ROS, particularly of superoxide radicals, through the complexes I and III of the respiratory chain [26,27]. An overproduction of mitochondria ROS may alter membrane permeability and calcium homeostasis as well as induce DNA mutations and injure the mitochondrial respiratory chain [28]. In our study, methanol lichen extracts of *V. pinastri* and *D. arctica* prevented mitochondrial changes by regulating calcium homeostasis and increasing mitochondrial membrane potential, suggesting a protective activity against H₂O₂. These extracts which target mitochondria are of great interest because they can pass across the mitochondrial phospholipid bilayer and reduce ROS damage at the heart of the source [29]. Other studies demonstrated that the depsidone fumarprotocetraric isolated from *Cetraria islandica* prevented mitochondrial membrane potential dissipation and mitochondrial calcium increase [9].

The analytical study by HPLC-UV revealed that the major compounds presented in *V. pinastri* were usnic acid, pinastric acid and vulpinic acid, and in *D. arctica* were gyrophoric acid, lecanoric acid and usnic acid, while in *T. americana* it was alectoronic acid. Lichen compounds are biosynthesized through three pathways: via the acetylpolymanolate pathway which produces depsides, depsidones and dibenzofurans, the shikimic pathway which produces pulvinic acids and the mevalonic acid pathway which is involved in terpenes formation. Therefore, gyrophoric acid and lecanoric acid are depsides, usnic acid is a dibenzofuran, alectoronic acid is a depsidone and vulpinic acid and pinastric acid are pulvinic acids [30,31]. All these lichen compounds have shown a great diversity of activities including anti-cancer (i.e., gyrophoric acid, vulpinic acid), antimicrobial (i.e., gyrophoric acid, usnic acid, vulpinic acid) photoprotective (i.e., gyrophoric acid) and neuroprotective (i.e., usnic acid) activities [32–37].

Based on the chemical structure of lichen compounds and its potential antioxidant activity, the depsides gyrophoric acid and lecanoric acid have carboxyl and hydroxyl groups that interact with several enzymatic active sites. Moreover, the aromatic rings of gyrophoric acid and lecanoric acid are responsible for their free radical scavenging properties [38,39]. Among the lichens investigated in this study, *D. arctica* was the most active specie. Previous works have shown that *D. arctica* has potent antioxidant properties (ORAC value 8.2 $\mu\text{mol TE/mg}$ dry extract, DPPH value IC₅₀ 346.3 $\mu\text{g/mL}$ and FRAP value 29.6 $\mu\text{mol of Fe}^{2+}$ eq/g sample) which are attributed to the anti-free radical properties of gyrophoric acid and lecanoric acid [10].

On the other hand, the antioxidant properties of *V. pinastri* are mainly due to the presence of vulpinic acid and pinastric acid. These pulvinic acids have a butanolide ring with an -OH group at the 4-position and a carboxylic acid function at the double bond. This double bond is involved in radical stabilization, and is a good descriptor of antioxidant properties [17]. The antioxidant activity of pulvinic acids has been demonstrated using quantitative structure–activity relationship (QSAR) techniques combined with a multivariate analysis [40,41].

Regarding lichen compounds with a depsidone structure, previous studies revealed that they are potent hydroxyl and superoxide anion radical scavengers in polar environments but not good peroxy radical scavengers [15]. Moreover, a better hydrogen-donating potency in those depsidones with no butyrolactone ring has been reported; this is the case of alectoronic acid, which has been identified in *T. americana* [42]. Finally, the compound usnic acid, presented in *D. arctica* and *V. pinastri*, has shown reducing potential in DPPH, ABTS and DMPD radical cation assays, and superoxide radical and peroxy radical scavenging abilities [16,37]. In addition to this, the presence of a phenolic ring with functional groups of -CO, -COH and -COOH showed metal chelating ability, including Fe²⁺ ion [16].

4. Materials and Methods

4.1. Reagents

All reagents were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) except for HPLC grade methanol and dimethyl sulfoxide (DMSO), that were purchased from Pan-reac (Barcelona, Spain). Molecular probes were obtained from Invitrogen-Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA).

4.2. Lichen Collection and Preparation of Methanol Extracts

The lichens *Dactylina arctica* (Central Siberia, Russia, July 1995; MAF-Lich 96262), *Nephromopsis stracheyi* (North Sikkim, India, August 2004; MAF-Lich 22748), *Tuckermannopsis americana* (Maine, USA, June 2010; MAF-Lich 19828) and *Vulpicida pinastri* (Alto del Peñón, Zamora, Spain, September 2017; MAF-Lich 22753) were identified and authenticated by Dr. P.K. Divakar and Professor A. Crespo and preserved in the Herbarium of the Faculty of Pharmacy (MAF), University Complutense of Madrid (Spain).

For the preparation of extracts, 2 mL of pure methanol was mixed with dry thalli samples (50 mg) and after being shaken for 20 s, every 15 min for 2 h, was left overnight. Methanol extracts were filtered (0.45 µm pore) and evaporated at room temperature. Dry residues were stored until their use.

4.3. Human Neuroblastoma Cell Line (SH-SY5Y Cells)

SH-SY5Y cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.5% gentamicin at 37 °C and 5% CO₂/95% air. Confluence was between 80 and 90%.

4.4. Cell Treatments

Lichen extracts were dissolved in DMSO and PBS (1 mg/mL) as stock. Serial dilutions were then made with PBS. SH-SY5Y cells were pretreated with different concentrations of methanol lichen extracts for 24 h, before H₂O₂ (250 µM, 1 h). Final DMSO concentration was lower than 0.1% at the highest concentration.

4.5. Metabolic Activity Measurement

Survival rate and cytoprotection were determined using an MTT assay according to the method described by Mosmann [43] with some modifications. After treatments, a solution of MTT (2 mg/mL, 100 µL) was added to wells, and plates were incubated for 1 h. Then, the medium was removed, and formazan crystals were dissolved with DMSO (100 µL). Absorbance was measured at 550 nm with a Spectrostar BMG microplate reader.

4.6. Intracellular ROS Production

Intracellular ROS production was determined using a DCFH-DA assay as described by LeBel et al. (1992) [44]. Briefly, DCFH-DA dissolved in DMEM medium (1%) without phenol red was added to 96-well plates for 30 min. This solution was then removed, and cells were treated with non-cytotoxic lichen concentrations for 24 h before hydrogen peroxide (250 µM). Fluorescence was measured with a microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at excitation/emission wavelength 485/528 nm.

4.7. BCA Assay

The protein concentration was calculated using a bicinchoninic acid (BCA) assay. The colorimetric reaction was measured at 550 nm in a Spectrostar microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Samples of total cellular extracts were mixed with a reaction solution [bicinchoninic acid and copper (II) sulfate]. The purple color proportionally increased with the amount of protein. A bovine serum albumin (BSA) curve was used to normalize protein [45].

4.8. Glutathione Levels

GSH content was determined following the Hissin and Hilf (1976) method with some modifications [46]. In 96-well plates, phosphate-EDTA buffer (pH 8.0, 150 μ L) was mixed with total extract samples (50 μ L). Then, O-phthalaldehyde (OPT) was added (20 μ L) and samples were incubated for 15 min in the dark. Fluorescence was measured at an excitation/emission wavelength 360/460 nm. A standard curve of reduced GSH was used.

4.9. Antioxidant Enzymatic Activity

4.9.1. SOD Enzymatic Activity

Superoxide dismutase catalyzes the conversion of superoxide anions into oxygen and hydrogen peroxide. In 96-well plates, it was added to the reaction mixture consisting of total cellular extracts, EDTA, buffer phosphate (pH 7.8, with 0.2% Triton X-100), hydroxylamine chlorohydrate, and nitroblue tetrazolium (NBT). NBT reduction was measured at 530 nm each minute, during 15 min, using a SPECTROstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) [47].

4.9.2. CAT Activity

In 96-well plates, total cell extracts were mixed with hydrogen peroxide (14 mM). Absorbance was measured at 240 nm wavelength for 1 min using a SPECTROstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) following Aebi et al.'s method with some modifications [48].

4.10. TBARS Assay

Lipid peroxidation was determined by performing a TBARS assay [49]. After treatments, cell pellets were stored at 80 °C. On the day of the experiment, pellets were defrosted at room temperature and were mixed with TBA-TCA-HCl. This mixture was boiled at 100 °C for 10 min. Samples were placed on ice to stop the reaction. Then, samples were centrifuged at 4 °C (3000 rpm, 10 min) and supernatants were added into 96-well plates to measure absorbance at 530 nm using a SPECTROstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Results were expressed as a percentage of TBARS (100% of control).

4.11. Calcium Cytosolic Quantification

Calcium cytosolic was quantified using Indo-1/AM as a cell-permeant dye [50]. After treatments, a Krebs medium containing Indo-1/AM dye (3 mM) and calcium (1mM CaCl₂) was added to cells for 45 min at 37 °C. Then, the medium was removed, and cells were incubated with a dye-free Krebs medium for 15 min at 37 °C in the dark. Fluorescence was recorded in a microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 350 nm excitation wavelength and at 410 nm emission wavelength. The formula for cytosolic calcium concentration was $[Ca^{2+}]_i = Kd \times [F - F_{min}] / [F_{max} - F]$, where Kd is the dissociation constant for Indo-1; F is the fluorescence signal for samples; F_{max} is the maximum fluorescence signal after ionomycin addition and F_{min} is calculated using this formula: $F_{min} = AF + 1/12 \times (F_{max} - AF)$, AF being the minimum fluorescence after adding MnCl₂.

4.12. Mitochondrial Calcium Quantification

Mitochondrial calcium was quantified using Rhod-2/AM as a fluorescent cationic probe [51]. After treatments, cells were incubated in a Krebs medium containing 0.1% BSA, 1 mM calcium and 10 mM Rhod-2/AM during 40 min at 37 °C. Then, cells were maintained in dye-free Krebs medium cells in this medium for 30 min at 37 °C in the dark. Basal fluorescence intensity was recorded using a microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at λ 552 nm excitation wavelength and λ 581 nm emission wavelength for 5 min at 37 °C. Then, maximum fluorescence was measured for 15 min after adding calcium ionophore A23187 (5 μ M) in the same conditions as described above.

Mitochondrial calcium levels were the ratio between fluorescence measures before and after ionophore addition. Results were expressed relative to control.

4.13. Mitochondrial Membrane Potential (MMP)

Mitochondrial membrane potential was quantified using the fluorescent cationic dye tetramethylrhodaminemethylester (TMRM) following Correia et al.'s (2012) protocol with some modifications [52]. After cell treatments, the Krebs medium with calcium (1 mM CaCl₂) and TMRM (250 nM) was added. A FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) microplate reader was used to measure basal fluorescence activity at λ 549 nm excitation and λ 573 nm emission at 37 °C for 45 min. Then, the maximum fluorescence value was estimated after adding FCCP (6 mM) and oligomycin (0.25 mg/mL). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) is the result by subtracting fluorescence basal values from maximum fluorescence values. Results were expressed as % of the control.

4.14. Secondary Metabolites Detection Using High Performance Liquid Chromatography

HPLC analysis was used for secondary metabolites detection using the method described by de Paz et al. (2010) [53]. The HPLC instrumentation was an Agilent 1260 instrument (Agilent Technologies, CA, USA) equipped with a photodiode array detector (190–800 nm) and a reversed-phase Mediterranean Sea 18 column (150 mm \times 4.6 mm, 3 μ m particle size; Teknokroma, Barcelona, Spain). Running conditions included: a mobile gradient phase [1% orthophosphoric acid in milli-Q water (A)/methanol (B)]; a flow rate of 0.6 mL/min; a column temperature of 40 °C and a UV spectrum between 190 and 400 nm. Secondary metabolites of lichens were identified by comparing the retention time and UV absorption spectra with standard compounds (commercialized and isolated previously by our research team) and other lichen species [9,54].

4.15. Statistical Analysis

All assays were measured in triplicate and data were expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed by SigmaPlot 11.0 using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test (5% significance level).

5. Conclusions

In conclusion, our findings provide evidence of the protective activity of methanol extracts obtained from cetrarioid clade against the neurotoxic effects of hydrogen peroxide in neuroblastoma cells. *D. arctica* and *V. pinastri* afford the highest protective effect. Future research should be aimed at studying the protective activity of isolated compounds from *D. arctica* and *V. pinastri*, delving into their mechanism of action.

Author Contributions: Conceptualization, I.U.-V., E.G.-B. and M.P.G.-S.; Methodology: I.U.-V.; Investigation, I.U.-V. and E.G.-B.; Formal analysis, I.U.-V. and E.G.-B.; Data Curation, I.U.-V. and E.G.-B.; Writing—Original Draft Preparation, I.U.-V. and E.G.-B.; Validation, E.G.-B.; Writing—Review & Editing, P.K.D. and M.P.G.-S., Supervision, E.G.-B. and M.P.G.-S., Project administration. P.K.D. and M.P.G.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (PID2019-105312GB-I00) and the Santander-University Complutense of Madrid (PR87/19-22637). I. Ureña Vacas was supported by a grant CT42/18-CT43/18 from Complutense University of Madrid for predoctoral research.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Sample Availability: Samples are not available from the authors.

References

1. Salim, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2017**, *360*, 201–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Cogley, J.N.; Fiorello, M.L.; Bailey, D.M. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol.* **2018**, *15*, 490–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Huang, W.J.; Zhang, X.; Chen, W.W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed. Rep.* **2016**, *4*, 519–522. [[CrossRef](#)]
4. Gottfredsen, R.H.; Larsen, U.G.; Enghild, J.J.; Petersen, S.V. Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 24–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 613–619. [[CrossRef](#)]
6. Zhao, Z. Iron and oxidizing species in oxidative stress and Alzheimer's disease. *Aging Med.* **2019**, *2*, 82–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Huang, Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene* **2000**, *19*, 6627–6631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lü, J.M.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J. Cell Mol. Med.* **2010**, *14*, 840–860. [[CrossRef](#)]
9. Fernández-Moriano, C.; Divakar, P.K.; Crespo, A.; Gómez-Serranillos, M.P. Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two Parmeliaceae lichens: Identification of active compounds. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 847–855. [[CrossRef](#)]
10. Ureña-Vacas, I.; González-Burgos, E.; De Vita, S.; Divakar, P.K.; Bifulco, G.; Gómez-Serranillos, M.P. Phytochemical Characterization and Pharmacological Properties of Lichen Extracts from Cetrarioid Clade by Multivariate Analysis and Molecular Docking. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2022**, *2022*, 5218248. [[CrossRef](#)]
11. Gilgun-Sherki, Y.; Melamed, E.; Offen, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* **2001**, *40*, 959–975. [[CrossRef](#)]
12. Ryter, S.W.; Kim, H.P.; Hoetzel, A.; Park, J.W.; Nakahira, K.; Wang, X.; Choi, A.M.K. Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **2006**, *9*, 49–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kim, G.H.; Kim, J.E.; Rhie, S.J.; Yoon, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp. Neurobiol.* **2015**, *24*, 325–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ofoedu, C.E.; You, L.; Osuji, C.M.; Iwouno, J.O.; Kabuo, N.O.; Ojukwu, M.; Agunwah, I.M.; Chacha, J.S.; Muobike, O.P.; Agunbiade, A.O.; et al. Hydrogen Peroxide Effects on Natural-Sourced Polysaccharides: Free Radical Formation/Production, Degradation Process, and Reaction Mechanism—A Critical Synopsis. *Foods* **2021**, *10*, 699. [[CrossRef](#)]
15. Bay, M.V.; Nam, P.C.; Quang, D.T.; Mechler, A.; Hien, N.K.; Hoa, N.T.; Vo, Q.V. Theoretical Study on the Antioxidant Activity of Natural Depsidones. *ACS Omega* **2020**, *5*, 7895–7902. [[CrossRef](#)]
16. Hoa, N.T.; Van Bay, M.; Mechler, A.; Vo, Q.V. Is Usnic Acid a Promising Radical Scavenger? *ACS Omega* **2020**, *5*, 17715–17720. [[CrossRef](#)]
17. Le Roux, A.; Kuzmanovski, I.; Habrant, D.; Meunier, S.; Bischoff, P.; Nadal, B.; Thetiot-Laurent, S.A.L.; Le Gall, T.; Wagner, A.; Novič, M. Design and Synthesis of New Antioxidants Predicted by the Model Developed on a Set of Pulvinic Acid Derivatives. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 3050–3059. [[CrossRef](#)]
18. Angelova, P.R.; Esteras, N.; Abramov, A.Y. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Med. Res. Rev.* **2021**, *41*, 770–784. [[CrossRef](#)]
19. Lin, M.C.; Liu, C.C.; Lin, Y.C.; Liao, C.S. Resveratrol Protects against Cerebral Ischemic Injury via Restraining Lipid Peroxidation, Transition Elements, and Toxic Metal Levels, but Enhancing Anti-Oxidant Activity. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1515. [[CrossRef](#)]
20. Yoshida, Y.; Umeno, A.; Shichiri, M. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2013**, *52*, 9–16. [[CrossRef](#)]
21. Leong, P.K.; Ko, P.M. Induction of the Glutathione Antioxidant Response/Glutathione Redox Cycling by Nutraceuticals: Mechanism of Protection against Oxidant-induced Cell Death. *J. Nutraceuticals Food Sci.* **2016**, *1*, 1.
22. Salminen, L.E.; Paul, R.H. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: A theoretical review. *Rev. Neurosci.* **2014**, *25*, 805–819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Fernández-Moriano, C.; Divakar, P.K.; Crespo, A.; Gómez-Serranillos, M.P. In vitro neuroprotective potential of lichen metabolite fumarprotocetraric acid via intracellular redox modulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2017**, *316*, 83–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fernández-Moriano, C.; Divakar, P.K.; Crespo, A.; Gómez-Serranillos, M.P. Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *105*, 262–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sieteiglesias, V.; González-Burgos, E.; Bermejo-Bescós, P.; Divakar, P.K.; Gómez-Serranillos, M.P. Lichens of Parmelioid Clade as Promising Multitarget Neuroprotective Agents. *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32*, 1165–1177. [[CrossRef](#)]
26. Lenaz, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: Mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* **2001**, *52*, 159–164. [[CrossRef](#)]
27. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 1–13. [[CrossRef](#)]
28. Guo, C.; Sun, L.; Chen, X.; Zhang, D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen. Res.* **2013**, *8*, 2003–2014. [[CrossRef](#)]
29. Oyewole, A.O.; Birch-Machin, M.A. Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB J.* **2015**, *29*, 4766–4771. [[CrossRef](#)]

30. Goga, M.; Elečko, J.; Marcinčinová, M.; Ručová, D.; Bačkorová, M.; Backor, M. Lichen Metabolites: An Overview of Some Secondary Metabolites and Their Biological Potential. In *Co-Evolution of Secondary Metabolites*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018; pp. 1–36.
31. Calcott, M.J.; Ackerley, D.F.; Knight, A.; Keyzers, R.A.; Owen, J.G. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 1730–1760. [[CrossRef](#)]
32. Lauterwein, M.; Oethinger, M.; Belsner, K.; Peters, T.; Marre, R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (–)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2541–2543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Candan, M.; Yilmaz, M.; Tay, T.; Erdem, M.; Türk, A.O. Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Parmelia sulcata* and its salazinic acid constituent. *Z. Nat. C J. Biosci.* **2007**, *62*, 619–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bačkorová, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Jendželovský, R.; Fedoročko, P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol. Vitro.* **2011**, *25*, 37–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Koparal, A.T. Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances (–)-usnic acid and vulpinic acid. *Z. Nat. C J. Biosci.* **2015**, *70*, 159–164. [[CrossRef](#)]
36. Varol, M.; Türk, A.; Candan, M.; Tay, T.; Koparal, A.T. Photoprotective Activity of Vulpinic and Gyrophoric Acids toward Ultraviolet B-Induced Damage in Human Keratinocytes. *Phytother. Res.* **2016**, *30*, 9–15. [[CrossRef](#)]
37. Cetin Cakmak, K.; Gulçin, I. Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid—an activity-structure insight. *Toxicol. Rep.* **2019**, *6*, 1273–1280. [[CrossRef](#)]
38. Manojlovic, N.T.; Vasiljevic, P.J.; Maskovic, P.Z.; Juskovic, M.; Bogdanovic-Dusanovic, G. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, *2012*, 452431. [[CrossRef](#)]
39. Mohammadi, M.; Bagheri, L.; Badreldin, A.; Fatehi, P.; Pakzad, L.; Suntres, Z.; van Wijnen, A.J. Biological Effects of Gyrophoric Acid and Other Lichen Derived Metabolites, on Cell Proliferation, Apoptosis and Cell Signaling pathways. *Chem. Biol. Interact.* **2022**, *351*, 109768. [[CrossRef](#)]
40. Martinčič, R.; Kuzmanovski, I.; Wagner, A.; Novič, M. Development of models for prediction of the antioxidant activity of derivatives of natural compounds. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *868*, 23–35. [[CrossRef](#)]
41. Ahmadi, S.; Ghanbari, H.; Lotfi, S.; Azimi, N. Predictive QSAR modeling for the antioxidant activity of natural compounds derivatives based on Monte Carlo method. *Mol. Divers.* **2021**, *25*, 87–97. [[CrossRef](#)]
42. Lohézic-Le Dévéhat, F.; Tomasi, S.; Elix, J.A.; Bernard, A.; Rouaud, I.; Uriac, P.; Boustie, J. Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1218–1220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [[CrossRef](#)]
44. LeBel, C.P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 227–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85. [[CrossRef](#)]
46. Hissin, P.J.; Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* **1976**, *74*, 214–226. [[CrossRef](#)]
47. Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **1971**, *44*, 276–287. [[CrossRef](#)]
48. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzym.* **1984**, *105*, 121–126. [[CrossRef](#)]
49. Mihara, M.; Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **1978**, *86*, 271–278. [[CrossRef](#)]
50. Resende, R.; Ferreira, E.; Pereira, C.; Resende de Oliveira, C. Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1–42: Involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience* **2008**, *155*, 725–737. [[CrossRef](#)]
51. Takahashi, A.; Camacho, P.; Lechleiter, J.D.; Herman, B. Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 1089–1125. [[CrossRef](#)]
52. Correia, S.C.; Santos, R.X.; Cardoso, S.M.; Santos, M.S.; Oliveira, C.R.; Moreira, P.I. Cyanide preconditioning protects brain endothelial and NT2 neuron-like cells against glucotoxicity: Role of mitochondrial reactive oxygen species and HIF-1 α . *Neurobiol. Dis.* **2012**, *45*, 206–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. de Paz, G.A.; Raggio, J.; Gómez-Serranillos, M.P.; Palomino, O.M.; González-Burgos, E.; Carretero, M.E.; Crespo, A. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53*, 165–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Yoshimura, I.; Kinoshita, Y.; Yamamoto, Y.; Huneck, S.; Yamada, Y. Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. *Phytochem. Anal.* **1994**, *5*, 197–205. [[CrossRef](#)]

Capítulo 5

Evaluación del papel neuroprotector del ácido giróforico y su permeabilidad en modelos de paso de barrera hematoencefálica.

Publicación enviada

Neuroprotective effects and blood barrier permeability of the lichen tridepside gyrophoric acid

**Neuroprotective effects and blood barrier permeability of the lichen
tridepside gyrophoric acid**

Ureña-Vacas I, Leri, M., González-Burgos E, Bucciantini, M., Divakar PK, Gómez-Serranillos MP.

Formato:Article. Enviado para publicar (2023)

Neuroprotective effects and blood brain barrier permeability of the lichen tridepside gyrophoric acid

Isabel Ureña-Vacas¹, Manuela Leri², Elena González-Burgos¹, Monica Bucciantini², Pradeep Kumar Divakar¹ and María Pilar Gómez-Serranillos^{1*}

¹ Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain; isabelur@ucm.es (I.U.-V.); elenagon@ucm.es (EGB); pkdivaka@ucm.es (P.K.D.); pserra@ucm.es (M.P.G.-S.)

² Department of Biomedical, Experimental and Clinical Sciences, University of Firenze, 50134 Firenze, Italy; manuela.leri@unifi.it (M.L.); monica.bucciantini@unifi.it (M.B.)

* Correspondence: pserra@ucm.es

Abstract: The impact of age-related diseases such as neurodegenerative diseases and ischemic brain injury extends to millions of people globally, causing substantial disability, reduced quality of life and higher healthcare expenses. Oxidative stress and structural and functional loss of neurons are the main hallmarks of these diseases, either as an initiator or progression executor. Lichen secondary chemistry has been explored in the last decades, and many compounds, such as depsides and depsidones, have demonstrated important bioactive activities. This work presents for the first time the neuroprotective potential of the tridepside gyrophoric acid (GA), due to its antioxidant and neuromodulatory effects. GA reduced H₂O₂-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells, improving the viability and the morphological changes and decreasing the intracellular ROS production. Moreover, pretreatments with GA enhanced antioxidant enzymes levels (catalase, superoxide dismutase-1, -2 and glutathione reductase) and reduced the biomarkers of apoptosis Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 expression. GA also increased LC3-II expression, suggesting the involvement of autophagic process. On the other hand, GA increased neurodifferentiation, synaptogenesis and axonal growth, as evidenced in an increased of neuronal biomarkers (NeuN, Synaptophysin, p-tau and GAP43). Moreover, uptake and permeability studies have demonstrated that GA can potentially permeate across the blood-brain barrier using RBE4 and hCMEC/D3 cell lines, respectively. In conclusion, GA is proposed as a potentially good candidate for treating neurodegeneration, considering its safe toxicity profile, moderate oral absorption, and the presented results. Further *in vivo* studies are required to validate these findings.

Keywords: neuroprotection, antioxidant, anti-apoptotic, autophagy, neurogenesis, lichen, blood brain barrier.

1. Introduction

The aging process results in a gradual decline in functionality across various organ systems, including the brain. This deterioration increases the susceptibility to suffer some type of neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD), and Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) as well as of ischemic strokes [1,2]. The mechanisms involved in neuronal death and damage following an ischemic stroke are like those that occur during brain aging including oxidative stress, inflammation, mitochondrial dysfunction, and abnormal autophagic processes [3]. It is worth noting that the capacity of the brain for self-repair diminishes during the complex process of aging.

Oxidative stress (OS) is a key hallmark of neurodegenerative diseases. It refers to the imbalance caused by an excessive production of reactive oxygen species (ROS) in comparison to a deficient antioxidant response. The brain is particularly vulnerable to ROS due to its high energy demands, the presence of transition metals such as copper (Cu^{2+}) and iron (Fe^{2+}), the abundance of polyunsaturated fatty acids and cholesterol, and the autoxidation of neurotransmitters [4]. Similarly, in ischemic stroke, the occlusion of a cerebral artery hampers blood flow to the brain, leading to a lack of oxygen and glucose, resulting in neuronal damage. This highlights the significance of oxidative stress in neuronal dysfunction in stroke as well [5].

Furthermore, aberrant autophagy, including also excessive activation, and induction of apoptosis has been reported as significant events in these proteinopathies and ischemia [6,7]

The accumulation of various damage initiators ultimately leads to neuronal cell loss. Recent studies have suggested that an imbalance in neurotrophic factors and an impairment in neurogenesis and synaptic plasticity may play a role in the early stages of Alzheimer's disease [8,9]. Furthermore, non-motor symptoms in Parkinson's disease have been linked to impaired hippocampal neurogenesis, likely due to degeneration of dopaminergic neurons involved in regulating synaptic plasticity [10]. Similar to neurodegenerative disorders, after an ischemic stroke, cells are unable to regenerate or repair the affected areas [11]. As such, adult neurogenesis and induction of neurodifferentiation have been proposed as potential strategies for promoting neuron regeneration and nerve repair in these disorders [12].

Therefore, treatments targeting mechanisms such as oxidative stress, deregulation of autophagy and apoptosis, and neurogenesis and neuronal differentiation may be beneficial for both stroke and age-related diseases.

However, it should be noted that most *in vitro* results do not correlate with *in vivo* and clinical studies, which are often stopped. The delivery of therapeutic agents to the central nervous system (CNS) is often hindered by the presence of the blood-brain barrier (BBB), a restrictive barrier that separates the CNS from systemic circulation. Despite the use of *in silico* tools for the rapid screening of BBB permeation, validation through experimental methods is necessary to confirm their efficacy [13].

Nowadays, due to the limited effectiveness of commercial drugs, natural compounds such as quercetin, resveratrol and curcumin from plants are gaining considerable importance as promising neuroprotective substances [14]. The current work is focused in investigating the potential neuroprotective properties of natural compounds derived from lichens. Lichens are symbiotic organisms composed of a mycobiont (fungus) and photobiont (algae/cyanobacteria); they are often accompanied by bacterial microbiomes and lichenicolous fungi [15]. The diversity of their living association, along with their adaptation to extreme conditions made them unique organisms with specific bioactive compounds. Among these compounds, depsides synthesized via acetate-malonate pathway, have been identified as responsible for various therapeutic activities including neuroprotection [16]. In fact, recent studies have shown that rosmarinic acid, a depside isolated from plants, exhibits neuroprotective activities in neurodegenerative diseases and ischemic stroke [17,18].

The aim of this study is to investigate for the first time the neuroprotective activities of the lichen compound gyrophoric acid (GA). GA is a tridepside with significant potential in medicinal applications, due to its antioxidant capacity as a scavenger of free radicals and its ability to target diverse enzymes with low affinity such as zinc-dependent metalloprotease neprilysin or protein tyrosine phosphatase 1B [19]. Then, in the present work, it has been studied for the first time the neuroprotective role of GA in a hydrogen peroxide-induced oxidative stress model and its neurogenesis effects using the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. In addition, its ability to pass across the BBB has been determined by *in silico* methods and *in vitro* cell assays using the rat brain endothelial RBE4 cell line for uptake studies and the human cerebral microvascular endothelial (hCMEC/D3) cells for permeability studies.

2. Materials and Methods

1.1 Lichen compounds

Gyrophoric acid (GA) were purchased from Molport (Riga, Latvia) with a degree of purity of $\geq 98\%$.

1.2 Cell culture

Oxidative stress-induced model and neurotrophic effects were studied on the human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line (ATCC, Manassas, Virginia). SH-SY5Y cells were grown in Basic Growth Media (DMEM/F12 (1:1)) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2.0 mM L-glutamine and 100 units/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. For SH-SY5Y cell differentiation was used a differentiation medium (DMEM/F12 (1:1)) with 2 mM L-glutamine, 3% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 10 μM retinoic acid (RA), as previously reported [20]. For uptake studies, rat brain endothelial RBE4 cells were cultured on precoated rat tail collagen sterile petri dishes and grown in Nutrient mixture F-10/ α -MEM (1:1) supplemented with 10% FBS, 1 ng/ml bFGF, 20mM HEPES and 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ geneticin G418. For permeability studies, the human cerebral microvascular endothelial (hCMEC/D3) cell line (Tebu-Bio, Barcelona, Spain) was grown on precoated rat collagen I (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) surfaces and maintained in EBM-2 medium, supplemented with 5% FBS, 10 mM HEPES, 1 ng/ml bFGF, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid, 1.4 μM hydrocortisone, chemically defined lipid concentrate (1/100) and 1% penicillin and streptomycin. All these cell lines were incubated in a humidified incubator at 37°C and 5% $\text{CO}_2/95\%$ air. Cells were split 1:8 or 1:10 every 3 days and the number of passages did not exceed 30.

1.3 MTT Assay

MTT assay with some modifications was used to assess survival rate and cytoprotection. SH-SY5Y cells were seeded into 96-well plates at a density of 6,000 cells/well. After treatments with GA for 24h, MTT solution (0.5 mg/ml) was added to wells and cells were incubated for 1 h at 37°C. Formazan crystals were dissolved with DMSO (100 μL). Absorbance was measured at 595 nm in SPECTROStar Omega Microplate reader (BMG Labtech, USA). The effect of the lichen compounds on cell viability was also measured after H_2O_2 exposure (250 μM) for 1 h [21].

1.4. Intracellular ROS production

Intracellular reactive oxygen species (ROS) were determined using the fluorescent probe 2,7-dichlorofluorescein diacetate, acetyl ester (CH2-DCFDA, Thermo-Fisher, Italy). After 24h pretreatments with GA cells were exposed to the H_2O_2 . CH2-DCFDA was dissolved in DMEM without phenol red (10 μM) and added to cells for 30 min. Fluorescence was measured in a FLUOstar Optima (BMG Labtech, Germany) microplate reader at a 485 nm excitation and a 528 nm emission wavelength.

1.5 Western Blot

For Western blot analysis, cellular extracts containing 20 μg of protein were prepared with lysis buffer solution (TRIS-HCl (pH 7.4), 1% Triton, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl with proteins inhibitors [(PMSF (35 $\mu\text{L}/\text{mL}$), leupeptin (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and pepstatin (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and centrifuged at 13,000 g at 4 °C for 5 min. Protein extracts were separated by 10%-18% SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and then transferred onto a PVDF membranes. Membranes were blocked with EveryBlot Blocking Solution (Bio-Rad Laboratories, California, USA) and incubated with primary antibodies [anti-SOD-1 (1:1000), anti-SOD2 (1:1000), anti-GR (1:1000), anti-CAT (1:500), anti-BAX (1:1000), anti-Bcl-2 (1:2000), anti-CSP3 (1:500), anti-LC3 (1:100) or anti- β -actin (1:50,000)] at 4°C overnight. After washing with PBS-Tween, the blots were incubated with the corresponding horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG secondary antibody for 1 h at room temperature (Santa Cruz Biotechnology,

Quimigen, Madrid, Spain). Immunosignals were revealed with ECL Prime detection kit (Bio-Rad Laboratories, California, USA). Densitometric measurements were performed using Image Quant LAS500 analyzer (GE Healthcare) and quantified using ImageJ software (version 2.1.0).

1.6 Immunofluorescence

After coverslips were placed in a 24-well plate, cells (4×10^4 per well) were seeded on them and treated as previously reported. Cells were fixed with 2.0% paraformaldehyde for 6 min and then washed with PBS. Cells were permeabilized using cold acetone/ethanol (1:1) for 4 min at room temperature and washed with PBS to remove residuals. After blocking with 0.5% BSA and 0.2% gelatin in PBS, cells were incubated with anti-NeuN polyclonal antibody (1:500), anti-synaptophysin polyclonal antibody (1:500), anti-GAP-43 polyclonal antibody (1:500) and anti-p-Tau polyclonal antibody (1:500) for 1 h at room temperature, then washed with PBS for 30 min and incubated with Alexa568-conjugated anti-rabbit antibody (1:200). Finally, coverslips were washed twice with PBS and water and mounted on glass slides using a Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma Aldrich-Merck). The coverslips were imaged using a Leica TCS SP8 scanning microscope (Leica, Mannheim, Germany) equipped with 63×, 1.4–0.6 NA, oil, HCX Plan APO lens and Leica LAS-AF image acquisition software. Quantification was measured using Fiji software version.

1.7. In silico estimation of physicochemical, ADME and toxicity parameters.

ADMETlab software (v 2.0) (<https://admetmesh.scbdd.com/>) was used to predict different parameters related to physicochemical, ADME and toxicity indicators that are essential in early stages of drug development. The Molinspiration program (<https://www.molinspiration.com/>) was employed to compare physicochemical index. Moreover, the physicochemical properties such as log P (partition coefficient n-octanol/water), logS (aqueous solubility) molecular weight, topological polar surface area (TPSA), number of hydrogen bond donors (HD) and acceptors (HA) and number of rotatable bonds (nRot), were determined. Furthermore, the following ADME parameters were calculated: Madin–Darby Canine Kidney cells (MDCK) permeability, Glycoprotein-P (Pgp)-inhibitor, Pgp substrate, Human Intestinal Absorption (HIA) and Blood Brain Barrier (BBB) Penetration. Finally, the predicted toxicity indicators hERG Blockers, Human Hepatotoxicity, AMES toxicity, Rat Oral Acute Toxicity, Skin sensitization, Carcinogenicity, and Respiratory Toxicity were also determined. These indicators are deeply explained on <https://admetmesh.scbdd.com/explanation/index>. [22].

1.8. Uptake studies

Uptake studies were carried out in 24-well plates seeded with 6×10^4 RBE4 cells/well and incubated with final concentrations of 50, 75, and 100 μM of GA for 0.5, 6, 18, and 24 h. After three cold PBS (pH 7.4) washes, cells were lysed with 1% Triton X-100 (500 μL) for 1 hour at 37 °C. Cell lysate extracts were analyzed using HPLC-UV analysis and protein concentration using BCA assay [23,24]. Results are expressed as ng/mg protein. Uptake efficiency was calculated based on the amount of GA at a particular time/ amount of the compound at time zero.

1.9. Permeability studies

Monolayer of hCMEC/D3 cells was formed in 24-well, 0.4 μm porosity PET transwell plates (Corning) after seeding with 5×10^4 cells/well. Transendothelial electrical resistance (TEER) was examined for 7-10 days ($9\text{--}10 \Omega \times \text{cm}^2$) in cell culture with an EVOM2 Epithelial Voltohmmeter and a STX100C electrode (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Permeation of standard Lucifer Yellow (flux of LY lower to 2%) was evaluated to assure the quality of the monolayer. GA was dissolved in HBSS buffer with 10 mM HEPES (< 0.1% DMSO)

For apical to basal permeability assay, 300 μL (GA or standards) were added to the upper chamber (mimicking the blood compartment), while 1 mL of HBSS buffer was

added to the lower chamber (mimicking the cerebral compartment). For basal to apical studies, GA was added in basolateral compartment. Cells were incubated for 24 h. At the end of each transport study, aliquots from the apical and basal compartments were removed and analyzed through HPLC[23]. The following equations were used:

$$P_{app} = (\text{Flux} \times V_D) / (t \times A)$$

$$\text{Ratio} = P_{app}(B-A) / P_{app}(A-B)$$

$$\text{Mass balance} = 100 \times ((V_R \times C_R^{\text{final}}) + (V_D \times C_D^{\text{final}})) / (V_D \times C^{\text{initial}})$$

where Flux is the fraction of the donated amount recovered in the receiver chamber, V_D = volume in the donor chamber (cm^3), A = membrane surface area (cm^2) and t = incubation time (s). Results were expressed as cm/s . Efflux ratio higher than 2 is considered to be evidenced for transport. Mass balance is calculated as the percentage of recovery of test compound from the donor and receiver chambers. If mass balance is poor ($\leq 65\%$ or $\geq 135\%$) poor aqueous solubility or sequestration of the test compound in the cell monolayer or in plastic surface could be suspected.

1.10. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis

HPLC analysis was used for GA identification and quantification in both uptake and permeability assay following the method described by de Paz et al.[23] The equipment consisted of an Agilent 1260 instrument (Agilent Technologies, CA, USA), with a reverse phase Mediterranean Sea 18 column ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$ particle size; Teknokroma, Barcelona, Spain) and coupled to the Agilent ChemStation software. Running conditions used were: 1% orthophosphoric acid in milli-Q water (A)/methanol (B)] as mobile phase, gradient elution, flow rate of 0.6 mL/min; UV spectrum between 190 and 400 nm. Calibration curve with GA was performed with a range of concentration from 0.01 to 25 μM .

1.11. Statistical analysis

All data were analyzed using Sigma Plot 11.0 software. For multiple comparisons, Tukey's post hoc test was performed after one-way analysis of variance (ANOVA). Results were expressed as mean \pm SD, with $p < 0.05$ values considered to be significant.

3. Results

1.1 Gyrophoric acid protects SH-SY5Y cells against H_2O_2 -induced death.

The effect of different concentrations of GA in a range from 2.5 to 200 μM on SH-SY5Y cell viability was investigated. As shown in **Figure 1A**, GA was not cytotoxic except at the concentration of 200 μM . Then, non-cytotoxic concentrations were selected to investigate the potential cytoprotective role of GA against H_2O_2 -induced neuron injury. Cells were exposed to H_2O_2 at a concentration of 250 μM for 1h in presence of increasing concentrations of GA ranging from 2.5 μM to 100 μM . A well-defined dose-dependent decrease in H_2O_2 toxicity, or increase in cell viability, was observed as shown in **Figure 1B**. H_2O_2 caused a decrease in SH-SY5Y cell viability to $61.7 \pm 3.5\%$ relative to untreated cells and cells treated with H_2O_2 and GA (100 μM) had a viability of $89.5 \pm 2.9\%$ of untreated cells.

In addition, the effect of GA on intracellular ROS production was evaluated. As shown in **Figure 1C**, hydrogen peroxide increased ROS levels by 55% compared to control cells. On the other hand, all the assayed concentrations of GA (50, 75 and 100 μM) significantly reduced ROS overproduction. This action was similar to that one observed in cells treated with Trolox (antioxidant reference compound) (**Figure 1C**). Moreover, cell viability values agree also with the cellular morphology. **Figure 1D** demonstrates cell damage after application of H_2O_2 250 μM resulting in rounded morphology, cell shrinkage, and, overall, a lower number of cells, typical features of cell death. Pretreatments with GA recovered density and morphology of SH-SY5Y cells affected by hydrogen peroxide, and the highest protective effect was observed at the 100 μM concentration.

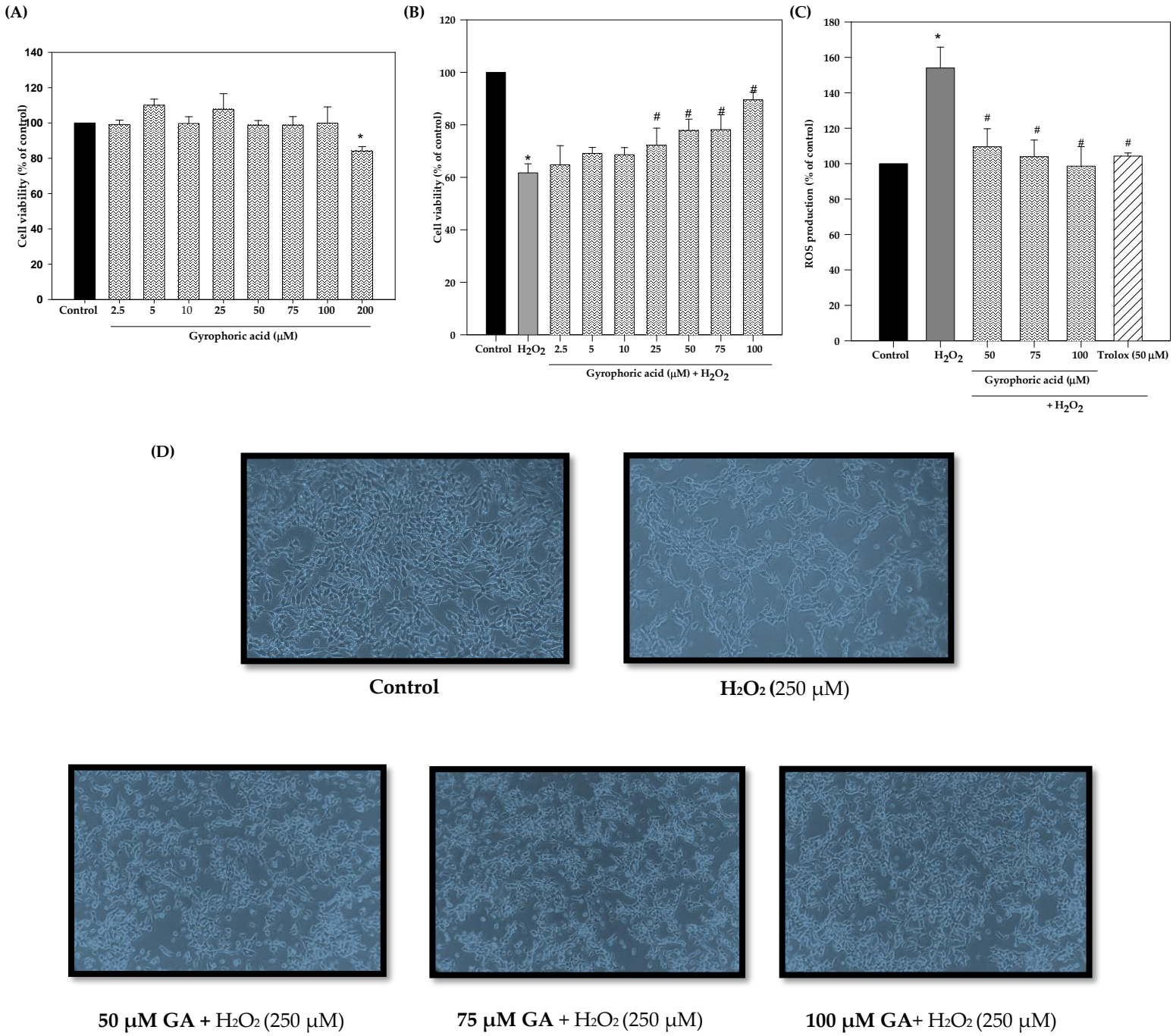
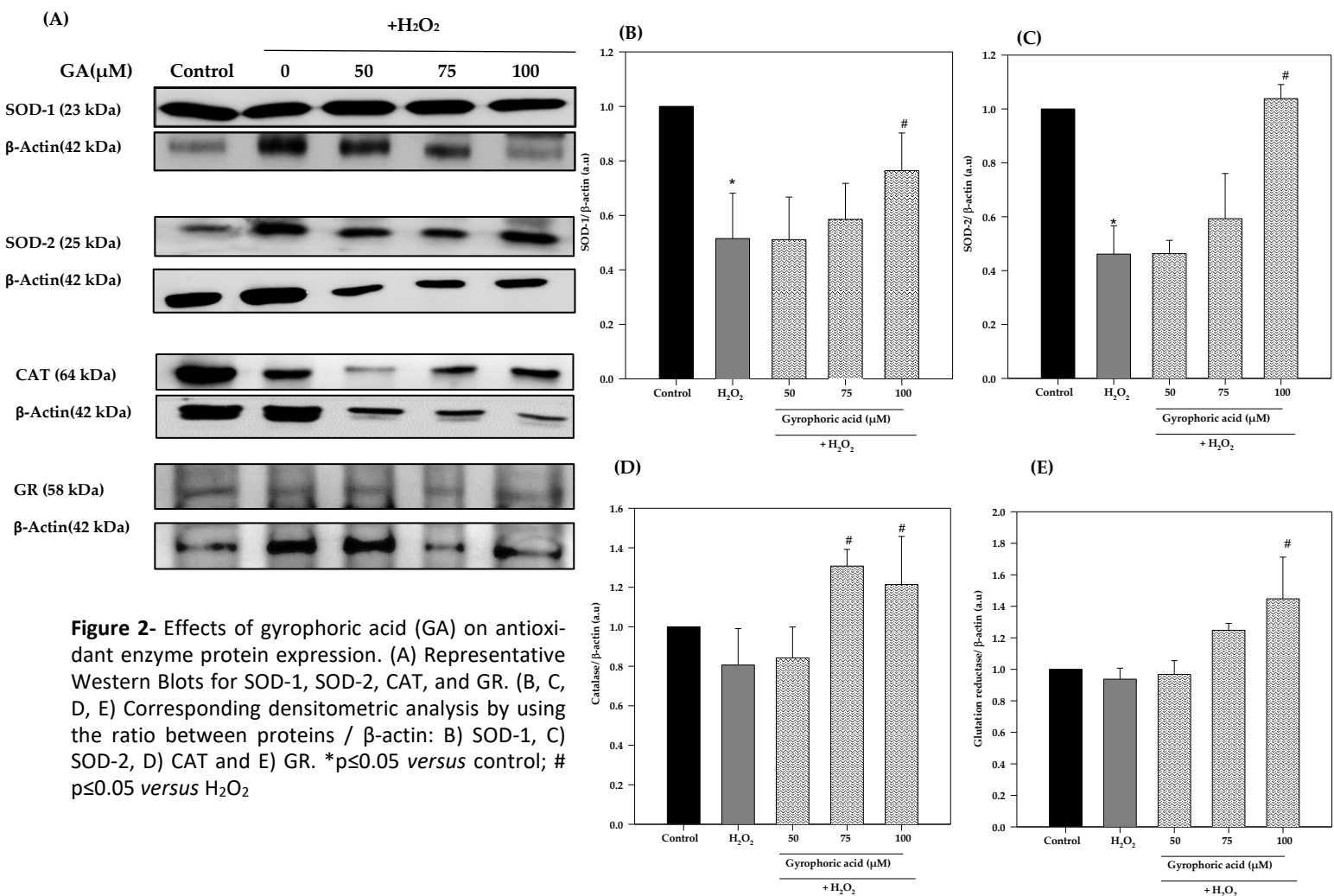


Figure 1. Neuroprotective effects of gyrophoric acid (GA) on SH-SY5Y cells against H_2O_2 -induced cell death. (A,B) Cell viability was measured by MTT assay. (A) Cells were treated with a wide range of concentrations (2.5-200 μM) of GA for 24 h with. (B). Cells were pretreated with GA (2.5-100 μM , 24 h) and then exposed for 1 h to H_2O_2 (250 μM). (C) Intracellular ROS production was measured by DCFH-DA method. Cells were treated with GA (50, 75 and 100 μM) and then exposed for 1h with H_2O_2 (250 μM). Results are expressed as mean \pm SD (triplicates). * $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus H_2O_2 . (D) Representative light microscope images of SH-SY5Y cells after the indicated treatments.

1.2. Gyrophoric acid enhanced antioxidant system enzyme expression

SOD-1, SOD-2, CAT, and GR are vital antioxidant enzymes responsible for maintaining redox homeostasis and protecting cells from oxidative damage. The above experimental results showed that pretreatments with the tridepside GA exerted neuroprotective effects in a concentration-dependent manner with higher efficiency at 100 μM . As reported in **Figure 2**, the expression of the enzymes SOD-1, SOD-2, CAT, and GR in H_2O_2 -treated SH-SY5Y cells pretreated with 50, 75 and 100 μM was measured. The exposure to H_2O_2 decreased the expression of all assayed antioxidant enzymes compared to the control cell group in a 48.5% for SOD-1 expression, in a 53.9% for SOD-2 and in a 20% for CAT. H_2O_2 treatment did not significantly modified GR and CAT expression. When the cells were treated with 100 μM GA, the antioxidant system enzymes expression increased to values similar to those of control cells. Particularly, GA augmented SOD-1 protein expression by 24.9%, SOD-2 (57.7%), CAT (37.1%) and GR (50.4%) compared to H_2O_2 group.



1.3. Gyrophoric acid decreases proapoptotic protein expression and increased antiapoptotic protein expression

After the evaluation of antioxidant response, pro-apoptotic and antiapoptotic proteins levels were measured in SH-SY5Y cells. In those cells treated only with H₂O₂, the expression of Bax was increased (17.1%) while Bcl-2 was diminished (39.6%) compared to untreated cells. Moreover, the expression of caspase-3 was upregulated (46%). Treatments with GA reduced Bax expression and increased levels of Bcl-2 in a concentration-dependent manner, even if only GA 100 μM gave a statistically significant change (46% reduction in Bax levels and 34.2% increase in Bcl-2 expression). Furthermore, all the concentrations showed a significant downregulation on caspase 3 expression levels confirming the cytoprotective effect of GA under oxidative stress situation. (17.4-31.4%). Based on all these results, the most effective GA concentration was 100 μM. (Figure 3).

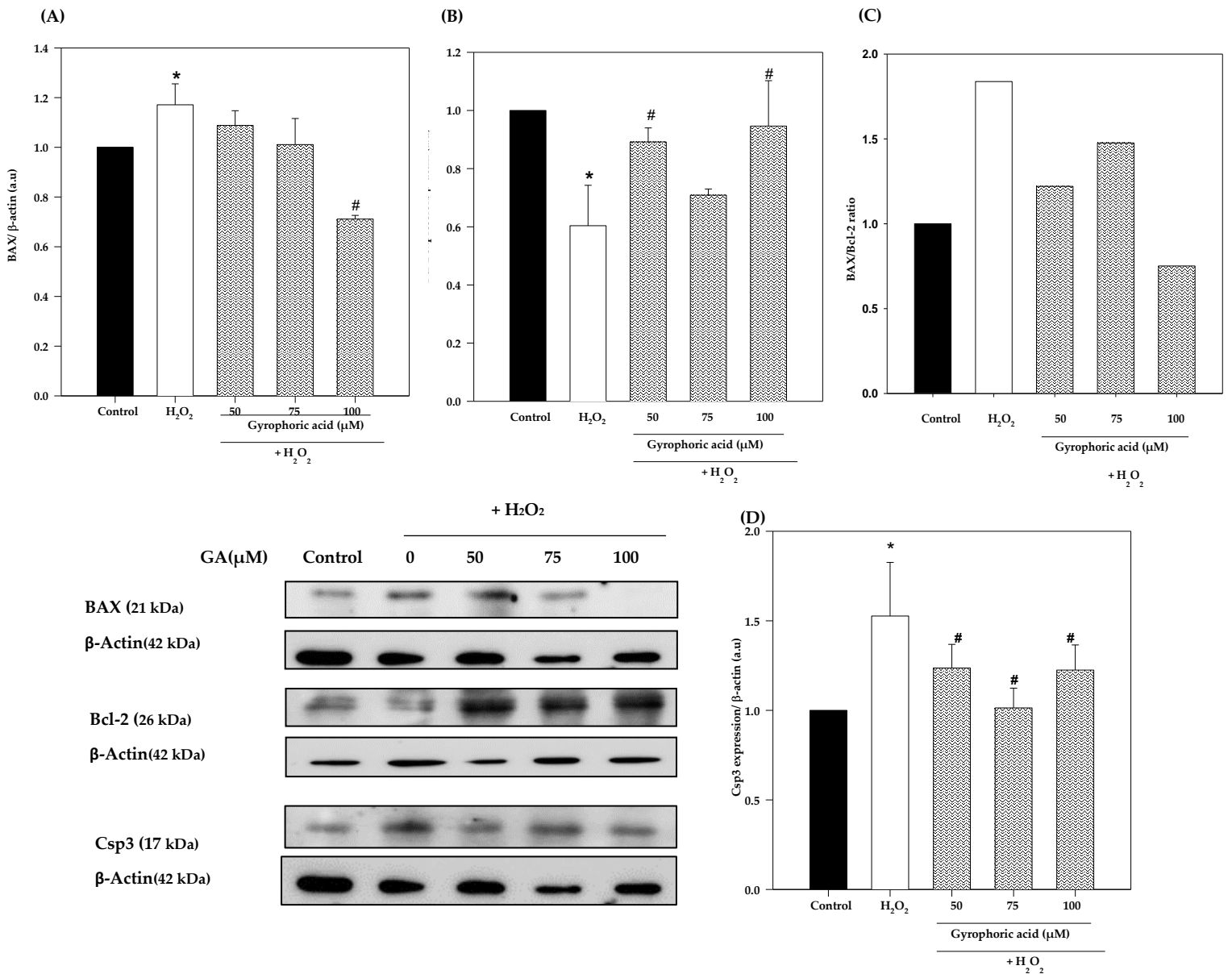


Figure 3. Gyrophoric acid (GA) reduced H₂O₂-induced alterations on the expression of apoptosis-related factors in SH-SY5Y cells . (A) Representative WB of Bax, Bcl-2, Casp3. (B,C,D,E) Densitometric analysis by using the ratio between proteins / β-actin expression: (B) Bax expression, (C) Bcl-2 expression (D) Ratio Bax/Bcl-2, (E) Caspase-3 expression. *p<0.05 versus control; # p<0.05 versus H₂O₂.

1.4 Gyrophoric acid exerted moderate effects on autophagic activation.

First of all, to investigate whether or not H₂O₂ exposure affected *per se* macroautophagy process, LC3-I and LC3-II levels were studied using Western blot technique. LC3-II results from lipidation of cytosolic LC3-I form. LC3-II is commonly used as an autophagy biomarker and is directly related to autophagosome formation. To study autophagic flux, lysosomal (NH₄Cl) and protease (leupeptin) inhibitors are needed to block rapid lysosomal and autophagosome degradation. 2-D-oxyglucose was selected as autophagic inductor for SH-SY5Y cells, as it was proposed in Klionsky's guidelines and it was confirmed in our results. While control cells showed constitutive basal levels of autophagy, LC3-II levels after H₂O₂ treatment were increased with and without lysosomal blockage, indicating autophagy activation (**Figure 4A**).

Moreover, the effects of gyrophoric acid on autophagosome formation were evaluated in the presence and absence of lysosome inhibitors. In absence of NH₄Cl + leupeptin, LC3-II was not significantly different from control cells. Nevertheless, when autophagosome degradation was blocked, LC3-II levels were enhanced on either GA-treated or GA + H₂O₂ - treated cells. In the case of GA alone, differences from control group were not significant. These results showed that pretreatment with gyrophoric acid before H₂O₂ resulted in a significant autophagic flux activation compared to H₂O₂-treated cells. Rapid lysosomal degradation hindered autophagy activation in absence of inhibitors (**Figure 4B**)

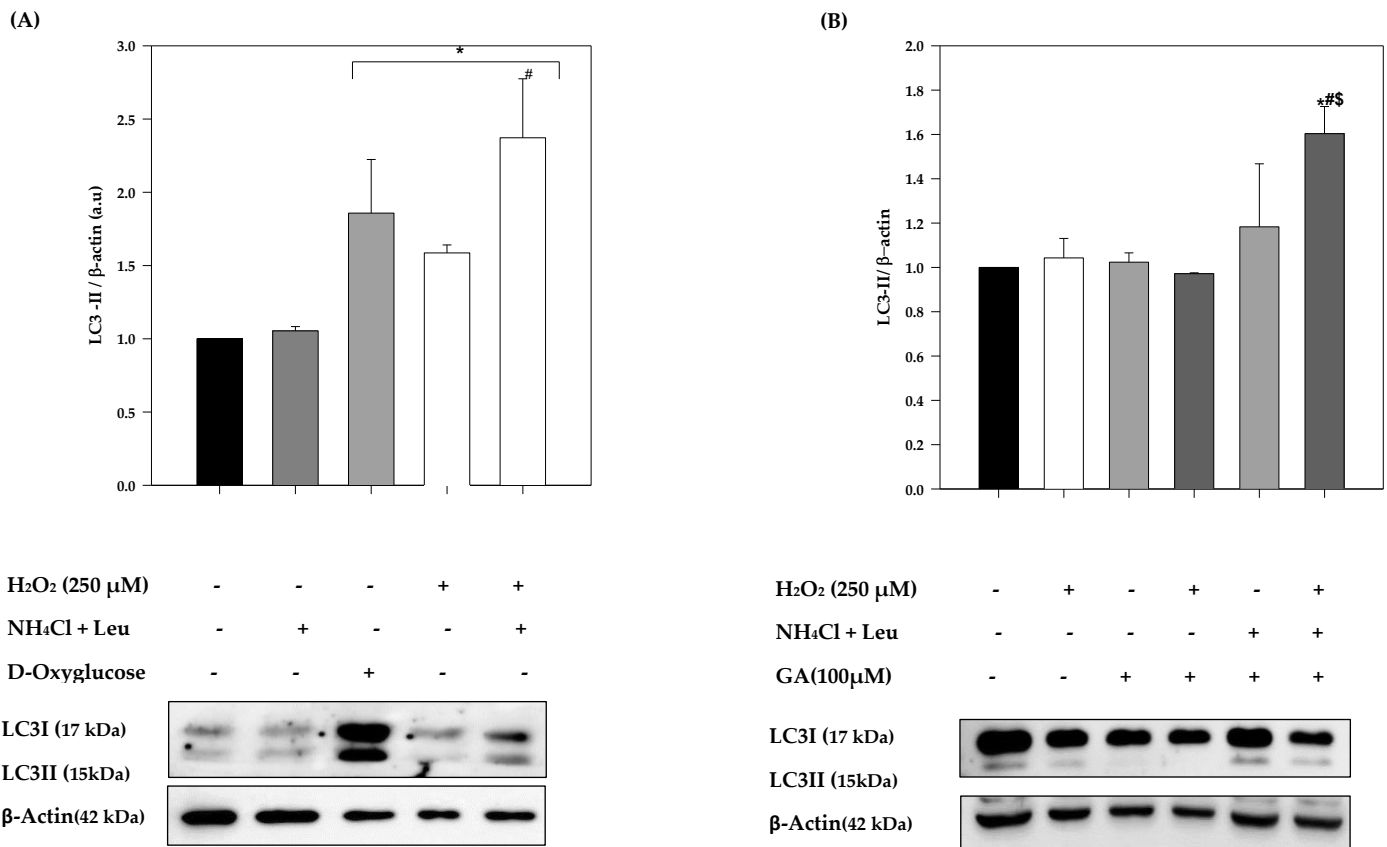


Figure 4. Effect of gyrophoric acid on autophagy. Pretreatments of gyrophoric acid (GA) (100 μM) induced autophagy activation promoting cell survival. The lower panel shows a representative WB of LC3I/ LC3II expression on (A) control and H₂O₂-treated cells in presence or absence of lysosomal inhibitor (NH₄Cl and leupeptine) and autophagy inductor (D-oxyglucose) and (B) 100 μM GA pretreated-cells in presence or absence of lysosomal inhibitor (NH₄Cl and leupeptine) and/or H₂O₂ exposure. The upper panel shows ratio between LC3-II/ β-actin expressed in bar diagrams. *p<0.05control; # p<0.05 versus H₂O₂, \$p<0.05 versus GA+ H₂O₂

1.5 Gyrophoric acid increases NeuN, synaptophysin and GAP-43 expression

This study also aimed to investigate the impact of GA treatments in neurogenesis and synaptogenesis on SH-SY5Y cell line. First, we sought to evaluate the effects of GA on phosphorylation of a microtubule-associated protein, Tau, involved in proliferation, neuronal differentiation/maturation, dendritic/axonal outgrowth, neuronal plasticity and synaptic maturation [25]. Tau can have up to 85 putative Ser/Thr/Tyr phosphorylation sites [26]. In particular, Tau phosphorylation at Ser199/202 and Thr205 along the nascent axon seems to be important during axonogenesis process [27].

The results obtained by using immunofluorescence analysis and confocal microscopy showed that the cell treatments for 24h with GA (25 and 50 μ M) induced a significant increase in Tau phosphorylation in Thr205 residue (pT205) with the 25 μ M concentration exhibiting the highest level of upregulation (**Figure 5A, B**).

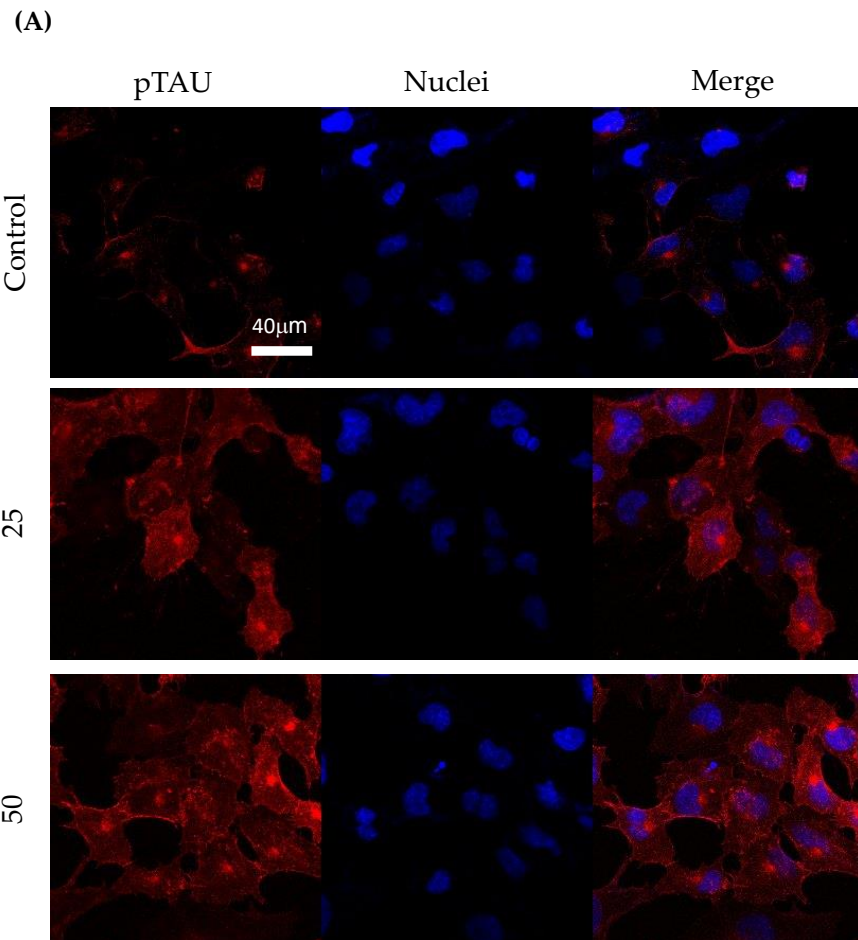
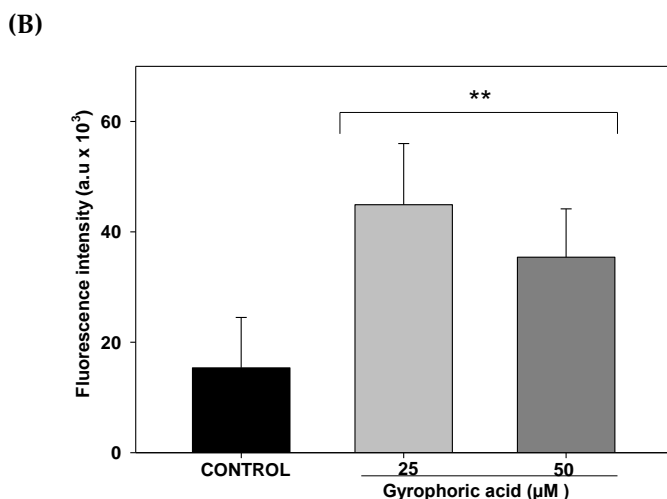


Figure 5. Effects of GA on Tau phosphorylation at Thr205 residue in SH-SY5Y cells. A) Representative images by confocal microscopy of SH-SY5Y cells treated for 24h with 25 μ M and 50 μ M of GA. In the images, the red fluorescence corresponds to the Tau pT205 labeled with mouse primary antibody anti- Tau pT205 and secondary anti-mouse 568-conjugated; Scale bar 40 μ m. Nuclei are stained by Hoechst. The two channels are shown separately and in the merge mode. The reported data are representative of three independent experiments. B) Mean values \pm SE of the red fluorescence signals reported vs untreated cells (Control). Semi-quantitative analysis was performed by ImageJ software as integrated intensity of at least 3 images for each of 3 independent experiments. Statistics: One-way ANOVA Test, ** $p < 0.01$ vs. Control

Then, the expression of other several neuronal markers associated with neurogenesis, synaptogenesis, axonal outgrowth, neuronal development, and regeneration was evaluated. The obtained data were compared with those relating to cells treated with retinoic acid (RA) 10 μ M for 24 h and 5 days.

Results showed that GA treatment induced a significant increase compared to the control group in NeuN (with a two-fold increase for 50 μ M), synaptophysin (with a twelve- and nineteen-fold increase for 25 and 50 μ M, respectively), and GAP43 expression (with an approximately two-fold increase, similar to RA 5 days), as evidenced by the results in **Figure 6A**.

In particular, 24 h of exposure to GA dramatically increases the levels of NeuN and GAP43 more efficiently than RA after 24h of treatment (**Figure 6B**).



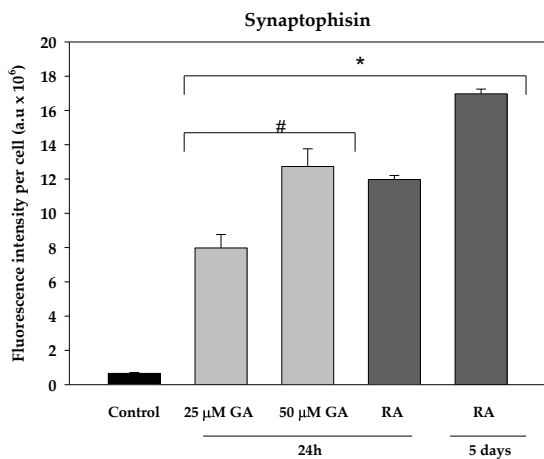
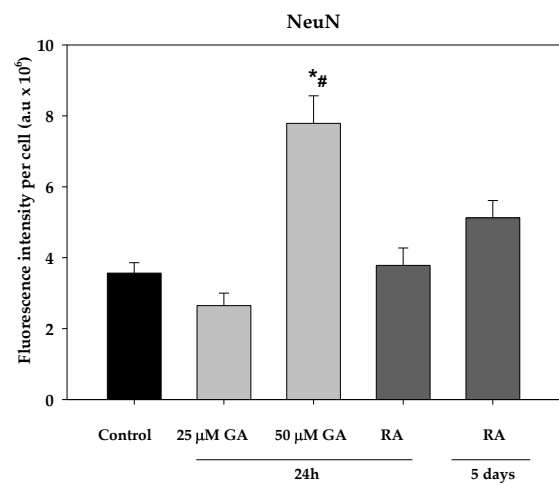
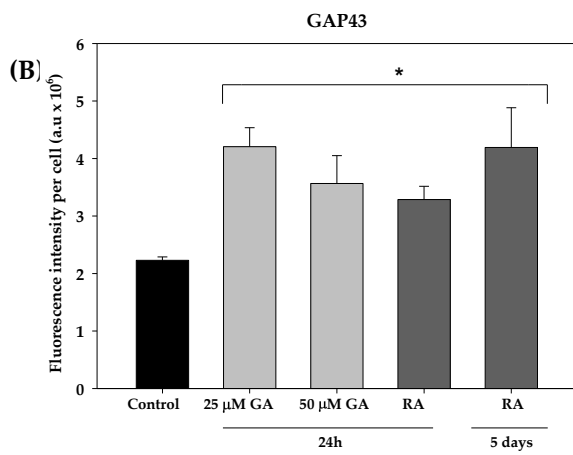
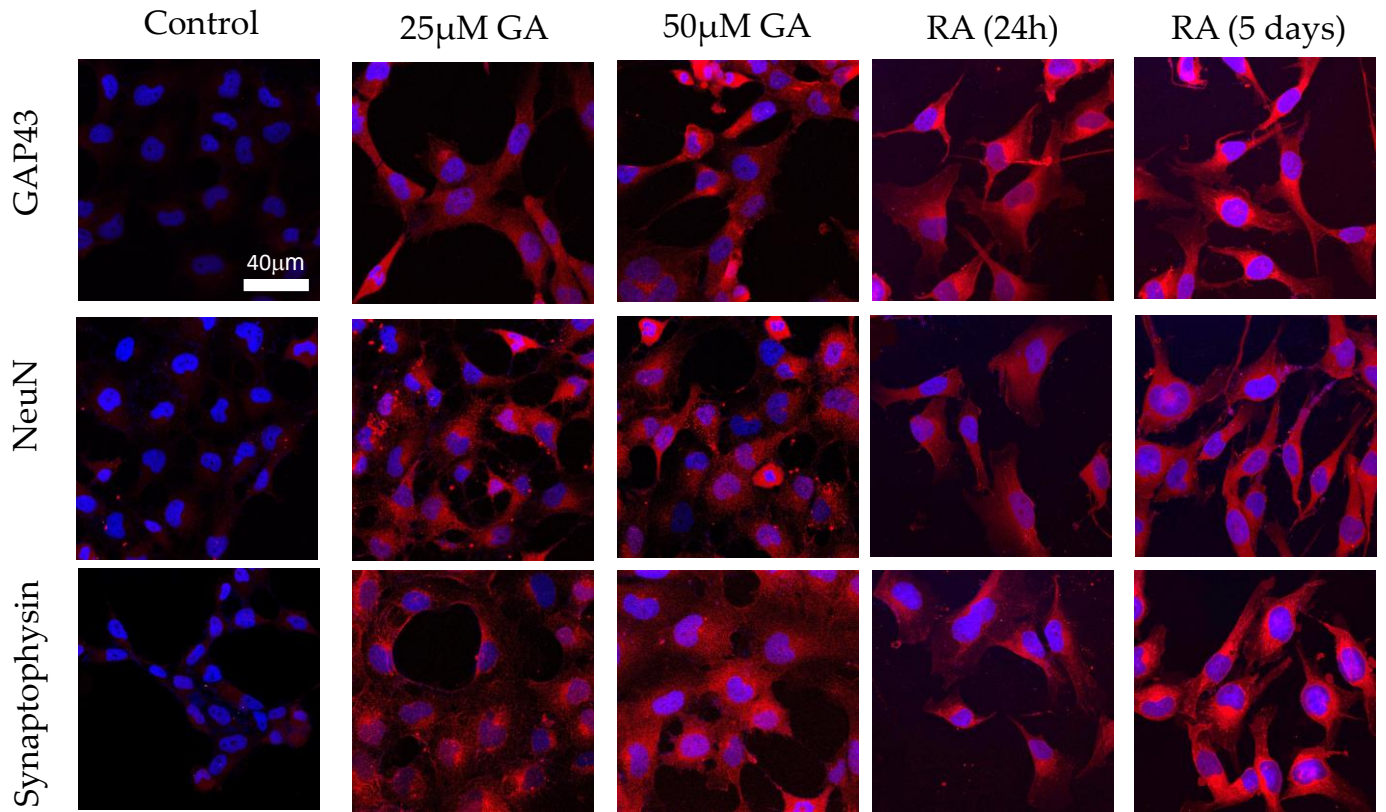


Figure 6. Effects of GA on expression of mature neuron markers compared to retinoic acid (RA) in SH-SY5Y Cells A) Representative images by confocal microscopy of GAP43, NeuN and Synaptophysin in SH-SY5Y cells treated with 25 μ M and 50 μ M of GA for 24h and with RA 10 μ M for 24 h and 5 days. Nuclei are stained by Hoechst. Scale bar 40 μ m. The reported data are representative of three independent experiments. B) Mean values \pm SE of the red fluorescence signals reported vs control cells. Semi-quantitative analysis was performed by ImageJ software as integrated intensity of at least 3 images for each of 3 independent experiments. Statistics: One-way ANOVA Test, * $p < 0.05$ vs. Control; # $p < 0.05$ vs 5 days RA treatment.

1.8 In silico estimation of physicochemical, ADME and toxicity parameters.

Table 1 summarizes the data on physicochemical properties that mainly affect the passage across the BBB via passive diffusion mechanisms. Moreover, ADME properties and the likelihood of toxicities are reported.

The Lipinski's "rule of five" allows estimating the capacity of a compound to pass through the BBB based on physicochemical properties. The rule states that poor permeation is likely if the chemical structure fulfils these criteria ($\log P > 5$; $MW > 500$ Da and $nHA > 10$; $nHD > 5$)[28]. These values for the GA are $\log P$ of 4.97-5.38; MW of 468.41, nHA of 10 and nHD of 5. Therefore, this natural compound does not satisfy any criteria, but it is close to the limit. Considering the close adherence of GA to Lipinski's "rule of five", uptake and permeability studies were then conducted.

In addition, the results from ADMETlab 2.0 software indicate that GA has a low likelihood of being substrate of P-glycoprotein (value of 0.03). P-glycoprotein is a transporter responsible for removing toxic molecules from cells.

Other ADME parameters, specifically focused on absorption, were also studied. Results showed a medium likelihood of good human intestinal absorption according to MDCK permeability (7×10^{-6} cm/s) and Human Intestinal Absorption (0.197), which is important for selecting the appropriate pharmaceutical form and administration route. Clearance values were also found to be moderate (5.955 ml/min/kg).

Before deciding on *in vivo* application of the compound, *in silico* toxicity analysis was performed, revealing low values for human hepatotoxicity (0.136), AMES toxicity (0.024), carcinogenicity (0.025), and rat oral acute toxicity (0.177).

Table 1. Estimation of physicochemical properties, ADME data and toxicity parameters.

Physicochemical properties	Value	Optimal values	ADME parameters	Values*	Comment	Toxicity parameters	Values*
LogPoct (log mol/L)	4.97-5.38	0-3	Human Intestinal Absorption	0.197	$\geq 30\%$	hERG blockers	0.076
LogS (log mol/L)	-2.94	-4-0.5	MDCK permeability (cm/s)	7×10^{-6}	Medium	Human Hepatotoxicity	0.136
Molecular weight (Da)	468.41	100-600	Pgp-inhibitor	0.003	Low	AMES toxicity	0.024
TPSA (Å)	170.82	0-140	Pgp substrate	0.03	Low	Rat Oral Acute Toxicity	0.177
nHA	10	0-12	Lipinski rule	Accepted		Skin sensitization	0.84
nHD	5	0-7	Blood Brain Barrier Penetration	0.0114	Low	Carcinogenicity	0.025
nRot	7	0-11	Clearance (ml/min/kg)	5.955	Moderate	Respiratory Toxicity.	0.518

*Values expressed in a range 0-1, meaning the value 0= inactive or low probability and the value 1= active or high probability

1.9. Uptake studies

After characterizing the molecular properties linked to passive permeation across the BBB, the ability of RBE4 cells to uptake GA was investigated. Then, the assayed concentrations for GA were 50, 75, and 100 μ M and the incubation times were 0.5, 6, 18, and 24 h. Cell viability was previously evaluated using the selected concentrations and showed no changes compared to the control cells (**Figure 7A**).

The results showed that GA uptake displayed a concentration- and time-dependent pattern. At the concentration of 50 μM , the uptake increased linearly over 24 hours. At the concentration of 75 μM , the uptake of the lichen compound increased linearly until reaching a plateau at 24 hours. Finally, for the concentration of 100 μM , the uptake of GA increased steeply until 6 hours, then slowed down until reaching saturation at around 20 hours. It is also noted that the concentration of 100 μM of GA is the only one that is detected after 30 minutes of incubation. Furthermore, for all concentrations and incubation times, the uptake efficiency was less than 5%. It was observed that at the concentrations of 75 and 100 μM , the uptake efficiency was slightly higher after 18 hours of incubation than after 24 hours (Figure 7B and 7C).

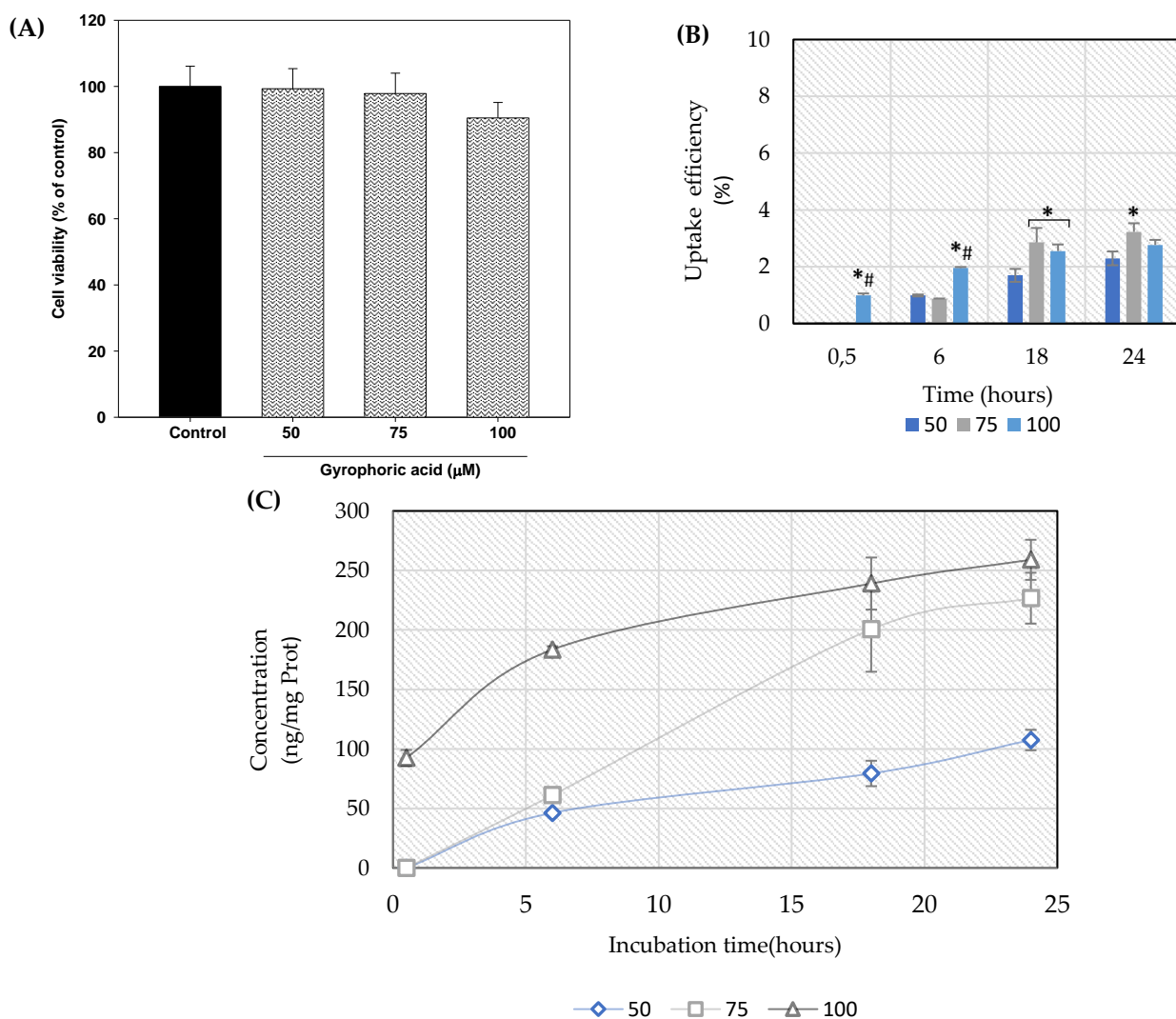


Figure 7. Gyrophoric acid uptake in RBE4 cells (A) Cell viability on RBE4 cells was assayed by MTT. Cells were treated for 24 h with GA 50 μM , 75 μM and 100 μM . Results are expressed as mean \pm SD (triplicate experiments). * $p \leq 0.05$ versus control. (B) Uptake efficiency at different times (μM uptake/ μM at zero time) * $p \leq 0.05$ versus 50 μM . # $p \leq 0.05$ versus 75 μM . (C) Intracellular levels of GA 50 μM , 75 μM and 100 μM after incubation times of 0.5, 6, 18 and 24h.

1.10. Permeability studies

The hCMEC/D3 cell model was used for BBB permeability studies. Initially, the effect of GA on cell viability was investigated. As shown in Figure 8, none of the assayed concentrations (50, 75 and 100 μM) after 24 h of incubation affected the viability of hCMEC/D3 cells. Then, based on the uptake study and the viability results, 100 μM

concentration of GA at 24 h was selected to determine the apparent permeability coefficient (P_{app}) values. The physical integrity of the hCMEC/D3 cell monolayer was confirmed by lucifer yellow permeability (around 2%). Propranolol was used as a positive control of passive diffusion (high permeability, transcellular marker) and atenolol as a negative control (low permeability, paracellular marker).

Bidirectional transport was evaluated from the apical to the basal (A-B) direction, and from the basal to the apical (B-A). As shown in **Table 2**, the P_{app} value for GA was 6.37×10^{-6} cm/s. On the other hand, the P_{app} value of propranolol was 10.13×10^{-6} cm/s. Atenolol was not detected in either the basal (A-B) or apical (B-A) compartments. The efflux ratio was calculated and found to be less than 1, indicating no evidence of transport. Mass balance results indicate poor sequestration in cell monolayer or in the plastic, finding percentages between the established limits (83.43%).

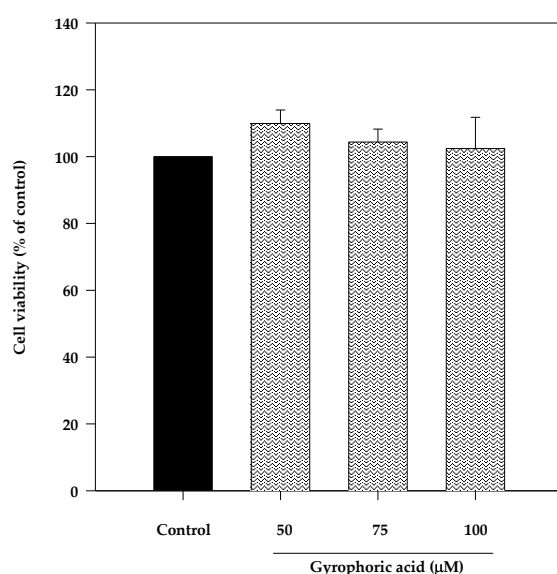


Figure 8. Effect of gyrophoric acid on hCMEC/D3 cell viability assayed by MTT. hCMEC/D3 cells were treated with GA 50 μ M, 75 μ M and 100 μ M, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD (triplicate experiments). * $p \leq 0.05$ versus control.

Table 2. Transport of gyrophoric acid across *in vitro* BBB model.

Compound	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)		Efflux Ratio	Mass balance (%)	
	A-B	B-A		A-B	B-A
Gyrophoric acid	6.37 ± 0.02	4.54 ± 0.22	0.712	83.43	73.11
Propranolol	10.13 ± 1.44	4.17 ± 0.72	0.41	128.4	71.37

hCMEC/D3 cells were treated with 100 μ M of GA for 24 h.

Data are mean \pm SD, n=3 inserts for compounds.

4. Discussion

It is widely accepted that natural products have evolved to perform, often in synergy, a wide array of functions that are beneficial to the producing organism. In fact, they are considered to be “privileged structures” [29] which, upon subtle changes to improve their pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, can lead to the development of new medicines [30].

The diseases that caused higher mortality and disability in the past are not correlated with those that hold significant importance in the present. As a result of the population pyramid inversion, the incidence of age-related conditions, such as neurodegenerative and cardiovascular diseases, is increasing rapidly [31]. Consequently, there is a focus on searching natural compounds for treating these pathologies.

Neurodegenerative disease is a generic term applied to a variety of conditions that arise from a chronic breakdown and a deterioration of the nerve cells, in particular those of the central nervous system [32]. The gradual loss of homeostatic mechanisms

associated with ageing is hypothetically due to an accumulation of molecular oxidative damage [33]. Indeed, the “Free Radical Theory of Ageing” is based on oxygen toxicity [34].

In recent years, some lichen depsides have been reported to possess neuroprotective activities in both *in vitro* and *in vivo* models such as PD (MPTP or rotenone-induced) or ALS (L-BMAA-induced) disease models. Evernic acid showed to reduce oxidative stress and mitochondrial dysfunction and has demonstrated anti-inflammatory activities, modulating several signal transduction pathways such as NF κ B and Nrf2/ARE [35-37]. Isolecanoric acid mitigated mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death [38]. Moreover, other lichen substances like the dibenzofuran usnic acid exerted antioxidant and antiapoptotic effects in ischemia/reperfusion induced model in Wistar rats [35].

In previous studies published by our team, *Dactylina arctica* (Hook.f.) Nyl. extracts containing GA as the main compound, exhibited neuroprotective effects by upregulating antioxidant enzymatic activities and mitigating mitochondrial dysfunction. This extract also significantly reduced ROS overproduction [39]. Moreover, it has been reported that GA had radical scavenging properties with IC₅₀ DPPH values from 25 to 105 μ g/ml, depending on the study, and superoxide anion radical scavenging activity of IC₅₀ 196.62 μ g/ml [40,41]. Furthermore, GA has shown cytotoxic properties in diverse cell models with IC₅₀ values from 289.2 μ M on A549 lung carcinoma to 1028.7 μ M on HCT116 colon carcinoma cells [42]. According to Mohammadi et al., the wide range of biological activity exhibited by lichen compounds may be attributed to their low affinity towards multiple enzymes, rather than high affinity towards a limited number. This observation aligns with the pleiotropic effect concept, which suggests that lichen compounds act as protective agents by targeting multiple conserved enzymes in eukaryotes [43].

Considering these results, we hypothesized that the compound GA may be the primary contributor to the observed neuroprotective response.

The role of oxidative stress in neurodegeneration and ischemic stroke has been extensively discussed, either as an initiator or executor of the damage [44]. It is well established that the brain consumes a large amount of oxygen and is highly rich in lipid content, becoming prone to oxidative stress. The overproduction of ROS is implicated in functional and structural dysfunction of neurons that lead to cell death [45]. Essential biomolecules such as lipids, proteins and DNA are vulnerable to free radical attacks, losing their stability and activity and therefore, their function. In the oxidative stress model of the current work, H₂O₂ exposure (250 μ M, 1h) reduced SH-SY5Y cell viability, increased intracellular ROS production and caused cell morphological changes in density and apoptotic features. Furthermore, while low concentrations of H₂O₂ may enhance antioxidant activity as a compensatory response [46], higher concentrations lead to modifications in both the structure and functionality of enzymes, ultimately resulting in reduced their expression levels

GA-pretreatments reverted these effects in a concentration dependent manner, showing a cytoprotective action. Phenolic structure of this depside with four hydroxyl groups is strongly related with its ability to scavenge free radicals. In fact, the number of hydroxyl groups has more impact in its antioxidant properties than backbone structure [47].

Moreover, we have demonstrated that several mechanisms are involved in the antioxidant effect of GA. In addition to its radical scavenger nature, pretreatments with GA enhanced antioxidant enzyme system expression such as SOD-1, SOD-2, CAT, and GR. These enzymes are part of the endogenous antioxidant system, either directly eliminating free radicals such as O₂^{•-}, acting on oxygen reactive intermediaries such as H₂O₂ or increasing levels of non-enzymatic antioxidants such as glutathione (GSH). Increasing their levels and activity strengthens the antioxidant response against H₂O₂. These results support previous works with *Dactylina arctica*, in which SOD and CAT activity and levels of GSH were enhanced with lichen extract pretreatments [39]. It is noteworthy that, unlike the GA treatment, the effects of the extract were observed within a low concentration range,

suggesting synergia among different compounds. Furthermore, increasing evidence indicates that crude lichen extracts exhibit greater activities both *in vitro* and *in vivo* in comparison to pure compounds [48].

Mitochondria play a pivotal role in oxidative stress-related conditions, not only as major producers of ROS through the mitochondrial electron chain, but also as initiators of apoptotic responses via activation of the intrinsic apoptotic pathway. The overexpression of ROS and disruption of calcium homeostasis led to the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), which releases proapoptotic factors [49]. GA pretreatments showed to reduce H₂O₂-induced apoptotic activation by downregulating caspase 3 which is the principal apoptotic effector. Also, GA pretreatments decreased Bax/Bcl-2 ratio, which is related with reduced membrane permeabilization due to Bcl-2 prevention from homo-oligomerization of pro-apoptotic Bax [50].

In addition, after the discovery of autophagic process, the modulation of this cellular mechanism has emerged as a pivotal therapeutic strategy. Through autophagy, the cell eliminates and recycles cytosolic macromolecules and damage organelles. Mitochondria damaged by ROS and oxidized molecules are removed to maintain homeostasis[51]. This is the first time the effect of lichen gyrophoric acid on autophagic process has been studied. H₂O₂ induced autophagosome formation as evidenced in upregulation of LC3-II expression with and without lysosome inhibitor. Several studies have shown the enhancement of autophagosome formation after H₂O₂ treatment [52]. Despite autophagy upregulation, the persistence of cellular stress led to apoptosis pathway activation, as indicated by apoptotic markers. In contrast, the activation of autophagy following GA treatment indicated that damage caused by H₂O₂ could be partially mitigated through autophagic activation, opposite to apoptosis reduction. As previously mentioned, the Bcl-2 protein not only inhibits apoptosis but also plays a crucial role in autophagy inhibition through the formation of the Beclin/Bcl-2 complex [53]. The reason why high levels of Bcl-2 after GA treatment did not correspond to autophagy inhibition could likely be attributed to the cellular localization of these proteins. Bcl-2 localized in the endoplasmic reticulum is responsible for the formation of the Beclin/Bcl-2 complex, whereas mitochondrial Bcl-2 is involved in the inhibition of apoptosis[54,55].

This upregulation was also observed with GA treatment alone. Additional studies should be conducted using various neurodegenerative models, as the autophagic process plays a crucial role in clearing protein aggregates, such as mHtt, insoluble tau, and A β 42.[53,56] The observed effect of autophagic activation could potentially be effective in facilitating the clearance of these aggregates.

Moreover, it is well-known that promoting the regeneration of neural axons, dendrites, and synapses within the adult nervous system would be a highly desirable therapeutic approach to promote functional recovery after nervous system injury. Prior to cell death, neurons undergo structural changes such as neurite retraction or synaptic loss, as well as functional changes through the activation of stress signaling pathways [45]. All neurodegenerative diseases and post-ischemic injuries are associated with synaptic loss and axonal degeneration [57]. The diagnosis and evaluation of therapeutic interventions for these diseases are currently hindered by the limitations of brain biopsy techniques. However, advances in identifying appropriate biomarkers are providing researchers with new insights into disease prevention, early onset, progression, and treatment [58].

In the current study, we show for the first time that the GA-treatment induces SH-SY5Y cells differentiation similar to that induced by RA treatment. Following differentiation, SH-SY5Y cells express a number of mature neuronal markers, including Synaptophysin, involved on the regulation of short and long-term synaptic plasticity and synapse formation, growth-associated protein 43 (GAP-43) that promotes presynaptic neuronal and axonal growth as well as neurogenesis, and neuronal nuclear antigen (NeuN), essential in mRNA alternative splicing and neuronal development [49]. In our cell model, 24h of GA treatment significantly increases the expression of these three neuronal markers.

Notably, higher expression values of NeuN and GAP43 compared to 24h treatment with RA were shown, suggesting the efficacy of GA in the SH-SY5Y cells differentiation into a more mature neuron-like phenotype.

Moreover, GA modulate the phosphorylation of Tau on Thr 205 residue and this modification results necessary for tau to exert one of its well-established physiological functions i.e. its involvement in the assembly and stabilization of microtubules during axonal outgrowth [59]. Normally, phosphorylation of tau is elevated during some physiologic processes such as development, hibernation, and hypothermia and decreases with age. Moreover, high phosphorylation levels of Tau are typically associated with a toxic phenotype and widely considered pathological hallmarks in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. However, several recent works suggest a neuroprotective role of Thr205 phosphorylation (pT205) against amyloid- β -induced excitotoxicity [60]. Interestingly, the increases in pT205 could be initially protective due to the toxic environment [61], but continued overexpression could cause axonal dysfunction [62]. As observed in Figure 1 by MTT assay and in Figure 3 by evaluation of some key molecular factors involved in apoptosis, the cells exposed to GA did not show any significant reduction in viability or increase in apoptotic pathway. Accordingly, the extent of GA-induced Tau phosphorylation falls into a physiological level of non-toxic modification. Therefore, consistent with the observed effects of GA on pT205 and on GAP43 expression, this *in vitro* study suggests for the first time that GA has the potential to induce neuronal differentiation and could also represent a potential treatment for neuronal injury opening a new line of research in which GA might be used as neurorestorative compound.

In fact, research on the neuromodulatory effects of lichen substances is limited. Only atranorin, physodic and perlatolic acid have shown neurogenic and neurotrophic effects in both *in vitro* (mouse neuroblastoma Neuro2A cells) and *ex vivo* models (rat hippocampal primary cultures, through gene expression of BDNF and NGF [63]. Nevertheless, several natural products have been studied in neurodegeneration and ischemic stroke focusing on their neurorestorative properties. Interestingly, rosmarinic and ursolic acid have been shown to alleviate the deficit in neurogenesis and synaptogenesis induced by $A\beta_{1-42}$ peptide in BALB/c mice as shown by NeuN, synaptophysin or PSD-95 expression [64]. Furthermore, flavonoid baicalin enhanced neurite outgrowth via BDNF/TrkB/PI3K/Akt and MAPK/ERK1/ERK2 in OGDR-induced injury in neuron-astrocytes cocultures [65].

Despite the constant discovery of molecules potentially active against neuronal injury and neurodegenerative diseases, translation of these effects into *in vivo* models has proven to be a significant challenge. One of the major obstacles is the limited bioavailability of these compounds in the brain due to reduced permeability across the blood-brain barrier. *In silico* methods are an essential tool for ADMET parameters. However, compounds that meet or break preestablished rules parameters must be studied on *in vitro* model to not underestimate potential drugs [66].

Transport studies through the BBB have been performed using different cell models from different species such as rats, pigs, and humans [67-69]. Previous studies have shown the ability of natural products to pass into the CNS by transcellular passive transport. Hence, the benzoquinone, embelin, found in *Embelia ribes* Burm showed P_{app} values of $35.46 \pm 20.33 (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$ on a primary porcine brain endothelial cell (PBEC) monolayer model [70]. Moreover, triterpenes such as asiaticoside, madecassoside and asiatic acid from *Centella asiatica* (L.) Urban exhibited even higher permeability values in the same cellular model with P_{app} values of 70.61 ± 6.60 , 53.31 ± 12.55 and $50.94 \pm 10.91 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ respectively [71]. On the other hand, the permeability of some lichen extracts and their secondary metabolites were studied using the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay for Blood Brain Barrier (PAMPA-BBB). This is the case of the compound evernic acid which showed high permeability value with a value of $8.6 \pm 0.4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$

at 4h and the compound usnic acid with a value of $92.8 \pm 6.3 \times 10^{-6}$ cm/s at 1h of incubation [72,73].

hCMEC/D3 cell line has been used in more than 100 studies focusing in cerebral endothelial biology and pharmacology due to the expression of tight junctions, efflux transporters (P-gp, MRP, BCRP) and influx transporters such as solute carrier (SLC) [69]. One of the novelties of the current work is that the BBB permeability of a secondary metabolite from lichens using this cellular model was determined for the first time. GA showed a value of P_{app} of $6.37 \pm 0.02 \times 10^{-6}$ cm/s and no efflux transport (<2). These results also correlate with *in silico* data about its low probability of being a P-glycoprotein substrate. Prior to this, uptake studies were conducted on RBE4 cells define the optimum time and concentration (100 μ M, 24h) for reaching the brain. Contrary to what it was observed in permeability studies, cellular accumulation of GA on RBE4 cells showed weak efficiency with values less than 5%.

Considering these results, GA can penetrate into CNS with moderate values of absorption. The optimum neuroprotective effects were observed with high concentrations of GA. After 24h incubation, the detected amount in basal compartment was $18.26 \mu\text{M} \pm 0.05$, with a 60,86% of efficiency. The use of nanoparticles or liposomes is postulated as an alternative to increase the permeability of compounds and therefore to reach effective concentrations for treat CNS diseases[74].

Most of BBB studies for natural products have been focused on considering passive diffusion as the main responsible of the transport. Some rules have been established to define the ability of a compound to diffuse across this barrier such as the Lipinski's rule of five (a high MW, the presence of hydrogen bonds and low log P indicate poor permeability) or Hitchcock rule (high value of 90 \AA^2 of TPSA indicates poor permeability) [28,75]. Following these assumptions, the compound GA fulfills Lipinski rule, but close to the limits. Preliminary studies using PAMPA-BBB method are only able to measure passive diffusion transport, while the use of endothelial cell models allows studying other forms of passage by expressing different types of transporters. For example, in the case of natural phenolic compounds, it is suggested that although passive transport predominate to pass the BBB, active transporters are also involved[76]. For this reason, one of the main issues in research is choosing the optimum cell model to address the clinical question [77]. In the current work, the differences between RBE4 and hCMEC/D3 cells efficiencies might be explained due to the interspecies differences of membrane transporters expression, suggesting a possible implication of active transport [78]. Further studies are needed in newly models of pluripotent stem (iPS) cells or embryonic stem (ES) to confirm these results [79].

Finally, having established the neuroprotective properties of GA and its permeability, the next step was to assess its toxicity and oral absorption through preliminary *in silico* data. Regarding its toxicity, GA exhibited good profile with low probabilities for carcinogenicity, hepatotoxicity, AMES toxicity and Rat Oral Acute toxicity. However, skin sensitization represents a critical concern for human use. In the same way, Jesus et al. improved resveratrol (RSV) skin toxicity profile by synthesizing RVS-GS, a sulfate glycosylated derivative of RSV, as evidenced by ADMETLab 2.0 evaluation and further confirmed by the human leukemia monocytic (THP-1) cell maturation assay [80]. The secondary metabolites derived from lichens have not been analyzed using the ADMET 2.0 software but various software, including OSIRIS Property Explorer, have been employed. They revealed a safe profile for usnic acid, variolaric acid and GA, excluding salazinic acid, norstictic acid and stictic acid for its high probability for reproductive toxicity[81].

This information will aid in the formulation of a pharmaceutical preparation and in the selection of an appropriate *in vivo* model for future studies. Currently, pharmacokinetics and pharmacodynamics studies have not been validated, because any *in vivo* model has been carried out to investigate GA ADMET parameters.

5. Conclusions

Natural products have been used in therapeutics, either as pure compounds or as a scaffold for the design of novel drugs. Historically, plants, fungi, and marine organisms have been the primary sources of natural compounds, with lichen species being largely overlooked. However, in recent years, there has been an exponential increase in bioactive and pharmacological studies involving lichen extracts and isolated compounds. One such compound is the tridepside gyrophoric acid, which has shown to possess photoprotective and antioxidant properties in various cell models. However, to date, there have been no studies examining its potential neuroprotective effects.

The current study proposes that GA is a potential neuroprotective candidate for treating brain injury and neurodegenerative conditions considering its ability to reduce oxidative damage in SH-SY5Y cells, acting as an antioxidant and promoting differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells into a more mature neuron-like phenotype. Induction of endogenous antioxidant response and autophagy activation versus apoptosis inhibition are presented as mechanisms involved in neuroprotection.

Furthermore, GA has demonstrated the ability to permeate the blood-brain barrier (BBB). As a proposal improvement the design of a pharmaceutical formulation is necessary to ensure effective dosing in the brain parenchyma. Finally, *in silico* studies has revealed a safe toxicity profile and a moderate oral absorption, two crucial factors for scaling up the study to the next level.

Despite these promising results, there is still a need for further investigation to comprehensively elucidate the underlying mechanisms involved. Further *in vivo* studies are essential to validate these findings.

Author Contributions: Conceptualization, I.U.-V., M.L, E.G.-B.,M.B and M.P.G.-S.; Methodology: I.U.-V and M.L; Investigation, I.U.-V and M.L; Formal analysis, I.U.-V. M.L and E.G.-B.; Data Curation, I.U.-V.,M.L and E.G.-B.; Writing-Original Draft Preparation, I.U.-V.,M.L and E.G.-B.; Validation, E.G.-B and M.L.; Writing-Review & Editing, M.B, P.K.D. and M.P.G.-S., Supervision, E.G.-B. M.B and M.P.G.-S., Project administration. M-B and P.K.D. and M.P.G.-S.

Funding: This work was financed by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (PID2019-105312GB-100) and the Santander-University Complutense of Madrid (PR87/19-22637). I.U.V was supported by a grant CT42/18-CT43/18 from Complutense University of Madrid for predoctoral research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wang, Y.; Ji, X.; Leak, R.K.; Chen, F.; Cao, G. Stem cell therapies in age-related neurodegenerative diseases and stroke. *Ageing Res Rev* **2017**, *34*, 39-50, doi:10.1016/j.arr.2016.11.002.
2. Luo, J.; Mills, K.; le Cessie, S.; Noordam, R.; van Heemst, D. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Res Rev* **2020**, *57*, 100982, doi:10.1016/j.arr.2019.100982.
3. Mattson, M.P.; Arumugam, T.V. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab* **2018**, *27*, 1176-1199, doi:10.1016/j.cmet.2018.05.011.
4. Jurcău, M.C.; Andronie-Cioara, F.L.; Jurcău, A.; Marcu, F.; Țiț, D.M.; Pașcalău, N.; Nistor-Cseppentő, D.C. The Link between Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Neuroinflammation in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease: Therapeutic Implications and Future Perspectives. *Antioxidants* **2022**, *11*, doi:10.3390/antiox11112167.
5. Ren, J.X.; Li, C.; Yan, X.L.; Qu, Y.; Yang, Y.; Guo, Z.N. Crosstalk between Oxidative Stress and Ferroptosis/Oxytosis in Ischemic Stroke: Possible Targets and Molecular Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* **2021**, *2021*, 6643382, doi:10.1155/2021/6643382.
6. Ferrucci, M.; Biagioni, F.; Ryskalin, L.; Limanaqi, F.; Gambardella, S.; Frati, A.; Fornai, F. Ambiguous Effects of Autophagy Activation Following Hypoperfusion/Ischemia. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19092756.

7. Corti, O.; Blomgren, K.; Poletti, A.; Beart, P.M. Autophagy in neurodegeneration: New insights underpinning therapy for neurological diseases. *Journal of Neurochemistry* **2020**, *154*, 354-371, doi:<https://doi.org/10.1111/jnc.15002>.
8. Baazaoui, N.; Iqbal, K. Alzheimer's Disease: Challenges and a Therapeutic Opportunity to Treat It with a Neurotrophic Compound. *Biomolecules* **2022**, *12*, doi:10.3390/biom12101409.
9. Mayordomo-Cava, J.; Iborra-Lázaro, G.; Djebari, S.; Temprano-Carazo, S.; Sánchez-Rodríguez, I.; Jeremic, D.; Gruart, A.; Delgado-García, J.M.; Jiménez-Díaz, L.; Navarro-López, J.D. Impairments of Synaptic Plasticity Induction Threshold and Network Oscillatory Activity in the Hippocampus Underlie Memory Deficits in a Non-Transgenic Mouse Model of Amyloidosis. *Biology (Basel)* **2020**, *9*, doi:10.3390/biology9070175.
10. Ermine, C.; Wright, J.; Frausin, S.; Kauhausen, J.; Parish, C.; Stanic, D.; Thompson, L. Modelling the dopamine and noradrenergic cell loss that occurs in Parkinson's disease and the impact on hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* **2018**, *28*, doi:10.1002/hipo.22835.
11. Li, W.; Ye, A.; Ao, L.; Zhou, L.; Yan, Y.; Hu, Y.; Fang, W.; Li, Y. Protective Mechanism and Treatment of Neurogenesis in Cerebral Ischemia. *Neurochemical Research* **2020**, *45*, 2258-2277, doi:10.1007/s11064-020-03092-1.
12. Shohayeb, B.; Diab, M.; Ahmed, M.; Ng, D.C.H. Factors that influence adult neurogenesis as potential therapy. *Translational Neurodegeneration* **2018**, *7*, 4, doi:10.1186/s40035-018-0109-9.
13. Sánchez-Martínez, J.D.; Garcia, A.R.; Alvarez-Rivera, G.; Valdés, A.; Brito, M.A.; Cifuentes, A. In Vitro Study of the Blood–Brain Barrier Transport of Natural Compounds Recovered from Agrifood By-Products and Microalgae. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24010533.
14. Gonçalves, S.; Mansinhos, I.; Romano, A. Neuroprotective Compounds from Plant Sources and their Modes of Action: An Update. In *Plant-derived Bioactives: Chemistry and Mode of Action*, Swamy, M.K., Ed.; Springer Singapore: Singapore, 2020; pp. 417-440.
15. Grimm, M.; Grube, M.; Schiefelbein, U.; Zühlke, D.; Bernhardt, J.; Riedel, K. The Lichens' Microbiota, Still a Mystery? *Front Microbiol* **2021**, *12*, 623839, doi:10.3389/fmicb.2021.623839.
16. Ureña-Vacas, I.; González-Burgos, E.; Divakar, P.K.; Gómez-Serranillos, M.P. Lichen Depsides and Tridepsides: Progress in Pharmacological Approaches. *J Fungi (Basel)* **2023**, *9*, doi:10.3390/jof9010116.
17. Ma, Z.; Lu, Y.; Yang, F.; Li, S.; He, X.; Gao, Y.; Zhang, G.; Ren, E.; Wang, Y.; Kang, X. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect on spinal cord injury by suppressing oxidative stress and inflammation via modulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF-κB pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2020**, *397*, 115014, doi:<https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115014>.
18. Taram, F.; Ignowski, E.; Duval, N.; Linseman, D.A. Neuroprotection Comparison of Rosmarinic Acid and Carnosic Acid in Primary Cultures of Cerebellar Granule Neurons. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23112956.
19. Manojlović, N.; Ranković, B.; Kosanić, M.; Vasiljević, P.; Stanojković, T. Chemical composition of three Parmelia lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 1166-1172, doi:10.1016/j.phymed.2012.07.012.
20. Cheung, Y.T.; Lau, W.K.; Yu, M.S.; Lai, C.S.; Yeung, S.C.; So, K.F.; Chang, R.C. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* **2009**, *30*, 127-135, doi:10.1016/j.neuro.2008.11.001.
21. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **1983**, *65*, 55-63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
22. Xiong, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Fu, L.; Yang, Z.; Hsieh, C.; Yin, M.; Zeng, X.; Wu, C.; Lu, A.; et al. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res* **2021**, *49*, W5-w14, doi:10.1093/nar/gkab255.
23. de Paz, G.A.; Raggio, J.; Gómez-Serranillos, M.P.; Palomino, O.M.; González-Burgos, E.; Carretero, M.E.; Crespo, A. HPLC isolation of antioxidant constituents from Xanthoparmelia spp. *J Pharm Biomed Anal* **2010**, *53*, 165-171, doi:10.1016/j.jpba.2010.04.013.
24. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **1985**, *150*, 76-85, doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
25. Wang, Y.; Mandelkow, E. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* **2016**, *17*, 5-21, doi:10.1038/nrn.2015.1.
26. Wang, J.Z.; Liu, F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol* **2008**, *85*, 148-175, doi:10.1016/j.pneurobio.2008.03.002.

27. Mandell, J.W.; Banker, G.A. A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* **1996**, *16*, 5727-5740, doi:10.1523/jneurosci.16-18-05727.1996.
28. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *46*, 3-26, doi:10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
29. Evans, B.E.; Rittle, K.E.; Bock, M.G.; DiPardo, R.M.; Freidinger, R.M.; Whitter, W.L.; Lundell, G.F.; Veber, D.F.; Anderson, P.S.; Chang, R.S.L.; et al. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **1988**, *31*, 2235-2246, doi:10.1021/jm00120a002.
30. *Natural Product Chemistry for Drug Discovery*; The Royal Society of Chemistry: 2009.
31. Jaul, E.; Barron, J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Front Public Health* **2017**, *5*, 335, doi:10.3389/fpubh.2017.00335.
32. Brodski, C.; Vogt Weisenhorn, D.M.; Dechant, G. Therapy of neurodegenerative diseases using neurotrophic factors: cell biological perspective. *Expert Rev Neurother* **2002**, *2*, 417-426, doi:10.1586/14737175.2.3.417.
33. Cencioni, C.; Spallotta, F.; Martelli, F.; Valente, S.; Mai, A.; Zeiher, A.M.; Gaetano, C. Oxidative Stress and Epigenetic Regulation in Ageing and Age-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14*, 17643-17663, doi:10.3390/ijms140917643.
34. Balaban, R.S.; Nemoto, S.; Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **2005**, *120*, 483-495, doi:10.1016/j.cell.2005.02.001.
35. Erfani, S.; Valadbeigi, T.; Aboutaleb, N.; Karimi, N.; Moghimi, A.; Khaksari, M. Usnic acid improves memory impairment after cerebral ischemia/reperfusion injuries by anti-neuroinflammatory, anti-oxidant, and anti-apoptotic properties. *Iran J Basic Med Sci* **2020**, *23*, 1225-1231, doi:10.22038/ijbms.2020.43280.10165.
36. Fernández-Moriano, C.; Divakar, P.K.; Crespo, A.; Gómez-Serranillos, M.P. Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. *Food Chem Toxicol* **2017**, *105*, 262-277, doi:10.1016/j.fct.2017.04.030.
37. Lee, S.; Suh, Y.J.; Yang, S.; Hong, D.G.; Ishigami, A.; Kim, H.; Hur, J.S.; Chang, S.C.; Lee, J. Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Evernic Acid in an MPTP-Induced Parkinson's Disease Model. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22042098.
38. de Pedro, N.; Cantizani, J.; Ortiz-López, F.J.; González-Menéndez, V.; Cautain, B.; Rodríguez, L.; Bills, G.F.; Reyes, F.; Genilloud, O.; Vicente, F. Protective effects of isolecanoric acid on neurodegenerative in vitro models. *Neuropharmacology* **2016**, *101*, 538-548, doi:10.1016/j.neuropharm.2015.09.029.
39. Ureña-Vacas, I.; González-Burgos, E.; Divakar, P.K.; Gómez-Serranillos, M.P. Lichen Extracts from Cetrarioid Clade Provide Neuroprotection against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *Molecules* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27196520.
40. Kosanic, M.; Rankovic, B.; Stanojkovic, T.; Vasiljevic, P.; Manojlovic, N. Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia. *EXCLI J* **2014**, *13*, 1226-1238.
41. Lohézic-Le Dévéhat, F.; Legouin, B.; Couteau, C.; Boustie, J.; Coiffard, L. Lichenic extracts and metabolites as UV filters. *J Photochem Photobiol B* **2013**, *120*, 17-28, doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.01.009.
42. Kello, M.; Goga, M.; Kotorova, K.; Sebova, D.; Frenak, R.; Tkacikova, L.; Mojzis, J. Screening Evaluation of Antiproliferative, Antimicrobial and Antioxidant Activity of Lichen Extracts and Secondary Metabolites In Vitro. *Plants (Basel)* **2023**, *12*, doi:10.3390/plants12030611.
43. Mohammadi, M.; Bagheri, L.; Badreldin, A.; Fatehi, P.; Pakzad, L.; Suntres, Z.; van Wijnen, A.J. Biological Effects of Gyrophoric Acid and Other Lichen Derived Metabolites, on Cell Proliferation, Apoptosis and Cell Signaling pathways. *Chem Biol Interact* **2022**, *351*, 109768, doi:10.1016/j.cbi.2021.109768.
44. Teleanu, D.M.; Niculescu, A.G.; Lungu, I.; Radu, C.I.; Vladâcenco, O.; Roza, E.; Costăchescu, B.; Grumezescu, A.M.; Teleanu, R.I. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23115938.
45. Bredesen, D.E.; Rao, R.V.; Mehlen, P. Cell death in the nervous system. *Nature* **2006**, *443*, 796-802, doi:10.1038/nature05293.
46. Wang, L.; Zhang, F.; Peng, W.; Zhang, J.; Dong, W.; Yuan, D.; Wang, Z.; Zheng, Y. Preincubation with a low-dose hydrogen peroxide enhances anti-oxidative stress ability of BMSCs. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* **2020**, *15*, 392, doi:10.1186/s13018-020-01916-y.

47. Platzter, M.; Kiese, S.; Tybussek, T.; Herfellner, T.; Schneider, F.; Schweiggert-Weisz, U.; Eisner, P. Radical Scavenging Mechanisms of Phenolic Compounds: A Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) Study. *Front Nutr* **2022**, *9*, 882458, doi:10.3389/fnut.2022.882458.
48. Studzińska-Sroka, E.; Hołderna-Kędzia, E.; Galanty, A.; Bylka, W.; Kacprzak, K.; Ćwiklińska, K. In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds isolated from *Cladonia uncialis*. *Nat Prod Res* **2015**, *29*, 2302-2307, doi:10.1080/14786419.2015.1005616.
49. Redza-Dutordoir, M.; Averill-Bates, D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1863*, 2977-2992, doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
50. Ding, J.; Zhang, Z.; Roberts, G.J.; Falcone, M.; Miao, Y.; Shao, Y.; Zhang, X.C.; Andrews, D.W.; Lin, J. Bcl-2 and Bax interact via the BH1-3 groove-BH3 motif interface and a novel interface involving the BH4 motif. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 28749-28763, doi:10.1074/jbc.M110.148361.
51. Filomeni, G.; De Zio, D.; Cecconi, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death & Differentiation* **2015**, *22*, 377-388, doi:10.1038/cdd.2014.150.
52. Zhao, S.; Li, L.; Wang, S.; Yu, C.; Xiao, B.; Lin, L.; Cong, W.; Cheng, J.; Yang, W.; Sun, W.; et al. H₂O₂ treatment or serum deprivation induces autophagy and apoptosis in naked mole-rat skin fibroblasts by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncotarget* **2016**, *7*, 84839-84850, doi:10.18632/oncotarget.13321.
53. Gordy, C.; He, Y.W. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein Cell* **2012**, *3*, 17-27, doi:10.1007/s13238-011-1127-x.
54. Marquez, R.T.; Xu, L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am J Cancer Res* **2012**, *2*, 214-221.
55. Yang, B.; Liu, Q.; Bi, Y. Autophagy and apoptosis are regulated by stress on Bcl2 by AMBRA1 in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Theor Biol Med Model* **2019**, *16*, 18, doi:10.1186/s12976-019-0113-5.
56. Park, H.; Kang, J.-H.; Lee, S. Autophagy in Neurodegenerative Diseases: A Hunter for Aggregates. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21093369.
57. Subramanian, J.; Tremblay, M.-È. Editorial: Synaptic Loss and Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2021**, *15*.
58. Reddy, D.S.; Abeygunaratne, H.N. Experimental and Clinical Biomarkers for Progressive Evaluation of Neuropathology and Therapeutic Interventions for Acute and Chronic Neurological Disorders. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms231911734.
59. Fuster-Matanzo, A.; Llorens-Martín, M.; Jurado-Arjona, J.; Avila, J.; Hernández, F. Tau protein and adult hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci* **2012**, *6*, 104, doi:10.3389/fnins.2012.00104.
60. Ittner, A.; Chua, S.W.; Bertz, J.; Volkerling, A.; van der Hoven, J.; Gladbach, A.; Przybyla, M.; Bi, M.; van Hummel, A.; Stevens, C.H.; et al. Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid- β toxicity in Alzheimer's mice. *Science* **2016**, *354*, 904-908, doi:10.1126/science.aah6205.
61. DeVos, S.L.; Hyman, B.T. Tau at the Crossroads between Neurotoxicity and Neuroprotection. *Neuron* **2017**, *94*, 703-704, doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.001>.
62. Kanaan, N.M.; Morfini, G.A.; LaPointe, N.E.; Pignino, G.F.; Patterson, K.R.; Song, Y.; Andreadis, A.; Fu, Y.; Brady, S.T.; Binder, L.I. Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *J Neurosci* **2011**, *31*, 9858-9868, doi:10.1523/jneurosci.0560-11.2011.
63. Reddy, R.G.; Veeraval, L.; Maitra, S.; Chollet-Krugler, M.; Tomasi, S.; Dévéhat, F.L.; Boustie, J.; Chakravarty, S. Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 1527-1534, doi:10.1016/j.phymed.2016.08.010.
64. Mirza, F.J.; Amber, S.; Sumera; Hassan, D.; Ahmed, T.; Zahid, S. Rosmarinic acid and ursolic acid alleviate deficits in cognition, synaptic regulation and adult hippocampal neurogenesis in an A β (1-42)-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Phytomedicine* **2021**, *83*, 153490, doi:10.1016/j.phymed.2021.153490.

65. Li, C.; Sui, C.; Wang, W.; Yan, J.; Deng, N.; Du, X.; Cheng, F.; Ma, X.; Wang, X.; Wang, Q. Baicalin Attenuates Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Injury by Modulating the BDNF-TrkB/PI3K/Akt and MAPK/Erk1/2 Signaling Axes in Neuron-Astrocyte Co-cultures. *Front Pharmacol* **2021**, *12*, 599543, doi:10.3389/fphar.2021.599543.
66. Meng, F.; Xi, Y.; Huang, J.; Ayers, P.W. A curated diverse molecular database of blood-brain barrier permeability with chemical descriptors. *Scientific Data* **2021**, *8*, 289, doi:10.1038/s41597-021-01069-5.
67. Yusof, S.R.; Avdeef, A.; Abbott, N.J. In vitro porcine blood-brain barrier model for permeability studies: pCEL-X software pKa(FLUX) method for aqueous boundary layer correction and detailed data analysis. *Eur J Pharm Sci* **2014**, *65*, 98-111, doi:10.1016/j.ejps.2014.09.009.
68. Xue, Q.; Liu, Y.; Qi, H.; Ma, Q.; Xu, L.; Chen, W.; Chen, G.; Xu, X. A novel brain neurovascular unit model with neurons, astrocytes and microvascular endothelial cells of rat. *Int J Biol Sci* **2013**, *9*, 174-189, doi:10.7150/ijbs.5115.
69. Weksler, B.; Romero, I.A.; Couraud, P.-O. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS* **2013**, *10*, 16, doi:10.1186/2045-8118-10-16.
70. Bhuvanendran, S.; Hanapi, N.A.; Ahemad, N.; Othman, I.; Yusof, S.R.; Shaikh, M.F. Embelin, a Potent Molecule for Alzheimer's Disease: A Proof of Concept From Blood-Brain Barrier Permeability, Acetylcholinesterase Inhibition and Molecular Docking Studies. *Frontiers in Neuroscience* **2019**, *13*.
71. Hanapi, N.A.; Mohamad Arshad, A.S.; Abdullah, J.M.; Tengku Muhammad, T.S.; Yusof, S.R. Blood-Brain Barrier Permeability of Asiaticoside, Madecassoside and Asiatic Acid in Porcine Brain Endothelial Cell Model. *J Pharm Sci* **2021**, *110*, 698-706, doi:10.1016/j.xphs.2020.09.015.
72. Studzińska-Sroka, E.; Majchrzak-Celińska, A.; Zalewski, P.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Żarowski, M.; Plech, T.; Cielecka-Piontek, J. Permeability of Hypogymnia physodes Extract Component-Physodic Acid through the Blood-Brain Barrier as an Important Argument for Its Anticancer and Neuroprotective Activity within the Central Nervous System. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13071717.
73. Studzińska-Sroka, E.; Majchrzak-Celińska, A.; Zalewski, P.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Kaproń, B.; Plech, T.; Żarowski, M.; Cielecka-Piontek, J. Lichen-Derived Compounds and Extracts as Biologically Active Substances with Anticancer and Neuroprotective Properties. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, doi:10.3390/ph14121293.
74. Lombardo, S.M.; Schneider, M.; Türeli, A.E.; Günday Türeli, N. Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design. *Beilstein J Nanotechnol* **2020**, *11*, 866-883, doi:10.3762/bjnano.11.72.
75. Hitchcock, S.A. Blood-brain barrier permeability considerations for CNS-targeted compound library design. *Curr Opin Chem Biol* **2008**, *12*, 318-323, doi:10.1016/j.cbpa.2008.03.019.
76. Sánchez-Martínez, J.D.; Garcia, A.R.; Alvarez-Rivera, G.; Valdés, A.; Brito, M.A.; Cifuentes, A. In Vitro Study of the Blood-Brain Barrier Transport of Natural Compounds Recovered from Agrifood By-Products and Microalgae. *International journal of molecular sciences* **2022**, *24*, 533, doi:10.3390/ijms24010533.
77. Pound, P.; Ritskes-Hoitinga, M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *Journal of Translational Medicine* **2018**, *16*, 304, doi:10.1186/s12967-018-1678-1.
78. Morris, M.E.; Rodriguez-Cruz, V.; Felmler, M.A. SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. *Aaps j* **2017**, *19*, 1317-1331, doi:10.1208/s12248-017-0110-8.
79. Delsing, L.; Herland, A.; Falk, A.; Hicks, R.; Synnergren, J.; Zetterberg, H. Models of the blood-brain barrier using iPSC-derived cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2020**, *107*, 103533, doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103533>.
80. Jesus, A.; Sebastião, A.I.; Brites, G.; Correia-da-Silva, M.; Cidade, H.; Cruz, M.T.; Sousa, E.; Almeida, I.F. A Hydrophilic Sulfated Resveratrol Derivative for Topical Application: Sensitization and Anti-Allergic Potential. *Molecules* **2023**, *28*, doi:10.3390/molecules28073158.
81. Gupta, A.; Sahu, N.; Singh, A.P.; Singh, V.K.; Singh, S.C.; Upadhye, V.J.; Mathew, A.T.; Kumar, R.; Sinha, R.P. Exploration of Novel Lichen Compounds as Inhibitors of SARS-CoV-2 Mpro: Ligand-Based Design, Molecular Dynamics, and ADMET Analyses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2022**, *194*, 6386-6406, doi:10.1007/s12010-022-04103-3.

DISCUSIÓN INTEGRADORA

IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA

Los productos naturales han evolucionado a lo largo de miles de años con el propósito de desempeñar diversas funciones beneficiosas en el organismo que los produce. Estos compuestos pueden ser modificados estructuralmente para mejorar su perfil farmacocinético y farmacodinámico. Estas modificaciones permiten el desarrollo de nuevos fármacos con propiedades terapéuticas mejoradas (Davison y Brimble, 2019).

Tradicionalmente, los productos naturales presentes en especies vegetales han constituido la principal fuente de compuestos activos. Más de 70.000 plantas se utilizan con fines terapéuticos, especialmente en el continente asiático (Nasim y col., 2022). Además, importantes fármacos de uso habitual en terapéutica tienen un origen vegetal como la morfina extraída de *Papaver somniferum* L., la digoxina de *Digitalis purpurea* L., o el ácido salicílico de *Salix* spp. Pero no sólo las plantas han contribuido a conformar nuestro arsenal terapéutico, sino que otras fuentes naturales como los organismos marinos (por ejemplo, trabectedina, antineoplásico aislado de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* Herdman) o diversos hongos (ej. penicilina aislado de *Penicillium chrysogenum* Thom.) han sido utilizadas (Wachtel-Galor y Benzie, 2011; Cuevas y Francesch, 2009).

A pesar de los avances en el descubrimiento de fármacos, los patrones de las enfermedades han ido variando a lo largo del tiempo. Así, las alteraciones climáticas, los cambios demográficos y, por supuesto, o las resistencias a antibióticos repercuten en el aumento de brotes epidémicos infecciosos; el impacto de la dieta o el tabaco influyen en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y la exposición a contaminantes incrementa el riesgo de sufrir enfermedades como el cáncer (Baker y col., 2022; Tapsell y col., 2019). Así mismo el aumento de la esperanza de vida incrementa la prevalencia de enfermedades asociadas a la edad, entre las que se destacan las enfermedades neurodegenerativas (Morris, 2013).

En base a estas premisas, y sumado al elevado número de enfermedades que no tienen tratamiento curativo, la búsqueda de nuevos fármacos sigue siendo indispensable. En este contexto, los líquenes surgen como una novedosa fuente de metabolitos activos, que, durante mucho tiempo, ha sido escasamente explorada. En las últimas décadas, extractos liquénicos y sus compuestos aislados han sido investigados en modelos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*, demostrando importantes actividades farmacológicas tales como antioxidante, citotóxica, antimicrobiana, antiinflamatoria, analgésica, fotoprotectora, antidiabética, antiangiogénica e inmunomoduladora, entre otras.

Como parte del desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han revisado tres de los principales grupos químicos de metabolitos secundarios liquénicos: depsidonas, dépsidos y dibenzofuranos, todos ellos sintetizados a través de la ruta del acetato-mevalonato.

Analizando en su conjunto estas tres revisiones (**publicaciones 1, 2 y 3**) se ha observado que el estudio de la actividad farmacológica de los compuestos liquénicos se encuentra en una etapa inicial, con escasos estudios que profundicen en los mecanismos de acción implicados o en la relación estructura-actividad. La mayoría de ellos son estudios *in vitro* o *in silico*, siendo escasos los estudios *in vivo* e inexistentes los ensayos clínicos.

Las principales actividades investigadas son la antioxidante, antimicrobiana y citotóxica, con resultados prometedores para todas ellas.

Entre los compuestos que han demostrado actividad **antimicrobiana** se destacan las depsidonas como el ácido fumarprotocetrárico y el ácido protocetrárico, ambos activos frente a bacterias gram-positivas como *Bacillus cereus* o *B. subtilis*, a bacterias gram-negativas como *Listeria monocytogenes*, y a protozoos como *Trypanosoma brucei brucei*. Otras depsidonas presentan importantes actividades antifúngicas como el ácido protocetrárico, mientras que el ácido psorómico actúa como agente antiviral frente a los *herpesvirus* -1 y -2 (Yilmaz y col., 2004; Igoli y col., 2014; Tay y col., 2004). Entre los dépsidos, se destaca el ácido difractaico que presenta una notable actividad antifúngica frente a *Fusarium fujikuroi*, actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y actividad antimicobacteriana. El dépsido ácido divaricático también ha mostrado ser activo frente a infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* metilicina-resistentes (Oh y col., 2018; Maulidiyah y col., 2021; Furmanek y col., 2022; Honda y col., 2010). Resultados similares se han encontrado frente a otros patógenos; así, el ácido evérnico ha resultado ser activo contra protozoos como el parásito *Plasmodium*, y el ácido girofórico frente a las larvas del mosquito *Culiseta longiareolata* (Cetin y col., 2012; Lauinger y col., 2013)

Por otro lado, el grupo de los dibenzofuranos ha sido ampliamente estudiado, y entre ellos, el ácido úsnico ha demostrado ser el más efectivo frente a diversas bacterias, hongos y virus (Ramis y col., 2018; Peralta y col., 2017; Ivanova y col., 2010). También destacan los ácidos condidímico y didímico por su actividad antimicrobiana, mientras que el ácido isotrepsílico y la alectosarmentina presentan baja actividad. La distinta actividad antimicrobiana mostrada por estos compuestos se puede atribuir a las diferencias estructurales tales como la presencia de un anillo lactónico en la alectosarmentina (Dieu y col., 2014; Gollapudi y col., 1994; Carpentier y col., 2017).

Por tanto, los líquenes se presentan como una importante fuente de compuestos con actividad antibiótica frente a diferentes organismos patógenos, tanto sobre cepas sensibles como resistentes a tratamientos.

Asimismo, tras la revisión exhaustiva de los diferentes grupos, se aprecia que la actividad más investigada es la **citotóxica**. Esta actividad ha sido evaluada sobre múltiples líneas celulares de origen animal y humano. Aunque la mayoría de estos trabajos evalúan simplemente el efecto sobre la viabilidad celular, en los últimos años, cada vez son más los estudios que tratan de identificar las dianas moleculares y las vías de transducción de señales implicadas.

Entre las depsidonas, destaca el ácido lobárico, y el ácido fisódico que han demostrado su citotoxicidad a través de diferentes mecanismos como la inhibición de las enzimas 5 y 12-lipoxigenasas, la sobreproducción de EROS, la inhibición de la polimerización de la tubulina, el bloqueo del ciclo celular en fase G0/G1, la reducción de la transcripción de Axin2 (implicada en la proliferación celular) o la activación de la apoptosis intrínseca mitocondrial (Hong y col., 2018; Emsen y col., 2019; Pavlovic y col., 2013; Haraldsdottir y col., 2004; Kosanic y col., 2013; Paluszack y col., 2018). De igual manera el dépsido atranorina, uno de los más estudiado, ha mostrado actuar sobre múltiples vías de señalización como AP-1, Wnt, STAT y p38, actuando en diversas fases del ciclo celular o aumentando la escisión de poli ADP ribosa polimerasa (PARP) (Zhou y col., 2017; Backorova y col., 2012; Backorova y col., 2011). Además, su efecto antitumoral se ha demostrado en modelos *in vivo* de ratones BALB/c y NOD-scid, dando lugar a la reducción del tumor y activación apoptótica, llegándose a elaborar formulaciones novedosas como nanopartículas SPION para aumentar su actividad (Ni y col., 2022; Solar y col., 2016). Finalmente, en el grupo de los dibenzofuranos, el compuesto más ampliamente evaluado en múltiples líneas tumorales ha sido el ácido úsnico. Aparte de los mecanismos explicados anteriormente, el ácido úsnico inhibe la angiogénesis vía bloqueo del receptor VEGFR mediado por ERK1/ERK2 y AKT/P70S6K, inhibe la vía Nrf2/PI3K/AKT o provoca la despolarización de la membrana mitocondrial (Ramsay y col., 2012; Melo y col., 2011; Backorova y col., 2012). Con el ácido úsnico también se han llevado a cabo estudios en animales que revelan su acción antitumoral, reduciendo el tamaño y peso del tumor, en modelos de carcinoma de mama y gástrico, así como su acción genotóxica en modelos de carcinoma de riñón e hígado.

Finalmente, y por su implicación en esta Tesis Doctoral, se destaca la **actividad antioxidante**, ya que los compuestos de origen liquénico pueden actuar como captadores de radicales libres, lo que queda evidenciado a través de diversos ensayos *in vitro* como ORAC, DPPH o su poder reductor. Entre los metabolitos secundarios de líquenes que han mostrado

mayor actividad antioxidante podemos destacar las depsidonas ácido protocetrárico, ácido psorómico, ácido salazínico o ácido estético (Kosanich y col., 2013; Manojlovich y col., 2012; Behera y col., 2012; Gaikwad y col., 2014; de Paz y col., 2010), los dépsidos ácido girofórico, ácido lecanórico y ácido sekikaico (Sisodia y col., 2013; Kosanich y col., 2014; Thadhani y col., 2011) y dibenzofuranos como el ácido úsnico (Suwalsky y col., 2015)

Asimismo, algunos compuestos liquénicos han demostrado actividad neuroprotectora frente al estrés oxidativo como es el caso del dépsido ácido evérnico en modelos *in vitro* de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y de astrocitoma humano (U373MG) y en cultivo primario de neuronas (Fernández-Moriano y col., 2017b; Lee y col., 2021) o la depsidona ácido fumarprotocetrárico que actúa reduciendo la sobreproducción de EROS y aumentando la actividad y la expresión de enzimas antioxidantes (Fernández-Moriano y col., 2017a).

Otras actividades que han sido investigadas en menor medida son la actividad antidiabética, antiinflamatoria o cicatrizante de heridas. La poca especificidad de sus efectos sumada a que en algunos casos son altas las concentraciones a las cuales muestran actividad, sugieren que estos compuestos actúan sobre múltiples dianas con escasa afinidad y no sobre escasas dianas con alta afinidad como expone Mohammadi y colaboradores para el ácido girofórico. Esto podría relacionarse con la acción protectora mostrada por los compuestos de líquenes que actúan frente a múltiples enzimas conservadas en organismos eucariotas y bacterianos (Mohammadi y col., 2022).

Los líquenes se encuentran expuestos a continuos patógenos que raramente los destruyen. Los compuestos liquénicos podrían jugar un papel importante constituyendo una defensa química (Lawrey y col., 1999; Lawrey y col., 2000). Se concluye, por tanto, el papel relevante de los compuestos liquénicos como defensa frente a patógenos, pudiendo estar relacionada con las actividades antimicrobiana y citotóxica demostradas en los estudios *in vitro*. De igual manera, los líquenes generalmente habitan en climas extremos, y por lo que se encuentran expuestos a temperaturas y radiaciones UV. De ahí que las propiedades antioxidantes y fotoprotectora descritas podrían estar relacionadas con el papel protector de estos metabolitos frente a estas condiciones (Nguyen y col., 2015).

Además, cabe mencionar, que, con excepción de algunos compuestos como la atranorina y el ácido úsnico, cuyos estudios farmacológicos se encuentran más avanzados, la mayoría de los productos naturales de origen liquénico identificados han sido escasa o nulamente explorados. Esta situación viene motivada por diversos factores tales como el lento crecimiento del líquen, la escasez de los rendimientos de extracción y los hándicaps en su producción, lo que deriva en la

principal limitación a la que se enfrenta su estudio farmacológico, que es la cantidad de compuesto activo disponible en la naturaleza (Kalra y col. ,2021; Singh, 2023). A ello se añade el reducido número de investigadores en el campo de la farmacología de productos naturales.

Los líquenes son organismos de crecimiento lento y los estímulos que inducen la síntesis de sus metabolitos o bien se desconocen, o no son reproducibles en el laboratorio (Singh, 2023). La comunidad científica trabaja en la expresión heteróloga de los clúster de PKS en organismos de crecimiento rápido como levaduras y la consecución de dichos compuestos para solventar esta limitación. Esta expresión ha sido posible en estudios publicados por Kim y colaboradores y Kealey y colaboradores, ambos en el año 2021.

Así mismo, la mejora en los métodos de identificación, aislamiento y extracción mostrada en la **publicación 2** de este capítulo, permite aumentar el número de compuestos liquénicos identificados y optimizar su obtención.

Finalmente, cabe destacar, que, a pesar del poder antioxidante demostrado por estos compuestos, son escasos los estudios que evalúan su acción neuroprotectora frente al estrés oxidativo, quedando limitados a los ácidos evérnico, fumarprotocetrárico y fisódico. Si bien es importante mencionar que son muchos los compuestos que, dada su acción antioxidante y la quiralidad de sus estructuras podrían ser efectivos en modelos de neurodegeneración.

La presente Tesis Doctoral se ha diseñado, desde un punto de vista farmacognóstico, partiendo de materia liquénica recolectada. En primer lugar, se ha realizado un cribado y proceso de selección de las especies en base a las características antioxidantes e inhibitorias de enzimas colinesterasas de sus extractos (**Capítulo 2**). Posteriormente, esta capacidad inhibitoria enzimática y las propiedades antioxidantes para prevenir o retrasar el estrés oxidativo han sido evaluados en modelos celulares neuronales (**Capítulos 3 y 4**). Una vez estudiada, su actividad se han identificado los posibles metabolitos responsables mediante técnicas cromatográficas. Finalmente, se ha evaluado la actividad del metabolito mayoritario en diversos modelos celulares, así como su potencial capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer su acción neuroprotectora (**Capítulo 5**).

En base a lo anterior, en el **Capítulo 2**, constituido por la publicación **“Phytochemical Characterization and Pharmacological Properties of Lichen Extracts from Cetrarioid Clade by Multivariate Analysis and Molecular Docking”**, se han evaluado las propiedades antioxidantes e inhibitorias frente a las enzimas colinesterasas de los extractos metanólicos de un total de catorce especies de líquenes, todas ellas pertenecientes al clado cetrarioide. La selección de estas

especies liquénicas se ha basado en la diversidad de su composición química (reflejada en la **Tabla 2** de la sección de la introducción), en su distribución geográfica y en sus usos tradicionales. En este estudio están representados ocho de los diecisiete géneros que conforman este clado, en concreto, las especies *Allocetraria ambigua* (C.Bab.) Kurok & M.J.Lai, *Asahinea scholanderi* (Llano), *Cetraria commixta* (Nyl.) Th. Fr., *Cetraria crespoae* (Barreno & Vazquez) Karnefelt. *Cetraria cucullata* (Bell.) Ach., *Cetraria ericetorum* (Opiz), *Cetraria nivalis* (L.) Ach., *Dactylina arctica* (Hook) Nyl., *Nephromopsis laureri* (Kremp. Kurok), *Nephromopsis pallescens* (Schaer.) Y.S. Park., *Nephromopsis stracheyi* (C.Bab.) Müll. Arg., *Tuckermannopsis americana* (Spreng) Hale., *Tuckerneraria ahtii* (Randlane & Saag). y *Vulpicida pinastri* (Scoop) Mattsson & M. J. Lai. han sido evaluadas. Los extractos más activos en este cribado han sido seleccionados para continuar el estudio.

En las enfermedades neurodegenerativas, como se ha desarrollado extensamente en la introducción de este trabajo, están implicados numerosos mecanismos como la agregación anómala de proteínas, la neuroinflamación, la disfunción sináptica y el transporte axonal, el estrés oxidativo mediado por la sobreproducción de EROS, la disfunción mitocondrial o el desequilibrio en los niveles de neurotransmisores. Todos ellos se encuentran interrelacionados de manera cíclica y terminan ocasionado la disfunción y muerte neuronal (Jellinger, 2010). El cribado de las especies liquénicas desarrollado en el **Capítulo 2** está dirigido a dos de los mecanismos implicados en la neurodegeneración: el desequilibrio de neurotransmisores y el estrés oxidativo.

Atendiendo al primero de ellos, este trabajo se centra en el neurotransmisor ACh. Cabe destacar el papel de este neurotransmisor en los síntomas cognitivos propios de enfermedades neurodegenerativas como la EA y la EP. En la enfermedad del Alzheimer, la pérdida de neuronas colinérgicas y el severo déficit de ACh están implicados en el declive cognitivo y la pérdida de memoria (Ferreira-Vieira y col., 2016; Dubois y col., 1983). El principal abordaje terapéutico de esta enfermedad está basado en aumentar los niveles de ACh en la sinapsis mediante el uso de inhibidores de sus enzimas degradativas, AChE y BuChE (Marucci y col., 2021). Durante décadas, se consideró que la implicación de la enzima BuChE en el proceso era limitada, su papel en los últimos años ha cobrado importancia, tras observarse que su actividad se incrementa de forma significativa durante el desarrollo patogénico de la EA (Greig y col., 2002). Esto ha hecho que los fármacos inhibidores selectivos de la enzima BuChE tengan un destacado papel terapéutico. Por tanto, en la evaluación del potencial papel neuroprotector de los extractos metanólicos de las especies liquénicas estudiadas se ha investigado, en primer lugar, su capacidad para inhibir a ambas enzimas colinesterasas, seguido de la caracterización fitoquímica de los extractos que resultaron más activos y de estudios de acoplamiento molecular o “*docking*” de los metabolitos secundarios identificados sobre las enzimas AChE y BuChE.

Todos los extractos metanólicos de los líquenes presentaron una mayor actividad inhibitoria frente a la enzima AChE (valores de IC₅₀ desde 0,11 mg/ml a 0,35 mg/ml) que frente a la enzima BuChE (valores de IC₅₀ desde 0,29 mg/ml a 1,26 mg/ml). Esta actividad ha sido posteriormente confirmada con las conformaciones obtenidas en los estudios de *docking* de sus metabolitos secundarios. Los extractos que resultaron más activos por presentar valores de IC₅₀ más bajos para ambas enzimas colinesterasas han sido los extractos de *Asahinea scholanderi*, con valores de inhibición para la enzima AChE de IC₅₀ 0,11 mg/ml y para la enzima BuChE de IC₅₀ 0,29 mg/ml y *Cetraria cucullata*, actualmente clasificada como *Flavocetraria cucullata*, con valores de inhibición para la enzima AChE de IC₅₀ 0,18 mg/ml y para la enzima BuChE de IC₅₀ 0,31 mg/ml. El análisis comparativo con otros líquenes evaluados en la literatura científica, indica que los valores se encuentran en el mismo rango de inhibición, destacando el liquen *Hypotrachyna formosana* con un valor de inhibición frente a la enzima AChE del 45,7% para la concentración de 0,1 mg/ml, y menor para la enzima BuChE, con un valor del 41,2% para la concentración de 0,1 mg/ml (Sieteiglesias y col., 2019). Estudios de los líquenes antárticos *Lecania brialmontii*, *Pseudephebe pubescens* y *Sphaerophorus globosus* mostraron potente actividad inhibitoria frente a ambas enzimas (Torres-Benítez y col., 2022). En relación con metabolitos y extractos de origen vegetal no liquénico, se encuentran valores de inhibición más elevados para la enzima AChE, especialmente para aquellas especies ricas en alcaloides como *Scadoxus puniceus* (L.) Friis & Nordal o *Lankea schweinfurthii* Engl. con valores de IC₅₀ de 0,3 µg/ml (dos Santos y col., 2018). En base a este trabajo de dos Santos y colaboradores, los extractos de líquenes de nuestro estudio presentan una capacidad inhibitoria moderada frente a las colinesterasas (dos Santos y col., 2018).

Una vez evaluada su actividad inhibitoria frente a las enzimas colinesterasas, se procedió a la caracterización fitoquímica de los dos extractos que resultaron más activos, *Asahinea scholanderi* y *Cetraria cucullata*, empleando para ello la técnica cromatográfica HPLC. Los cromatogramas representativos mostraron la presencia de las depsidonas ácido alectorónico (ALE) y α -colatólico (COL) en el extracto metanólico de *Asahinea scholanderi* y el ácido úsnico (USN) y el ácido alifático protoliquesterénico (PRO) en el extracto de *Cetraria cucullata*. Con el fin de identificar qué compuesto es el potencial responsable de la actividad anticolinesterásica, se llevaron a cabo estudios moleculares que permitieron comparar las afinidades de los metabolitos secundarios con el sustrato ACh y con los respectivos inhibidores, donepezilo para la enzima AChE y N-((1-(2,3-dihidro-1h-inden-2-il) piperidin 3-il) metil)-N-(2-(dimetilamino) etil)-2-naftamida, selectivo para la enzima BuChE (Gerlits y col., 2019). En primer lugar, se comprobó que en el modelo *in silico* aplicado a la ACh, este neurotransmisor era más afín a la enzima AChE que a la enzima BuChE, tal y como ocurre en la naturaleza. Los dos sitios de unión esenciales en el reconocimiento

molecular son el centro activo catalítico y el sitio aromático periférico. Las diferencias aminoacídicas en el PAS entre ambas enzimas colinesterasas explica la variabilidad entre los sustratos. Así, en el caso de la enzima BuChE que presenta un mayor número de aminoácidos alifáticos en el PAS posibilita la entrada de sustratos de mayor tamaño (De Boer y col., 2021; Berg y col., 2011). Por otro lado, ambos inhibidores de referencia mostraron mayor afinidad por sus respectivas enzimas que los compuestos liquénicos analizados. En el caso del donepezilo, la presencia del nitrógeno cargado positivamente incrementa su interacción a través de enlaces de hidrógeno adicionales y de interacciones π -catiónicas. En el caso del N-((1-(2,3-dihidro-1h-inden-2-il) piperidin 3-il) metil)-N-(2-(dimetilamino) etil)-2-naftamida se ha demostrado que su capacidad de inhibición a nivel picomolar frente a la enzima BuChE se debe a fuertes interacciones π -catiónicas (Kosak y col., 2018).

En cuanto a los metabolitos secundarios, se destacó la afinidad del **ácido alectorónico** (próxima a la del compuesto de referencia donepezilo) seguido del ácido colatólico y de la atranorina por la enzima AChE. Se incluyó la atranorina puesto que aun siendo minoritario suele estar presente en las especies de *Asahinea scholanderi*. Cabe destacar que previamente estudios de *docking* establecieron que la estructura de las depsidonas podría servir de cabeza de serie para el diseño de nuevos fármacos IChEs. (Ece y Pejin, 2015). Asimismo, también el **ácido protoliquesterénico** presentó valores absolutos de *docking* mayores que la ACh, siendo el ácido úsnico el que presentó una menor afinidad. Por tanto, en base a estos resultados se sugiere que la actividad inhibitoria del extracto de *Cetraria cucullata* es dependiente en mayor medida del ácido protoliquesterénico, lo que se relaciona con una elevada lipofilia del sitio de unión.

Por otro lado, en relación con la enzima BuChE, todos los compuestos liquénicos analizados presentaron mayor afinidad por la enzima que el propio sustrato ACh. Sin embargo, en comparación con el inhibidor de referencia, estas afinidades fueron bajas. De igual manera destacaron los compuestos ácido alectorónico, ácido α -colatólico y atranorina.

Las interacciones proteína-ligando observadas para los compuestos liquénicos proponen que estos metabolitos secundarios actúan como **IChEs reversibles**. Los estudios de estructura actividad en compuestos naturales sugieren que los inhibidores alcaloideos debido a sus estructuras nitrogenadas cargadas se unen al centro activo de la enzima AChE en el sitio aniónico, mientras que los terpenos, los flavonoides y otros compuestos fenólicos se unen fundamentalmente al PAS, actuando como inhibidores no competitivos (dos Santos y col., 2018).

Los resultados *in silico* obtenidos en el **Capítulo 2** se correlacionan directamente con los ensayos *in vitro*, y muestran que los compuestos presentes en *A. scholanderi* (extracto más activo),

en especial el ácido alectorónico, presentan una mayor afinidad por la enzima AChE. Asimismo, los valores de *docking* de los compuestos liquénicos estudiados frente a la enzima BuChE fueron menores que para AChE, resultado que se corresponde con la menor actividad inhibitoria de los extractos para BuChE que frente a AChE.

En base a lo anteriormente expuesto, durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se decidió profundizar en el estudio de la capacidad inhibitoria frente a la enzima AChE de los extractos liquénicos y de sus metabolitos secundarios en un modelo celular neuronal SH-SY5Y, tal y como se expone en el **Capítulo 3**. Este capítulo incluye la comunicación **“Discovery of Natural Acetylcholinesterase inhibitors from the Cetrarioid lichens *Cetraria cucullata* and *Asahinea scholanderi* and its secondary metabolites”**.

La aplicación de modelos *in vitro* e *in silico*, sin la utilización de modelos celulares, ha resultado eficaz en la reducción de tiempos de búsqueda de nuevos compuestos activos. En la literatura científica, son múltiples los estudios *in vitro* que evalúan la actividad de inhibición frente a la enzima AChE; sin embargo, la aplicación de modelos celulares para su estudio es escasa. En este contexto, la selección del modelo celular es un aspecto limitante. En nuestro trabajo se seleccionó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y que presenta en su citoplasma la enzima AChE catalíticamente activa, tanto en células indiferenciadas como diferenciadas (Onder y col., 2022).

Se evaluó, por primera vez, la citotoxicidad de los extractos de *Asahinea scholanderi* y *Cetraria cucullata* así como de dos de sus metabolitos secundarios, el ácido alectorónico, el cual destacó en los estudios de *docking* molecular, y el ácido úsnico, compuesto mayoritario en *C. cucullata*. Las máximas concentraciones no citotóxicas de los extractos y compuestos liquénicos fueron posteriormente seleccionadas para estudiar su capacidad para inhibir a la enzima AChE (10 µg/ml para *A. scholanderi*, 0,25 µg /ml para *C. cucullata*, 50 µM para el ácido alectorónico y 5 µM para el ácido úsnico). De todos ellos, sólo el ácido alectorónico inhibió de forma significativa a la enzima AChE, alcanzándose una reducción del 24,6% de su actividad. Estudios previos también han demostrado este efecto para otras depsidonas como la aspergilusidona A, aislada del hongo *Aspergillus unguis* (Émile-Weill & L.Gaudin) Thom & Raper, que inhibió a la enzima AChE con un valor de IC₅₀ de 56,8 µM.(Yang y col., 2018). En relación con el ácido úsnico, su capacidad para inhibir a la enzima AChE no fue significativa, lo que concuerda con los valores de afinidad obtenidos en el estudio *in silico*. Sin embargo, otros trabajos previos sugieren que el ácido úsnico sí tiene un buen perfil inhibitor (Areche y col., 2022).

Una vez evaluados los efectos inhibidores en la enzima AChE en condiciones fisiológicas, se aplicó un modelo de estrés oxidativo inducido por H₂O₂. En este modelo se reafirmó la activación de la enzima AChE (en 5,5 veces su actividad) tal y como previamente había sido descrito por otros investigadores (Schallreuter y col., 2006; Garcimartín y col., 2017). En estos trabajos se demostró que el H₂O₂ actúa como activador alostérico en un rango de concentraciones de 10⁻⁶ M. En nuestro estudio, este aumento fue reducido de forma significativa por el ácido alectorónico (44% respecto al H₂O₂). Por otro lado, dada la extensa descripción en la literatura científica de la capacidad de captación de radicales libres por el ácido úsnico y de su capacidad antioxidante, la disminución de la actividad observada podría deberse a un efecto indirecto de la reducción de H₂O₂ (Hoa y col., 2020).

Además de los efectos colinérgicos desempeñados por la AChE, esta enzima está implicada en numerosas funciones no colinérgicas como el crecimiento neuronal o la apoptosis (Soreq y Seidman, 2001), relacionándose la sobreexpresión de la enzima AChE con la formación del apoptosoma (Park y col., 2004). Asimismo, hay estudios que relacionan la maduración de las placas amiloides con la enzima AChE (Carvajal e Inestrosa, 2011). Diversos modelos celulares de neurodegeneración han corroborado el aumento de la expresión de la enzima AChE en modelos de sobreexpresión de p-tau en células SH-SY5Y, tras la exposición con LPS en células de microglía de ratón (BV2), o tras la administración de H₂O₂ (500 μM) (Cortés-Gómez y col., 2021; Xia y col., 2022; Zhang y col., 2008). Por tanto, efectos sobre los niveles de la enzima AChE también podrían resultar beneficiosos frente a estímulos apoptóticos.

Contrariamente a lo esperado, la concentración de H₂O₂ seleccionada en nuestro estudio no modificó la expresión de la enzima AChE, pero sí disminuyó de manera significativa sus niveles en células pretratadas con el extracto del líquen *A. scholanderi* y los compuestos ácido alectorónico y ácido úsnico, pudiendo desempeñar funciones protectoras no asociadas a la inhibición de la enzima. De hecho, el ácido úsnico demostró reducir la actividad de la enzima caspasa 3 en un modelo *in vitro* de estrés oxidativo (Fernández-Moriano y col., 2017a).

Finalmente cabe mencionar los diferentes patrones de expresión de las variantes de la enzima AChE en situaciones fisiológicas o patológicas, en las diferentes regiones cerebrales e incluso en diversas líneas celulares (Campanari y col., 2016). Actualmente existen discrepancias en torno a la implicación de cada una de ellas, relacionando AChE-R con procesos de neuroprotección y reparación y la AChE-T con procesos de neurotoxicidad (Cohen y col., 2002; Perrier y col., 2006). Es necesario por tanto profundizar en el estudio de estas variantes para comprender los potenciales efectos neuroprotectores de los compuestos líquénicos analizados.

Analizando en conjunto los **Capítulos 2 y 3**, y en relación con los objetivos 2 y 4 de esta Tesis Doctoral, el ácido alectorónico, presente en el líquen *Asahinea scholanderi*, mostró un buen perfil de inhibición frente a la enzima AChE, tanto en el modelo *in silico* como en modelo *in vitro* celular. A pesar de ello, otros compuestos naturales como el alcaloide berberina (IC₅₀ AChE 0,52 μM) o el flavonoide bilobetina (IC₅₀ AChE 5,76 μM) han mostrado mejores perfiles de inhibición (Smyrska-Wieleba y Mroczek, 2023). Por ello, se propone utilizar el ácido alectorónico como cabeza de serie para el diseño de inhibidores que sean más activos, abriéndose así una futura línea de investigación.

La ya comentada multicausalidad de estas enfermedades neurodegenerativas ha llevado al desarrollo de un enfoque terapéutico basado en la búsqueda de "**ligandos dirigidos hacia múltiples dianas**" (conocidos en inglés por las siglas MTDL, multi-target-direct-ligands). Así, un compuesto es capaz de actuar frente a dos o más dianas de la enfermedad, además de verse reducidos los efectos adversos ocasionados por interacciones en terapias combinadas (Wang y col., 2019).

En el desarrollo de la introducción de este trabajo se constató el papel del estrés oxidativo en las diferentes enfermedades neurodegenerativas. Su acción primaria o secundaria está aún en duda, pero en todas ellas el desbalance de la homeostasis redox y el exceso de EROS deriva en el daño oxidativo de las principales biomoléculas presentes en el organismo, induciendo la disfunción y muerte celular (Chen y col., 2012). Además, la susceptibilidad del sistema nervioso al estrés oxidativo debido al alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, la autooxidación de neurotransmisores, la respuesta antioxidante limitada en comparación con otros tejidos, la presencia elevada de Fe²⁺ y Cu⁺ o el alto consumo de oxígeno asociado a la elevada demanda energética, convierte a este mecanismo patogénico en uno de los principales responsables de la neurodegeneración (Cobley y col., 2018).

Uno de los principales abordajes terapéuticos para prevenir y contrarrestar los efectos dañinos de un exceso de radicales libres se basa en la administración exógena de moléculas antioxidantes de origen animal o vegetal como las vitaminas C y E y los polifenoles. Estos compuestos normalmente se introducen a través de la dieta o la suplementación nutricional (Pizzino y col., 2016). Hasta el momento, el uso de antioxidantes en enfermedades neurodegenerativas se ha centrado en la coenzima Q, la melatonina, la N-acetilcisteína, el resveratrol, el ácido docosahexaenoico y el ácido eicosapentaenoico. La mayoría de los ensayos clínicos basados en este enfoque estudia el efecto adyuvante de la molécula antioxidante, en combinación con otro tratamiento terapéutico ya que el uso exclusivo de ellos no ha demostrado

efectos significativos en las enfermedades neurodegenerativas EA, EP, EH o ELA (Morén y col., 2022).

Tal y como se ha recogido en la introducción y sumado a la exhaustiva revisión realizada en el **Capítulo 1**, tanto líquenes cetrarioideos (*Cetraria islandica*, *Cetraria aculeata* o *Vulpicida canadiensis*) como algunos de sus metabolitos secundarios, han demostrado una importante capacidad antioxidante (ácido protocetrárico, ácido psorómico, ácido salazínico, ácido girofórico, ácido lecanórico, ácido sekikaico o ácido úsnico). Esto se debe a su carácter fenólico que les confiere habilidad para captar radicales libres y quelar metales (Bay,2020; Hoa, 2020; Le Roux, 2011). Estas características convierten a los líquenes en una fuente de estudio interesante para patologías relacionadas con el estrés oxidativo.

Por ello, de forma paralela a la evaluación del efecto anticolinesterásico de las catorce especies de líquenes seleccionadas, se realizó el análisis de sus propiedades antioxidantes *in vitro* como *screening* previo a su estudio en un modelo celular de estrés oxidativo (**Capítulo 2**).

En primer lugar, el solvente seleccionado para la extracción fue el metanol. Como se ha comentado anteriormente, los poliquétidos liquénicos presentan naturaleza fenólica y de acuerdo con la literatura científica sus rendimientos máximos de extracción se obtienen con dicho solvente (Malaspina y col.,2020). En este estudio, los líquenes evaluados mostraron rendimientos que variaron desde el 5,6 % para *Cetraria nivalis* hasta el 11,3% para *Dactylina arctica*. Esta extracción es un punto esencial ya que como se observará en el desarrollo de este capítulo, los líquenes que destacaron por su potencial antioxidante coincidieron con altos rendimientos de extracción [*Dactylina arctica* (11,3%), *Asahinea scholanderi* (10,3%) *Tuckermannopsis americana* (9,8%), *Nephromopsis stracheyi* (9,2%) y *Vulpicida pinastri* (9,1%)]. Todos estos valores de extracción se encuentran dentro de rangos establecidos en bibliografía (5% - 12%) (Zambare y Christopher., 2012).

A continuación, se procedió a evaluar la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos utilizando una batería de ensayos *in vitro* y correlacionándolo con el contenido fenólico total. Entre los métodos seleccionados, se destaca la capacidad de absorción de radicales derivados del oxígeno (**ORAC**), puesto que utiliza una fuente de radicales biológicamente relevantes, el 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH), que da lugar a radicales peroxilo por descomposición térmica. Esta técnica se fundamenta en el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT), en el cual los radicales peroxilo formados se estabilizan por donación de un átomo de hidrógeno por parte del compuesto antioxidante (Prior y col., 2005). Por el contrario, los ensayos 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (**DPPH**) y de poder antioxidante reductor férrico (**FRAP**)

se engloban en los métodos de transferencia de electrones (SET), basados en la capacidad de las moléculas antioxidantes para transferir un electrón para reducir un compuesto incluyendo radicales como el DPPH, o metales como el hierro en el caso del ensayo FRAP (Miguel- Chávez, 2017). Como se ha expuesto en la introducción, en el organismo hay diversas fuentes de EROS, por tanto, la aplicación de diferentes ensayos permitió obtener una información completa de la actividad antioxidante de los extractos para su posterior selección y uso en modelos celulares.

A estos ensayos se sumó la evaluación del contenido fenólico total (TPC). Estructuralmente los poliquétidos liquénicos contienen dos o más ácidos fenólicos (Chen y col., 2022a). Los grupos hidroxilo y los efectos de resonancia y conjugación de los dobles enlaces de los compuestos fenólicos son los responsables de su capacidad antioxidante (Rice-Evans y col., 1997). Analizando en su conjunto todas las variables analizadas, destacó el extracto metanólico del líquen *Dactylina arctica* con un valor de IC_{50} 346,6 $\mu\text{g/ml}$ para el ensayo DPPH, un valor de ORAC de 8,2 $\mu\text{mol ET/mg}$ de extracto seco, un valor de FRAP de 29,6 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq/g de muestra, y un contenido fenólico de 113,5 $\mu\text{g AG/mg}$ (el mayor de entre todas las muestras analizadas). Otros líquenes que mostraron moderadas actividades antioxidantes fueron *Nephromopsis stracheyi*, *Tuckermannopsis americana*, *Vulpicida pinastris*, y *Asahinea scholanderi*, tal y como se confirma con sus índices de potencial antioxidante (EAP). Cabe mencionar, que la correlación establecida entre el contenido fenólico y las distintas técnicas *in vitro* antioxidantes mediante análisis bivariante, no resultó elevada para todos los resultados. En el caso del ensayo DPPH, la correlación fue baja, sugiriéndose reacciones sinérgicas o antagónicas entre compuestos presentes en el líquen (Rice-Evans y col., 1997).

La evaluación comparativa con otras especies de líquenes de la familia Parmeliaceae sobre la actividad antioxidantes se permite detectar valores inferiores a los presentados en esta Tesis Doctoral como es el caso de *Flavoparmelia euplecta* (valor de ORAC de 3,3 $\mu\text{mol ET/mg}$), similares como *Parmotrema perlatum* (valor de FRAP de 24,89 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq/g) o superiores como *Hypotrachyna formosana* (valor de DPPH de 49,5 $\mu\text{g/ml}$) (Sieteiglesias y col., 2019; Fernández-Moriano y col., 2015). De estos resultados se extrae la importancia de esta fase de cribado dada la variabilidad de resultados entre especies de la misma familia e incluso del mismo género.

Este abordaje inicial de la actividad antioxidante de los extractos de líquenes permitió realizar un primer cribado de las especies a estudiar, que fue confirmado y desarrollado con la aplicación de las técnicas de análisis multivariante conocidas como análisis de componentes principales (PCA) y análisis de agrupamiento jerárquico (HCA). El PCA es una técnica estadística que permite analizar grandes cantidades de datos cuantitativos, reduciendo su dimensionalidad.

Permite la identificación de ciertos patrones en los datos, comprimiéndolos y transformando varias variables correlacionadas en un número reducido de ellas, no correlacionadas, denominadas componentes (Ogwu y Osawaru, 2016). En este trabajo, los componentes extraídos 1 y 2 explicaron el 87,03% de la muestra. Las similitudes y diferencias entre líquenes con respecto a las variables son visibles a través de las distancias entre muestras en el conocido como PCA *scores plot*. Mientras que el *loading plot* agrupó las variables según sus correlaciones, observándose como los ensayos TPC, ORAC y FRAP mostraban una correlación directa, e inversa al ensayo DPPH, permitiéndonos constatar claras diferencias entre *Dactylina artica* y los líquenes *Cetraria nivalis*, *Cetraria commixta*, *Cetraria crespoae*, *Tuckneraria ahtii*, *Nephromopsis pallescens* y *Cetraria ericetorum*, siendo el primero de ellos el de mayor poder antioxidante frente a líquenes con escasa actividad. Para la concreción en diferentes grupos para los líquenes que quedaron en una posición intermedia se aplicó el HCA, que permite la creación de un dendrograma que agrupa según similitudes, clasificando de manera visual las muestras, partiendo de toda la muestra completa de datos (Macias, 2021). De esta manera es claramente constatable que los líquenes con mayor poder antioxidante son aquellos conformados por el clúster 3 y el clúster 1. Es importante destacar la elevada distancia del líquen *D. arctica* respecto a los otros clústers, siendo además la más alejada a su vez en la clasificación filogenética, puesto que el género *Dactylina* constituye su propio subclado dentro del clado cetrariode (Divakar y col., 2017).

Por tanto, la aplicación de estos métodos de análisis resulta adecuado para el estudio de múltiples variables y de grandes cantidades de datos, aportando además una imagen visual de las muestras, y mejorando la información obtenida a través del cálculo de EAP o el análisis bivalente. De hecho, son muchos los trabajos que en la actualidad se acompañan de estas técnicas, especialmente en estudios de extractos naturales (Gidik, 2021; Altuntaş y col., 2023). Asimismo, esta forma de análisis y representación puede presentar ciertas limitaciones, ocasionado que ciertas muestras no se ajusten correctamente a la representación aportada. Para ello existen parámetros que miden la calidad de la representación como el \cos^2 . El análisis realizado demuestra valores bajos para *A. scholanderi*, *C. ericetorum* y *N. pallescens*.

Considerando los resultados obtenidos de la actividad antioxidante *in vitro*, se seleccionaron los extractos liquénicos de *D. arctica*, *N. stracheyi*, *T. americana* y *V. pinastri*, para el estudio de su potencial efecto citoprotector en un modelo celular de estrés oxidativo inducido por la administración exógena de H_2O_2 . Estos resultados se muestran en el **Capítulo 4** de la presente Tesis Doctoral, titulado **“Lichen Extracts from Cetrarioid Clade provide neuroprotection against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative stress.”**

Para la realización del estudio se seleccionó como modelo celular a las células de neuroblastoma humano **SH-SY5Y**. Esta línea celular dopaminérgica ha sido utilizada ampliamente como modelo *in vitro* en estudios de neurotoxicidad, neurofarmacología y neurodegeneración. A pesar de la aparición de nuevas líneas celulares neuronales, esta línea continua en uso como se evidencia en diversos estudios actuales, que utilizan células SH-SY5Y indiferenciadas para evaluar la acción neuroprotectora (Liu y col., 2019; Wu y col., 2018; Gallego y col., 2022). Debido a la actividad antioxidante *in vitro* demostrada, se decidió trabajar con un **modelo de estrés oxidativo** inducido por H_2O_2 . Esta molécula se encuentra implicada en diversos procesos de señalización celular, tanto entre células (paracrina) como dentro de las mismas (autocrina). Este proceso implica su paso a través de las membranas celulares y se lleva a cabo mediante mecanismos de difusión pasiva y facilitada por la aquaporina AQP8. (Bienert y col., 2007).

Dentro de las EROS, el peróxido de hidrógeno desempeña una importante función como segundo mensajero en el metabolismo redox, y está implicado en diversos procesos incluidos la respuesta defensiva frente a patógenos, la regulación autofágica, la adaptación a situaciones de hipoxia o la diferenciación celular (Sena y Chandel, 2012). Su concentración intracelular está estrictamente regulada, variando entre 1 y 100 nM, dependiendo del tipo celular. El aumento de sus concentraciones en la célula conduce a la acumulación de EROS, tanto de manera directa (H_2O_2) como indirecta (por la formación de otras EROS a partir de H_2O_2), que genera un estado prooxidante que daña orgánulos como la mitocondria y altera las funciones de biomoléculas como ADN, lípidos y proteínas induciendo a la muerte celular por apoptosis (Di Marzo y col., 2018).

Analizando los estudios que utilizan el H_2O_2 como inductor del estrés oxidativo, se observa una extensa variabilidad de concentraciones y tiempos utilizados. Son muchos los factores que condicionan esta situación, por lo que inicialmente se realizó una curva concentración H_2O_2 a los tiempos de 30 min, 1h, 4h y 24h (resultados no incluidos en el artículo), **seleccionándose la concentración de 250 μ M a 1h** de tratamiento. Comparativamente a las concentraciones fisiológicas, las dosis utilizadas en todos los ensayos son muy elevadas (del orden de 100-500 μ M). Esto podría deberse a su inestabilidad pudiendo ser la exposición a H_2O_2 menos intensa y prolongada de la esperada (Ransy y col., 2020).

En este punto de la discusión, se analizarán de manera conjunta los efectos del H_2O_2 a nivel celular, subcelular y molecular, evaluándose el daño sobre la viabilidad, orgánulos como la mitocondria, enzimas y biomoléculas, así como procesos celulares (**Capítulos 4 y 5**).

El tratamiento con la concentración de H₂O₂ y tiempo seleccionados causó el daño oxidativo esperado, tal y como se evidencia en la **pérdida de viabilidad** (alrededor del 40%) y en las **alteraciones en la morfología** y densidad celular. A nivel morfológico, las células sufrieron pérdida de neuritas y adoptaron un cuerpo celular más contraído. Esta pérdida de volumen celular es una característica propia de la apoptosis, sea cual sea el estímulo que la induzca y se relaciona con la alteración de las concentraciones intracelulares de iones (Bortner y Cidlowski, 2003). La confirmación de la inducción apoptótica se observó en el **Capítulo 5**, mediante el análisis de marcadores proapoptóticos, aumentándose el **ratio Bax/Bcl-2** y la expresión de la enzima **caspasa 3**, en la que se profundizará a lo largo de esta discusión.

Se evaluó entonces la **sobreproducción intracelular** de EROS tras la exposición a H₂O₂. Como ya ha sido ampliamente comentado, en las enfermedades neurodegenerativas, este desbalance redox producido de manera patológica es uno de los principales responsables del daño. El aumento en los niveles de EROS está estrechamente relacionado con la disfunción mitocondrial y ésta a su vez con la neurodegeneración. Estas especies reactivas dañan el mtDNA y la cadena de transporte mitocondrial aumentando paradójicamente su producción (Ghezzi y col., 2012). El tratamiento con H₂O₂ **disminuyó el potencial de membrana**, debido a la desregulación del sistema OXPHOS, lo que afectaría a la producción de ATP.

Asimismo, el ataque mediado por las EROS a los fosfolípidos que componen las membranas mitocondriales y a los transportadores, altera la permeabilidad de la membrana y la homeostasis del calcio (Guo y col., 2013). Este hecho se evidenció con un **aumento de los niveles de calcio citosólico y calcio mitocondrial tras la administración de H₂O₂**. El incremento en los niveles de calcio citosólico se debe al aumento en la entrada de este ion en la célula y a su salida del retículo endoplasmático, debido al estrés oxidativo.

Dado que las concentraciones citoplasmáticas de calcio están estrictamente reguladas, esta situación deriva en un aumento de la entrada de calcio mitocondrial (Ermak y Davies, 2002; Mattson y col., 2006). Este aumento induce la formación del mPTP liberándose Ca²⁺, factores apoptóticos y EROS al citoplasma (Madreiter-Sokolowski y col., 2020). La expresión de Bax, Bcl-2 y del efector caspasa 3, con los que se relacionó anteriormente la morfología apoptótica celular, se ven alterados por la activación de la apoptosis intrínseca mitocondrial, relacionándose ambas situaciones (**Capítulos 4 y 5**).

Por otro lado, otro de los procesos que se vio alterado por la administración exógena de H₂O₂ sobre las células es el **aumento de la peroxidación lipídica**, evaluado mediante el ensayo

de TBARS. Esto afectaría a las membranas celulares, aumentando la entrada ya comentada de calcio y la producción del radical peroxilo.

Siguiendo con la evaluación de los efectos del H₂O₂ en el modelo de estrés oxidativo neuronal establecido, es importante señalar cómo el sistema antioxidante endógeno de la célula también se ve alterado. Si bien concentraciones bajas de H₂O₂ pueden aumentar la actividad antioxidante como respuesta compensatoria, concentraciones más elevadas alteran la estructura y funcionalidad de las enzimas. En este trabajo, se observa una **disminución en la actividad total de la enzima SOD**, así como una **reducción en la expresión** de las enzimas **SOD-1** y de **SOD-2**, lo que implicaría la acumulación del radical O₂^{•-}. De igual manera se observó una **reducción en la actividad de la enzima CAT**, acompañada de una disminución no significativa de sus niveles, reduciéndose la transformación en moléculas no reactivas. Asimismo, los niveles del antioxidante no enzimático esencial en la célula **el GSH, están disminuidos**. El **GSH** participa en procesos de detoxificación mediados por las enzimas GPx y GST y en el reciclaje de los radicales formados por otros antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas C y E, recuperando sus formas activas. La depleción del GSH resulta perjudicial y se relaciona con la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas (Aoyama, 2022; Birben y col., 2012; Forman y col, 2009).

Por último, se evaluó el efecto del H₂O₂ sobre el proceso autofágico (**Capítulo 5**), estudiando de manera preliminar el efecto sobre la autofagia, mediante la evaluación de la expresión de LC3II, presente en la membrana de los autofagosomas, y directamente relacionado con su formación. La forma LC3-I citosólica al lipidarse forma LC3-II presente en las membranas externa e interna del autofagosoma. La evaluación de este marcador únicamente es insuficiente puesto que durante la etapa de fusión del autofagosoma con el lisosoma, la proteína LC3-II será degradada por las proteasas lisosomales. En este caso, al activar el flujo autofágico, se podría observar un menor nivel de LC3-II debido a su rápida degradación lisosomal y se infraestimaría el proceso. Por ello, se seleccionaron inhibidores lisosomales como NH₄Cl (neutraliza el pH ácido) e inhibidores de proteasas como la leupeptina, bloqueando la degradación lisosomal y por tanto la degradación de los autofagosomas. La diferencia observada entre el grupo con o sin inhibidor informará por tanto del flujo autofágico. Para tener un conocimiento completo de este proceso es necesario evaluar numerosas proteínas implicadas como ATG4, p62, S6 y Beclin-1, entre otras (Klionsky y col., 2021).

La selección del inductor de la autofagia 2-deoxi-D-glucosa se realizó en base a las *“Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)”* que recoge la regulación diferencial del proceso autofágico en neuronas y que destaca que los inhibidores

catalíticos de mTOR o la rapamicina no estimulan una respuesta autofágica sólida en cultivos primarios de neuronas o en células SH-SY5Y. Sin embargo, la interrupción del metabolismo de la glucosa, con el tratamiento con 2-deoxi-D-glucosa, sí induce la autofagia vía activación AMPK (Klionsky y col., 2021). Esta inducción fue claramente constatada en los resultados obtenidos.

Además, se pudo observar que las células SH-SY5Y, durante su proceso de crecimiento normal, muestran un nivel constitutivo de autofagia para el reciclaje adecuado de sus estructuras. Tratamientos con H_2O_2 **aumentaron la expresión de LC3II** probablemente debido a la actividad degradativa aumentada para la eliminación y reciclaje de las estructuras oxidadas y dañadas. Esta activación asociada a la toxicidad inducida por H_2O_2 se ha observado en múltiples estudios (Castino y col., 2011). Por otro lado, esta activación de la autofagia ha sido insuficiente para inhibir la apoptosis, como mostraron los valores de Bax/Bcl-2 y caspasa 3 para el H_2O_2 .

La conexión entre ambos procesos es compleja. Mientras que en ciertas ocasiones la autofagia sirve de mecanismo de adaptación al estrés oxidativo evitando la muerte celular, en otras puede actuar como un proceso alternativo de muerte, o una combinación de ambos. Se han identificado proteínas que participan en la regulación de ambos procesos. Por ejemplo, muchas de las proteínas autofágicas como Beclin-1, VSP24 o ATG4 son fragmentadas o inactivadas por caspasas (Gordy y He, 2012). En el caso de Beclin-1, su fragmentación induce la liberación del citocromo C mientras que en su longitud completa induce la autofagia. Asimismo, en la interconexión de estos dos procesos juega un papel importante la familia de las proteínas Bcl-2 (Lu y col., 2019). Por un lado, Bcl-2 impide la oligomerización de Bax y Bak y por tanto la formación del MPTP (inhibiendo la apoptosis) (Dlugosz y col., 2006); por otro lado, al formarse el complejo Beclin-1/Bcl-2, se impide la activación de la autofagia (Gordy y He, 2012). Ante situaciones de estrés oxidativo, este complejo se interrumpe activando la autofagia.

Si el estrés oxidativo persiste, esta respuesta autofágica no es suficiente para la supervivencia celular activándose la apoptosis. A la vista de los resultados la disminución de la formación del complejo Beclin-1/Bcl-2, dado los niveles reducidos de expresión de Bcl-2 en el tratamiento con H_2O_2 , aumenta la activación autofágica. La persistencia del daño hace que el equilibrio en este caso esté desplazado hacia la apoptosis como se evidencia en los niveles de Bax y caspasa 3.

Una vez evaluado cómo el H_2O_2 afecta a nivel celular, subcelular y molecular, se procede a analizar el efecto de pretratamientos de los cuatro extractos liquénicos seleccionados *D. arctica*, *N. stracheyi*, *T. americana* y *V. pinastris* durante 24h. Así, inicialmente, se evaluó la potencial actividad citoprotectora de concentraciones no citotóxicas de extractos frente al estrés oxidativo

inducido por H₂O₂. Si bien el pretratamiento con todos los extractos **augmentó la viabilidad celular comparado con aquellas células expuestas solo a H₂O₂**, los extractos de *Dactylina arctica* (10 µg/ml) y *Vulpicida pinastris* (5 µg/ml) destacaron frente a los extractos de *N. stracheyi* y *T. americana*. Los cambios morfológicos descritos, propios de un estado apoptótico, también se vieron parcialmente revertidos por los extractos de estos líquenes. Además, los valores de **EROS intracelulares disminuyeron**, en todos los extractos, especialmente para *Dactylina arctica*, revirtiendo el efecto del H₂O₂.

Pretratamientos con los extractos de estos líquenes revirtieron el daño oxidativo causado por el H₂O₂ sobre los marcadores de estrés oxidativo: peroxidación lipídica y niveles de GSH. Así, se destaca especialmente los extractos de *D. arctica* y *V. pinastris* que **redujeron de forma significativa los niveles de peroxidación lipídica**, mostrado a través de la reducción de la formación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico mediante el ensayo de TBARS. Este efecto es de especial importancia sobre todo a nivel del SNC, debido al alto número de PUFAs, con dobles enlaces susceptibles de oxidación. Estudios con cerebros *post-mortem* de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como la EA y la EP han mostrado presentar altos niveles de productos de peroxidación lipídica (Shichiri y col., 2014), por lo que su reducción es un efecto terapéutico fundamental. Además, se sugiere que los extractos de líquenes protegen frente a la alteración de la estructura y función de las membranas, lo que puede ser causada por la pérdida de fluidez, la inactivación de las enzimas membranales, la disminución de la permeabilidad de los iones y la disrupción de la membrana (Negre-Salvayre y col., 2010). Esta reducción de los niveles de EROS y peroxidación lipídica se correlaciona directamente con la restauración de los niveles de GSH (Angelova y col., 2021).

En el presente trabajo, los niveles de glutatión reducido **augmentaron de forma significativa** con los pretratamientos de los líquenes *D. arctica* y *V. pinastris*, siendo especialmente mayor la recuperación para *D. arctica*. Es importante recordar que esta molécula, en su forma reducida, no sólo actúa como captador de radicales libres debido al grupo tiol presente en su cisteína, sino que además es sustrato de las enzimas antioxidantes GPX y GST (Leong y col., 2016).

La actividad de las enzimas SOD y CAT está reducida en cerebros *post mortem* de pacientes de edad avanzada (Salminen y col., 2014). Por ello, a nivel enzimático, una de las estrategias terapéuticas para hacer frente al estrés oxidativo consiste en inducir el sistema antioxidante endógeno. En el **Capítulo 4**, pretratamientos con los extractos de los líquenes aumentan de forma significativa la **actividad** de estas enzimas a excepción de *N. stracheyi* para SOD. En el Capítulo 5 se valora si esta regulación al alza de la activación se correlaciona con el aumento de su expresión.

Como se presentó en el **Capítulo 1**, el estudio de los líquenes en este campo es limitado. A pesar de ello otras especies de la familia Parmeliaceae como *Xanthoparmelia conspersa*, *Xanthoparmelia camtschadalis*, *Cetraria islandica*, *Vulpicida canadensis* e *Hypotrachyna formosana* han mostrado reducir la producción de EROS y los niveles de peroxidación lipídica, así como aumentar los niveles de glutatión reducido y la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx y GR (de Paz y col., 2010; Fernández-Moriano y col., 2015; Sieteiglesias y col., 2019).

En las enfermedades neurodegenerativas es característica la disfunción mitocondrial. El daño inducido por las EROS en la mitocondria deriva en una mayor producción de los mismos y en alteraciones en la homeostasis del calcio y en su potencial de membrana. En nuestro estudio sólo *V. pinastri* y *D. arctica*, fueron capaces de revertir significativamente el daño y disfunción mitocondrial inducido por el peróxido de hidrógeno mediante la **reducción de los niveles de calcio citosólico y mitocondrial y la restauración parcial del potencial de membrana**. Ningún extracto líquénico había sido anteriormente evaluado por sus efectos sobre la función mitocondrial. Estudios previos sí habían confirmado la reducción del daño de la membrana y el mantenimiento de la homeostasis del calcio para los compuestos líquénicos ácido evérnico y ácido úsnico, este último identificado en las especies de *D. arctica* y *V. pinastri* (Fernández Moriano y col., 2017). Asimismo, estos resultados están en consonancia con otros estudios publicados para extractos de plantas como *Physalis peruviana* L. o *Moringa oleifera* Lam. ricas en polifenoles (Areiza-Mazo y col., 2018; González Burgos y col., 2021).

En definitiva, se sugiere que la reducción de EROS se atribuye, al menos en parte, al efecto inductor del sistema antioxidante endógeno y al efecto directo de sus moléculas como captadores de radicales. De los cuatro extractos evaluados, *V. pinastri*, *D. arctica*, y *T. americana* redujeron la sobreproducción de EROS y aumentaron la actividad enzimática de SOD y CAT. Además, las especies de líquenes *V. pinastri* y *D. arctica*, ejercieron directamente su acción sobre la mitocondria, atravesando la membrana mitocondrial, y actuando así sobre la fuente principal de EROS.

Evaluando en conjunto los resultados, se descartó continuar profundizando con el estudio del extracto de *N. stracheyi*, al no resultar de interés farmacológico. Para los otros tres extractos de líquenes que han resultado activos, se procedió a su caracterización fitoquímica mediante HPLC-UV. Los principales compuestos identificados en *V. pinastri* fueron el ácido úsnico, el ácido pinástrico y el ácido vulpínico, en *D. arctica* fueron el ácido girofórico, el ácido lecanórico y el ácido úsnico, y en *T. americana* fue el ácido alectorónico. Este último ya había mostrado actividad anticolinesterásica en el **Capítulo 3**, pero los valores obtenidos para el extracto que contiene este

metabolito secundario no resultaron significativos para todos los marcadores de estrés oxidativo analizados, mostrando una activación parcial de la respuesta antioxidante protectora.

Estructuralmente, estos metabolitos secundarios identificados se clasifican en diversos grupos químicos según su origen biosintético. En base a la revisión realizada en el **Capítulo 1**, estos compuestos se clasificaron atendiendo a este criterio, con el fin de analizar los distintos estudios de estructura-actividad presentes en la literatura científica.

En primer lugar, el ácido alectorónico presente en *T. americana* es una depsidona, sin anillo de butirrolactona, a la que se le atribuye una mayor capacidad de donación del átomo de hidrógeno (Lohézic-Le Dévéhat y col., 2007). Este hecho se correlaciona con su elevado valor de ORAC, presentado en el **Capítulo 2**. Además, se le atribuye una buena capacidad eliminadora de radicales hidroxilo y anión superóxido (Bay y col., 2020).

Por otro lado, las propiedades antioxidantes de *V. pinastri* se atribuyen principalmente a la presencia del ácido vulpínico y del ácido pinástrico. Estos ácidos tienen un anillo butanolida que contiene un grupo -OH en la posición 4 y una función ácido carboxílico en el doble enlace, el cual contribuye a la estabilización de los radicales. Estudios de relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR) combinados con análisis multivariante han demostrado la capacidad antioxidante de los ácidos pulvínicos (Le Roux y col., 2011; Ahmadi y col., 2021)

En el caso de *D. arctica*, sus compuestos mayoritarios fueron los dépsidos ácido girofórico y ácido lecanórico. Su poder antioxidante se atribuye a sus anillos aromáticos y a la presencia de grupos carboxilos e hidroxilos que les permiten interactuar con varios sitios activos enzimáticos (Manojlovic y col., 2012; Mohammadi y col., 2021)

Cabe destacar que las especies más activas, presentan en su composición ácido úsnico, el cual demostró capacidad reductora en ensayos de cationes radicales DPPH, ABTS y DMPD, y capacidad para eliminar radicales superóxido y peróxido. Además, se le atribuye habilidad como quelante de metales, incluido el ion Fe^{2+} debido a la presencia de un anillo fenólico con grupos funcionales de -CO, -COH y -COOH (Hoa y col., 2020; Cetin y Gulcin, 2019).

Tras relacionar los efectos observados con las estructuras identificadas en los extractos, se procedió a profundizar en el estudio del compuesto mayoritario presente en *D. arctica* (el tridépsido ácido girofórico) en el mismo modelo de **estrés oxidativo** aplicado con los extractos con el fin de conocer el papel que desempeña en la respuesta neuroprotectora. *D. arctica* demostró ser el líquen más activo de entre los seleccionados.

Este estudio se ha desarrollado en el **Capítulo 5** que lleva por título **“Neuroprotective effects and blood barrier permeability of the lichen tridepside gyrophoric acid”**.

Las propiedades antioxidantes de los extractos de líquenes observadas en el **Capítulo 2** de la presente Tesis Doctoral para *D. arctica* (valor ORAC 8,2 $\mu\text{mol ET/mg}$ de extracto seco, valor DPPH IC_{50} 346,3 $\mu\text{g/ml}$ y valor FRAP 29,6 $\mu\text{mol de Fe}^{2+}$ eq/g de muestra) pueden atribuirse a las propiedades antiradicales ya demostradas en la literatura científica para el ácido girofórico (valores DPPH entre IC_{50} 25 y 105 $\mu\text{g/ml}$ o valores de actividad anti radical anión superóxido de IC_{50} 196,62 $\mu\text{g/ml}$) (Kosanich y col., 2013; Lohézic-Le Dévéhat y col., 2013). Además, la estructura fenólica con cuatro grupos hidroxilo se correlaciona directamente con su capacidad antioxidante (Platzer y col., 2022).

Siguiendo el esquema de evaluación de la actividad neuroprotectora de los extractos, pretratamientos con concentraciones no citotóxicas de ácido girofórico mostraron **aumentar la viabilidad celular tras la exposición a H_2O_2** (a partir de la concentración de 25 μM hasta 100 μM) y **reducir la producción intracelular de EROS con un patrón concentración dependiente**. Esta reducción llegó a revertir el efecto del H_2O_2 de manera completa puesto que se obtuvieron valores similares al control y al compuesto de referencia Trolox®. El Trolox® es un análogo hidrosoluble de la vitamina E que destaca por sus propiedades antioxidantes (Giordano y col., 2020). Además, los cambios en la morfología y densidad de células observados con el pretratamiento del extracto metanólico de *Dactylina arctica*, fueron también apreciados con el pretratamiento con el ácido girofórico.

Asimismo, en este capítulo, se abordó el efecto del ácido girofórico sobre los niveles de expresión de enzimas del sistema antioxidante endógeno de la célula como SOD-1, SOD-2, CAT y GR. Además de las propiedades antioxidantes derivadas de su estructura fenólica, ya comentada previamente, existe una importante evidencia científica sobre los efectos protectores de los compuestos naturales inducidos por la activación de la expresión de elementos antioxidantes (Smith y col., 2016). El **ácido girofórico demostró incrementar la expresión de las enzimas SOD-1, SOD-2, CAT y GR a concentraciones elevadas**. Este incremento fue especialmente significativo para SOD-2. El papel de esta enzima es particularmente importante dada la localización mitocondrial de esta isoforma y la implicación de la disfunción mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas. Esta isoforma se encuentra situada en la matriz mitocondrial, catalizando la transformación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , el cual difundirá al citoplasma reduciendo su acumulación en la matriz mitocondrial (Flynn y Melov, 2013). Deficiencias o mutaciones en genes que codifican para las enzimas SOD-1 y SOD-2 se relacionan estrechamente

con la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas (Lee y col., 2020). Por otro lado, el incremento observado en la enzima CAT es esencial debido a su implicación en el mantenimiento del balance redox ya que cataliza la transformación del H₂O₂ y de diversos peróxidos en agua. Esta enzima destaca por su eficiencia, no saturable por ninguna concentración de H₂O₂ (Fita y Rossmann, 1985). En el caso de la enzima GR, el aumento de sus niveles sugiere un reciclaje más efectivo del antioxidante endógeno más importante de la célula, el GSH. Estos resultados se relacionan con los efectos observados para el extracto de *Dactylina arctica*, en el **Capítulo 4** de esta Tesis Doctoral, sugiriéndose que el ácido girofórico es uno de los principales responsables de la actividad de este extracto. De esta manera, el aumento en la expresión de las enzimas SOD y CAT está estrechamente ligado al incremento de su actividad observado para el extracto de *D. arctica*. De igual manera el aumento de los niveles de GSH tras el pretratamiento con el extracto se correlacionaría con el incremento de la enzima GR, en extracto y compuesto activo frente al daño oxidativo ejercido por H₂O₂.

La activación del sistema antioxidante endógeno es inducible. El papel de la vía Nrf2/ARE en la modulación de la expresión del elemento de respuesta antioxidante, una secuencia específica relacionada con enzimas detoxificantes, ha sido ampliamente demostrado. Esta secuencia codifica genes como NQO1, HO-1, Trxs, GST, GR, SOD1 y GPx (Buendía y col., 2016). En la literatura científica, otros compuestos liquénicos como el ácido evérnico, el ácido fumarprotocetrárico y el ácido úsnico han mostrado su efecto neuroprotector mediante la inducción del sistema antioxidante endógeno, sugiriéndose una activación parcial de la vía Nrf2 como responsable (Fernández-Moriano y col., 2017a; Fernández-Moriano y col., 2017b). Por lo tanto, dada la similitud estructural con el pépsido ácido evérnico, es plausible que la actividad del ácido girofórico esté mediada a través de la vía Nrf2. No obstante, otras vías como NF- κ B, PI3K/AKT y MAPK también están implicadas en la respuesta al estrés oxidativo, siendo necesarios nuevos estudios acerca de los mecanismos responsables de los resultados observados (Liu y col., 2022a).

Por otro lado, la apoptosis y la autofagia se presentan como dos procesos fisiológicos esenciales en la homeostasis celular y en la promoción de la salud neural (Ghavani y col., 2014). De hecho, durante la neurodegeneración, las vías apoptótica y autofágica se encuentran desreguladas. La mitocondria constituye el enlace entre ambos procesos y con ellos, el estrés oxidativo.

Analizando los efectos sobre la apoptosis, el **ácido girofórico demostró reducir el ratio Bax/Bcl-2, disminuyendo la expresión del factor proapoptótico Bax y aumentando los niveles**

de Bcl-2. En situaciones fisiológicas, Bax se encuentra en el citoplasma, su activación lleva a su oligomerización e inserción de este en el MPTP de la membrana mitocondrial externa, siendo esencial en el inicio de la apoptosis intrínseca mitocondrial. La reducción de EROS, dada la actividad del ácido girofórico como captador de radicales y su implicación en la activación del sistema endógeno, limitará la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana mitocondrial y por tanto la desregulación del potencial de la membrana mitocondrial, así como la alteración de la homeostasis del calcio, reduciendo por tanto la activación apoptótica. Este hecho también se observa con la **reducción de la expresión de la enzima caspasa 3**, principal efector de la apoptosis, ya que al activarse actúa escindiendo proteínas estructurales y proteínas implicadas en el ciclo celular que llevan a la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, y por tanto a la muerte celular (Porter y Janike, 1999).

A lo largo de este trabajo, la disfunción mitocondrial ocasionada por la sobreproducción de EROS se presenta como la principal responsable de la muerte celular. Como se ha explicado anteriormente, la autofagia se presenta como un mecanismo de supervivencia al estrés celular frente a la apoptosis. Los resultados obtenidos para el **ácido girofórico mostraron la activación de esta vía tanto en células tratadas solamente con el compuesto como en aquellas expuestas al peróxido de hidrógeno.** Esto se ha observado tras el bloqueo lisosomal con NH_4Cl y leupeptina, ya que, en ausencia del inhibidor, la degradación de LC3-II fue acusada. Este hecho es indicativo del flujo autofágico. A la vista de los resultados obtenidos se sugiere que el daño producido por el H_2O_2 podría ser parcialmente reducido vía activación del proceso autofágico frente a la inhibición apoptótica. Esta activación de la autofagia inducida por el ácido girofórico también podría desempeñar un papel esencial en el aclaramiento de agregados proteicos anómalos, propios de las enfermedades neurodegenerativas estudiadas. Se propone así la utilización de nuevos modelos de neurodegeneración para valorar el efecto del ácido girofórico sobre otro mecanismo neuropatogénico característico.

Por tanto, el ácido girofórico demostró mejorar la viabilidad y los cambios morfológicos, así como reducir la producción intracelular de EROS en el modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno. La inducción de la respuesta antioxidante endógena (mediante el aumento de los niveles de enzimas antioxidantes) y la potenciación de la autofagia frente a la apoptosis como respuesta de supervivencia celular se presentan como mecanismos implicados en la neuroprotección.

Comparando los resultados obtenidos para el extracto y el compuesto puro, el ácido girofórico, potencial responsable de la acción neuroprotectora del líquen, presenta mayor

actividad que el extracto de *D. artica* a las concentraciones más altas ensayadas. A pesar de ello, a diferencia del tratamiento con el ácido girofórico, los efectos protectores del extracto se observaron en un rango bajo de concentraciones (5-10 µg/ml), sugiriendo un **posible efecto sinérgico** entre los compuestos que lo conforman. A través de la identificación por HPLC-UV, también se detectó la presencia del ácido úsnico, cuyo potencial antioxidante ya ha sido demostrado en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Fernández Moriano y col., 2017). La citotoxicidad demostrada por el extracto metanólico de *D. arctica* también se correlaciona con la observada para el ácido úsnico en el **Capítulo 3** de esta Tesis Doctoral, existiendo diferencias significativas frente al control a partir de valores de concentración de 10 µM. Por otro lado, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han revelado mayores actividades para los extractos liquénicos que para los compuestos liquénicos aislados (Studzińska-Sroka y col., 2015).

En relación con los escasos estudios que evalúan la actividad neuroprotectora de los líquenes, tanto de sus extractos como de sus componentes aislados, hay que destacar que no sólo se ha abordado desde su perfil antioxidante, sino que se han aplicado diversos modelos de neurodegeneración atendiendo a diferentes etiologías. Entre ellos se incluyen modelos *in vitro* de la enfermedad de Parkinson inducido por MPTP o rotenona, modelos de ELA inducidos por L-BMAA y modelos de la enfermedad de Alzheimer inducida por el péptido β-amiloide en lo que se ha demostrado el efecto neuroprotector de compuestos procedentes de líquenes empleando tanto líneas celulares (PC-12, SH-SY5Y o Neuro2a) como cultivos primarios de neuronas. Este es el caso del ácido evérnico, el ácido isolecanórico, el ácido protocetrárico, el ácido lecanórico, la zeorina o la biruloquinona (Lee y col., 2021; de Pedro y col., 2015; Mapari y col., 2021; Luo y col., 2013).

Las enfermedades neurodegenerativas, así como el daño post accidente isquémico cerebral llevan asociado una pérdida estructural y funcional de las sinapsis. El sistema nervioso se ve afectado a distintos niveles, desde la propia sinapsis hasta los circuitos locales y las complejas redes neuronales superiores. Este daño neuronal se ve reflejado en la retracción de neuritas y pérdida de las sinapsis, así como en la alteración electrofisiológica y en las vías de señalización celular (Bredesen y col., 2006). La promoción de la neuritogénesis, sinaptogénesis y el crecimiento axonal a través del uso de compuestos neuromoduladores supone una estrategia neuroprotectora para el tratamiento del daño descrito.

Por ello y continuando con el concepto de compuesto multidiana, se ha profundizado en el estudio de los efectos del ácido girofórico evaluándose sus características neuromoduladoras y neurorestaurativas que pueden contribuir a la respuesta neuroprotectora observada (**Capítulo 5**).

Como se ha comentado en la sección de Introducción (punto 1.3.3.1), durante las últimas décadas se han descrito extensamente biomarcadores validados que permiten valorar el efecto modulador de los tratamientos neurofarmacológicos. Mientras que el marcador NeuN se relaciona con el desarrollo del tejido y diferenciación neuronal, GAP43 y la sinaptofisina están relacionados con la plasticidad sináptica. GAP43 está implicado en el crecimiento axonal, el crecimiento neuronal presináptico y la neurogénesis, mientras que la sinaptofisina está implicada en la formación de las sinapsis (Reddy y Abeygunaratne, 2022).

El ácido giróforico ha demostrado **aumentar la expresión de los marcadores neuronales NeuN, GAP43 y sinaptofisina**, tras 24 horas de tratamiento. Cabe destacar que para NeuN y GAP43, los valores fueron superiores a los tratamientos con ácido retinoico, utilizado como compuesto de referencia. Esto sugiere una maduración neuronal más adecuada que la observada para el ácido retinoico. Además, en pacientes que sufren las enfermedades neurodegenerativas EA, EH, EP y ELA, la expresión de estos marcadores se encuentra disminuida (Chung y col., 2020).

Asimismo, se valoró el efecto modulador del ácido giróforico sobre la fosforilación de la **proteína tau**. Aunque en un primer momento este hecho pueda resultar contradictorio ya que su hiperfosforilación se correlaciona con la agregación amiloide propia de la EA, esta proteína está implicada en el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos con la tubulina y es necesaria para el crecimiento axonal (Fuster-Matanzo y col., 2012). El aumento de la expresión de p-tau no se ha asociado a daño celular, tal y como evidencian los ensayos de citotoxicidad y producción de EROS. Además, la morfología de las células SH-SY5Y observada mediante microscopía confocal reveló leves cambios propios de la diferenciación. De esta manera, se ha sugerido que el ácido giróforico está implicado en **la modulación del crecimiento axonal al actuar sobre la expresión de p-tau y GAP43** (en ambos casos mayor para la concentración de 25 μ M que para la concentración de 50 μ M).

Este estudio mediante el análisis de diferentes biomarcadores de neurodiferenciación es novedoso, puesto que ningún extracto liquénico o metabolito secundario ha sido evaluado a través de estos métodos. A pesar de ello, este enfoque sí fue aplicado por Reddy y colaboradores que demostraron la actividad neurogénica y neurotrófica de la depsidona ácido fisódico y de los dépsidos atranorina y ácido perlatólico mediante la modulación de la expresión génica de BDNF y NGF en modelos *in vitro* y *ex vivo* (Reddy y col., 2016).

Se sugiere, por tanto, que el ácido girofórico además de su actividad antioxidante neuroprotectora, ejerce su acción interviniendo en la modulación de procesos esenciales a niveles sináptico como el crecimiento axonal y la sinaptogénesis, implicados en la plasticidad neuronal.

Finalmente, una vez evaluada su actividad neuroprotectora, se consideró determinante el estudio de uno de los mayores obstáculos a los que se enfrenta el desarrollo de neurofármacos en la industria farmacéutica que es el paso de compuestos a través de la barrera hematoencefálica. Como se ha expuesto tanto en la sección de la introducción de esta tesis Doctoral como a lo largo de esta discusión, el número de moléculas potencialmente activas frente a enfermedades neurodegenerativas es elevado. Sin embargo, la BHE constituye una barrera física, bioquímica y metabólica, que separa el tejido cerebral de la circulación sanguínea y que es altamente selectiva a la entrada de sustancias (Abbot y col., 2010). Esta barrera restringe el paso de más del 98% de los fármacos de pequeño tamaño y el 100% de las moléculas grandes (Pardridge y col., 2020).

El alto coste tanto económico como laboral que implica la realización de estudios *in vivo* en los que se evalúen las características farmacocinéticas de los compuestos dirigidos al SNC, sumado a la escasa traslación de los resultados a modelos humanos, ha conducido al desarrollo en paralelo de modelos *in vitro* de BHE que permiten un cribado temprano de potenciales fármacos (Naik y Cuccullo, 2012). Cabe destacar que más del 80% de los fármacos que han resultado ser eficaces en modelos animales no han sido posteriormente efectivos en ensayos clínicos, lo que se relaciona con las diferencias animal-humano en términos de expresión de proteínas determinantes, así como con la metodología de trabajo (van der Helm y col., 2016). Por ello, el diseño de múltiples modelos *in vitro* de BHE robustos, es una potente línea de investigación actual, con el desarrollo de modelos 2D (tanto en monocultivo como cocultivo), modelos organoides y modelos basados en el uso de dispositivos microfluídicos (Chaulagain y col., 2023). En estos modelos se podrán evaluar los distintos tipos de transportes descritos (transporte paracelular, difusión pasiva, difusión facilitada, transporte activo de entrada y de salida, transporte mediado por receptor o transcitosis mediada por adsorción). Además, también resultan de gran utilidad para evaluar la neurotoxicidad de fármacos dirigidos a otras dianas y sistemas (Schultz y col., 2015).

En el campo de los productos naturales, durante muchos años, el desarrollo de trabajos *in vitro* e *in vivo* que evaluaran la capacidad de paso a través de la BHE, han sido limitados. Actualmente este número se está viendo incrementado puesto que es considerado requisito indispensable en la mayoría de los estudios de neuroprotección. Triterpenos como el ácido asiático o el asiaticósido, aislados de *Centella asiatica* (L.), la benzoquinona embelina aislada de

Embelia ribes Burm, mono- y sesquiterpenos, fitoesteroles y compuestos fenólicos presentes en bioproductos de *Robinia pseudoacacia* L., *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn, *Coffea arabica* L., *Olea europaea* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck o microalgas *Dunaliella salina* Teod. han sido evaluados recientemente en modelos celulares (Hanapi y col., 2021; Bhuvanendran y col., 2019; Sánchez-Martínez y col., 2022).

Los estudios farmacocinéticos utilizan herramientas *in silico*, previo al uso de modelos celulares, que permiten establecer modelos predictivos en términos de difusión pasiva. Existen toda una serie de parámetros fisicoquímicos y descriptores moleculares que se correlacionan con la permeabilidad de los compuestos (Abbot y col., 2010). Asimismo, en la literatura científica se encuentran una serie de reglas preestablecidas de gran utilidad a la hora de orientar sobre el comportamiento de una molécula (Lipinski, 2001). Estas reglas no deben ser entendidas como dogma, puesto que, en muchos casos, al no valorar todos los tipos de transportes (sólo la difusión pasiva) puede llevar a infraestimar fármacos potenciales (Meng y col., 2021).

En la presente Tesis Doctoral se ha hecho uso de las herramientas bioinformáticas (programa Molinspiration y software ADMETlab 2.0) para obtener los diferentes parámetros fisicoquímicos e indicadores ADME y de toxicidad para el ácido girofórico. En primer lugar, se han valorado sus propiedades fisicoquímicas de forma conjunta con las “reglas” existentes en la literatura. Los parámetros seleccionados fueron LogP, peso molecular, TPSA, y número de enlaces donadores y aceptores de hidrógeno. A través del **LogP** se valoró la lipofilia de la molécula, que es directamente proporcional al paso a través de la BHE, hasta valores máximos puesto que una lipofilia muy elevada podría relacionarse con su retención por la propia BHE (Youdim y col., 2003). Por otro lado, los demás parámetros son inversamente proporcionales a su paso. El **peso molecular** se establece en valores máximos de 400, 500 o 600 Da según distintos trabajos (Lipinski, 2001; Banks, 2009; Levin y col., 1980). Para la **TPSA**, definida como la suma de las contribuciones superficiales de los átomos polares de una molécula, se estiman los límites en torno a 60 Å² y 90 Å² (Begley, 2004). Asimismo, la **capacidad de formar enlaces de hidrógeno** con el agua se asocia a su hidrofilia, y por tanto un número elevado de enlaces afecta a su paso a través de la BHE, considerándose aceptables hasta 5 átomos donadores de enlaces de hidrógeno (nHD) y 10 aceptores (nHA) (Lipinski y col., 2001). La **carga** electrostática también supone una limitación en el paso de BHE, así como la **flexibilidad** de la molécula representada a través del número de enlaces rotables (nRot) (Mikitsh y Chacko, 2014). **Para el ácido girofórico los valores obtenidos fueron logP de 4,97-5,38, peso molecular de 468,41 Da, nHA de 10, nHD de 5, nRot de 7 así como TPSA de 170,82 Å².**

Estos parámetros no son evaluados de manera aislada, sino que se consideran conjuntamente gracias a la existencia de las reglas previamente mencionadas, entre las cuales destaca la regla de Lipinski o regla de los 5. Dicha regla establece límites para la difusión pasiva en 500 Da, LogP 5, nHD de 5 y nHA de 10 (Lipinski y col., 2001). Siguiendo esta regla, el ácido girofórico cumple con los requisitos, aunque se encuentra cerca de los límites establecidos. No obstante, al aplicar otras reglas como la de Hitchcock, que establece que valores de TPSA mayores a 90 Å² son poco permeables, el ácido girofórico no atravesaría la BHE por difusión pasiva (Hitchcock, 2008).

Revisando la literatura científica, la evaluación del paso de los compuestos liquénicos es escasa. Este hecho es comprensible puesto que los trabajos sobre el potencial neuroprotector de los mismos son recientes. Entre los estudios publicados para líquenes que evalúan su capacidad para atravesar la BHE, ninguno ha empleado hasta el momento un modelo celular, sino que han utilizado el sistema PAMPA-BHE. Este método mide la permeabilidad de las sustancias través de una membrana lipídica. Estudios de Studzińska-Sroka han demostrado que tanto el ácido fisódico aislado como el presente en el extracto tiene altos valores de permeabilidad. Asimismo, se ha evaluado la permeabilidad de otros compuestos liquénicos como el ácido evérnico con un valor de permeabilidad efectiva de $8,6 \pm 0,4 \times 10^{-6}$ cm/s a las 4h y del ácido úsnico con valores de $92,8 \pm 6,3 \times 10^{-6}$ cm/s a la hora de incubación (Studzińska-Sroka y col., 2021b; Studzińska-Sroka y col., 2021c). Estos resultados demuestran la potencial capacidad de paso de los compuestos liquénicos a través de la BHE.

Partiendo de los estudios *in silico* llevados a cabo, de los resultados presentes en la literatura científica y teniendo en cuenta, que la difusión pasiva no es el único tipo de transporte a través de la BHE, se decidió aplicar dos modelos *in vitro* celulares tanto de endotelio cerebral de rata (RBE4) como de endotelio microvascular de cerebro humano (hCMEC/D3), para los estudios de captación y permeabilidad, respectivamente. El uso de diferentes modelos de rata y humano también ha permitido constatar las diferencias interespecies. La citotoxicidad del ácido girofórico ha sido evaluada en ambas líneas sin diferencias significativas frente al control para todas las concentraciones ensayadas.

En nuestro trabajo se ha empleado un modelo 2D monocultivo. Encontrar un modelo adecuado, que presente características fisiológicas similares a la BHE es una tarea compleja. Actualmente se utilizan células primarias, células madre o células inmortalizadas. El coste y el trabajo que requieren las dos primeras ha conducido al uso más frecuente de las células inmortalizadas (Chaulagain y col., 2023). Se han utilizado más de 35 tipos de células

inmortalizadas, entre las que destacan las líneas hCMEC/D3, RBE4 y células de endotelio microvascular de cerebro de rata bEnd.3, siendo las dos primeras las seleccionadas para este estudio (Rahman y col., 2016).

Como se ha descrito en la introducción, las células endoteliales que componen la unidad neurovascular presentan características propias, entre las que se destaca la existencia de uniones estrechas y la expresión de una serie de transportadores específicos (Tajes y col., 2014). La línea celular hCMEC/D3 expresa las proteínas que conforman las uniones estrechas y adherentes (claudinas, ocludinas, JAMs, cateninas y cadherinas), mientras que en el caso de las células RBE4, la variedad de expresión de estas es más limitada y por tanto la formación de las uniones también lo será (Rahman y col., 2016). Además, Poller y colaboradores demostraron una correlación entre los resultados de permeabilidad *in vitro* y los modelos *in vivo* para el modelo celular hCMEC/D3 (Poller y col., 2008). Por ello se seleccionaron las células hCMEC/D3 para el estudio de permeabilidad. También es esencial la expresión de los transportadores tanto de entrada (SLC) como de salida (P-gp, MRP y BCRP). Morris y colaboradores revisaron la expresión y localización de estos transportadores en los diferentes métodos *in vitro* utilizados, encontrando diferencias entre especies tanto cuantitativamente como diferencias de isoformas (Morris y col., 2017).

Para validar el modelo utilizado en los ensayos de permeabilidad es necesario establecer la integridad de la monocapa formada. Esta se confirma con la medida de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER), que indica la formación de las uniones estrechas establecidas entre células. Asimismo, se comprueba el paso del compuesto Lucifer Yellow, compuesto hidrofílico capaz de permear por vía paracelular. Los valores obtenidos para ambos parámetros se han encontrado dentro de los rangos establecidos en la literatura para esta línea celular (Rahman y col., 2016). Esta información se detalla en el apartado de Material y Métodos del **Capítulo 5** de la presente Tesis Doctoral.

Los estudios de **captación por las células RBE4** mostraron que el ácido girofórico es captado de forma **concentración tiempo dependiente**. Se puede observar a su vez como, a altas concentraciones, la captación es saturable. El cálculo de las eficacias demostró valores muy bajos de acumulación. A pesar de las diferencias con la línea hCMEC/d3, utilizando las eficacias de captación y sumado a la máxima concentración detectada, se seleccionó la concentración 100 μM y el tiempo de 24h como las concentraciones y tiempos óptimos para el ensayo de permeabilidad.

Por otro lado, los ensayos de **permeabilidad** mostraron un valor de P_{app} de $6,37 \pm 0,02 \times 10^{-6}$ cm/s con valores inferiores a 2 en el ratio de eflujo. Esto indica que predomina el transporte de entrada frente al de salida y por tanto existe **poca probabilidad de que el ácido girofórico sea**

sustrato de transportadores ABC como **P-gp** (Liu y col., 2022b). Este dato se relacionó con los estudios *in silico* realizados con el software ADMETlab 2.0, que indicaba poca probabilidad de ser tanto inhibidor de P-gp como su sustrato. En estudios con compuestos naturales, permeabilidades superiores a 3×10^{-6} cm/s se corresponden con una permeación efectiva (Madgula y col., 2010). Por ello, este ensayo sugiere que el ácido girofórico es **capaz de atravesar la BHE** para poder desempeñar sus funciones neuroprotectoras. El uso del propranolol, marcador transcelular utilizado por su alta permeabilidad por difusión pasiva y por tanto control positivo, permitió definir la permeabilidad del ácido girofórico como moderada. En este caso, si se compara con los resultados *in silico* que indicaban baja permeabilidad, el ensayo *in vitro* presentó diferencias.

A pesar de ser capaz de alcanzar el SNC, la eficacia de paso fue del 60,86%. Este hecho habrá que tenerlo en cuenta a la hora de establecer la dosificación de este compuesto en el modelo *in vivo* ya que son muchas las barreras biológicas que tendrá que atravesar, con la consecuente pérdida de paso en cada una de ellas y la elevada la dosis a la que el compuesto ha mostrado efectos neuroprotectores. Aumentar la eficacia de transporte mediante el uso de nanopartículas o liposomas puede resultar esencial para conseguir una mayor disponibilidad a nivel del parénquima cerebral (Lombardo y col., 2020).

Por tanto, dadas las características definidas con herramientas *in silico*, y los resultados para compuestos liquénicos observados mediante la técnica PAMPA-BHE, se puede sugerir que el **ácido girofórico utiliza como una de las formas de transporte principales la difusión pasiva**. Sin embargo, las diferencias entre el ensayo de captación y el ensayo de permeabilidad, realizado en dos modelos diferentes podría sugerir la implicación del transporte activo. De hecho, estudios recientes proponen la participación de transportadores activos en el paso de BHE de compuestos fenólicos naturales (Sánchez-Martínez y col., 2022).

Además, estos resultados fueron un claro ejemplo del problema de translación de eficacias al que se enfrenta la industria farmacéutica con la selección del modelo animal óptimo. En la actualidad, los modelos *in vitro* más prometedores para la neurofarmacología son aquellos que utilizan células madre pluripotenciales o células madre embrionarias humanas, ya que se busca una mayor similitud fisiológica con la BHE humana (Chaulagain y col., 2023).

Por último, una vez evaluado su potencial efecto neuroprotector y su permeabilidad a través de la membrana, se decidió ampliar el estudio *in silico*, mediante el uso de herramientas informáticas, para analizar las propiedades ADMET (Xiong y col., 2022). En este trabajo se puso el foco en parámetros relacionados con la absorción y la toxicidad.

En el campo de los compuestos de origen natural, uno de los principales desafíos a los que se enfrentan tanto los estudios *in vivo* como los ensayos clínicos, es la baja biodisponibilidad y la biotransformación (Hu y col., 2022). Estudios de fase I demostraron que, para una dosis de curcumina de 3,6 g al día, los niveles plasmáticos detectados fueron de 11,1 nmol/L (Sharma y col., 2004). Los compuestos polifenólicos, a pesar de sus ya demostradas actividades biológicas, presentan una baja disponibilidad atribuida a factores como la interacción con la matriz alimentaria, el metabolismo hepático de fases I y II, el metabolismo intestinal y los efectos de la microbiota (Di Lorenzo y col., 2021). Los resultados obtenidos para el **ácido girofórico muestran un perfil moderado de absorción**, evaluado a través de diversos parámetros como la permeabilidad de las células renales caninas de Madin-Darby (MDCK) y la absorción intestinal humana (AIH). Además, se demostró que existe una probabilidad muy baja de que este compuesto sea sustrato de la P-gp, como se evidenció en el ensayo de permeabilidad a través de la BHE. En cuanto al valor de LogS, relacionado con la solubilidad del compuesto, éste se encuentra dentro de los rangos preestablecidos, lo que está estrechamente relacionado con la biodisponibilidad oral (Bhalani y col., 2022). Es importante destacar que este parámetro debe mantener un equilibrio con la lipofilia para penetrar en la circulación y atravesar biomembranas. En nuestro estudio, el logP para el ácido girofórico es muy elevado, lo que permitiría su paso a través de membranas, pero también podría afectar a su unión a proteínas plasmáticas y repercutir en la absorción oral (Gao y col., 2017). Por tanto, el desarrollo de nuevas formulaciones como los sistemas de administración de fármacos autoemulsionables permitirán mejorar la solubilidad y la biodisponibilidad del compuesto, lo que podría ser aplicado para optimizar su perfil farmacológico (Baghel y col., 2020).

Asimismo, se consideró esencial aplicar estudios *in silico* para evaluar la potencial toxicidad del ácido girofórico y predecir posibles efectos adversos. Los resultados indicaron un **perfil adecuado con poca probabilidad de toxicidad** expresada en los parámetros de carcinogenicidad, bloqueadores hERG, hepatotoxicidad, mutagenicidad (Toxicidad AMES) y toxicidad oral aguda en ratas. Por el contrario, los valores relativos a toxicidad respiratoria fueron moderados mientras que los de sensibilización cutánea fueron elevados. Este efectos sobre la toxicidad a nivel cutáneo también fueron evaluados para el resveratrol (a través de ADMETlab 2.0) y valorados con el ensayo de maduración de células monocíticas de leucemia humana (THP-1), mejorando sus resultados mediante la síntesis de un derivado sulfato glucosilado del resveratrol (Jesus y col., 2023). Puesto que los modelos computacionales presentan limitaciones, es importante valorar comparativamente otros modelos existentes (Sorkin y col., 2020). Otros softwares como el OSIRIS Property Explorer mostraron un perfil adecuado para el ácido girofórico, ácido úsnico y ácido

variolárico, excluyendo a los ácidos estíctico y norstíctico por su potencial toxicidad reproductiva (Gupta y col., 2022).

En definitiva, los resultados *in silico* sugieren la posibilidad de escalar el estudio a un diseño *in vivo*, en el que validar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del ácido girofórico.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis Doctoral titulado “**Estudio de la actividad neuroprotectora de especies liquénicas del clado cetrarioide (F/Parmeliaceae) y compuestos aislados**” se ha desarrollado con la finalidad de evaluar el efecto neuroprotector de los extractos liquénicos y metabolitos secundarios de especies del clado cetrarioide, determinando sus efectos sobre diversos mecanismos implicados en enfermedades neurodegenerativas. Para ello se han aplicado modelos *in vitro* e *in silico*, que, mediante el uso de múltiples técnicas y metodologías, han permitido la consecución de los objetivos generales y específicos planteados.

Los resultados obtenidos han permitido establecer las siguientes **conclusiones**:

1. La revisión bibliográfica realizada sobre los distintos grupos químicos de poliquétidos liquénicos permite concluir que las principales actividades investigadas son la antioxidante, la antimicrobiana y la citotóxica, con resultados prometedores para todas ellas.
2. Se ha explorado la actividad *in vitro* inhibitoria frente a las enzimas AChE y BuChE de 14 especies del clado cetrarioide, destacando los extractos liquénicos de *Asahinea scholanderi* y *Cetraria cucullata*.
3. La caracterización fitoquímica por cromatografía líquida de alta eficacia mostró la presencia mayoritaria de ácido alectorónico y ácido colatólico en *Asahinea scholanderi* y de ácido protoliquesterénico y ácido úsnico en *Cetraria cucullata*.
4. Estudios en modelos *in silico* y celular neuronal concluyeron que el ácido alectorónico destaca por su perfil de inhibición frente a la enzima AChE.
5. El estudio de las propiedades antioxidantes de las 14 especies liquénicas cetrarioides, mediante una batería de ensayos *in vitro* y la aplicación de técnicas de análisis multivariante, permitió la selección de *Dactylina arctica*, *Nephromopsis stracheyi*, *Tuckermannopsis americana* y *Vulpicida pinastris* como las especies con mayor carácter antioxidante.
6. El estudio de la actividad de los extractos liquénicos seleccionados en un modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en células SH-SY5Y, mostró el significativo papel neuroprotector de los extractos de *Dactylina arctica* y *Vulpicida pinastris*. Su efecto neuroprotector quedó evidenciado por la disminución de la sobreproducción de EROS y la peroxidación lipídica, la restauración de la morfología celular, el aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT) y de los niveles de GSH y la atenuación del daño mitocondrial.

7. El análisis de la composición química de las especies más activas mediante HPLC reveló la presencia de los ácidos vulpínico, pinástrico y úsnico en *Vulpicida pinastri* y los ácidos lecanórico, úsnico y girofórico en *Dactylina arctica*.
8. En base a la actividad neuroprotectora confirmada para *Dactylina arctica*, el ácido girofórico (compuesto mayoritario del extracto), estudiado en el modelo de estrés oxidativo neuronal, mostró un significativo papel neuroprotector reduciendo los niveles intracelulares de EROS y mejorando la viabilidad y las alteraciones morfológicas inducidas por el H₂O₂. La inducción de la respuesta antioxidante endógena (mediante el aumento de los niveles de enzimas antioxidantes) y la potenciación de la autofagia frente a la apoptosis como respuesta de supervivencia celular se identificaron como algunos de los principales mecanismos implicados en esta neuroprotección.
9. Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de biomarcadores de diferenciación neuronal indicaron que el ácido girofórico participa en la modulación de procesos esenciales a nivel sináptico como el crecimiento axonal y la sinaptogénesis.
10. A través del ensayo *in vitro* de permeabilidad en células hCMEC/D3, se demostró la capacidad del ácido girofórico de atravesar la BHE. Se identificó como tipo de transporte principal la difusión pasiva debido a sus propiedades moleculares obtenidas *in silico*, sin descartarse otros transportes transcelulares.
11. El ácido girofórico mostró un perfil moderado de absorción y adecuado de toxicidad en estudios *in silico* sugiriéndose la posibilidad de escalar el estudio a un diseño *in vivo*.

Conclusión final

A la vista de los resultados presentados, las especies estudiadas del clado cetrarioide se proponen como una fuente natural importante de compuestos activos con actividad neuroprotectora, actuando sobre diversos procesos y enzimas con demostrada implicación en enfermedades neurodegenerativas. Se propone el ácido girofórico como potencial agente neuroprotector por su acción frente al estrés oxidativo, sus propiedades neuromoduladoras y su capacidad de llegar a su diana farmacológica. Asimismo, se destaca el ácido alectorónico por su actividad inhibitoria de AChE.

CONCLUSIONS

V. CONCLUSIONS

The present doctoral thesis entitled "**Study of the neuroprotective activity of lichen species of the cetrarioid clade (F/Parmeliaceae) and isolated compounds**" has been developed with the aim of evaluating the neuroprotective effect of lichen extracts and secondary metabolites of species of the cetrarioid clade, determining their effects on various mechanisms involved in neurodegenerative diseases. To this end, *in vitro* and *in silico* models have been applied, which, by multiple techniques and methodologies, have enabled the general and specific objectives to be achieved.

The results have enabled the following **conclusions** to be drawn:

1. The literature review conducted on different chemical groups of lichen-derived polyketides leads to the conclusion that the main investigated activities are antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic, with promising results for all of them.
2. *In vitro* inhibitory activity against the enzymes AChE and BuChE has been explored in 14 species from the cetrarioid clade, with lichen extracts from *Asahinea scholanderi* and *Cetraria cucullata* standing out.
3. Phytochemical characterization by high-performance liquid chromatography revealed the predominant presence of alectoronic acid and colatolic acid in *Asahinea scholanderi*, and protolichesterinic acid and usnic acid in *Cetraria cucullata*.
4. Alectoronic acid showed a good inhibition profile against the AChE enzyme, in both *in silico* and *in vitro* cellular models.
5. The study of the antioxidant properties of the 14 cetrarioid lichen species, through a battery of *in vitro* assays and the application of multivariate analysis techniques, allowed the selection of *Dactylina arctica*, *Nephromopsis stracheyi*, *Tuckermannopsis americana*, and *Vulpicida pinastri* as the species with the highest antioxidant capacity.
6. The study of the activity of selected lichen extracts in a hydrogen peroxide-induced oxidative stress model in SH-SY5Y cells revealed the significant neuroprotective role of *Dactylina arctica* and *Vulpicida pinastri* extracts. These effects were evidenced by a reduction in ROS production and lipid peroxidation, restoration of cell morphology, increased activity of antioxidant enzymes (SOD and CAT), higher GSH levels, and reduced mitochondrial dysfunction.
7. Phytochemical analysis revealed the presence of vulpinic, pinastric, and usnic acids in *Vulpicida pinastri*, while lecanoric, usnic, and gyrophoric acids were identified in *Dactylina arctica*.

8. Based on the confirmed neuroprotective activity of *Dactylina arctica*, gyrophoric acid (major compound of the extract) was studied in neuronal oxidative stress model, demonstrating its essential role in neuroprotection. In particular, gyrophoric acid was shown to decrease intracellular EROS levels and enhance cell viability and morphological alterations induced by H₂O₂. The neuroprotective effects were likely mediated by the induction of endogenous antioxidant responses (via increased antioxidant enzyme levels) and the potentiation of autophagy as a cell survival response, as opposed to apoptosis.
9. The obtained results from neuronal differentiation biomarker expression analysis showed that gyrophoric acid plays a role in modulating crucial synaptic processes, including axonal growth and synaptogenesis.
10. Through the *in vitro* permeability assay in hCMEC/D3 cells, the ability of gyrophoric to cross the BBB was demonstrated. Passive diffusion was identified as the main transport mechanism due to its molecular properties. However, it should be noted that other transport mechanisms cannot be ruled out, as the uptake assay performed in a murine line differed from the permeability assay in human cell line.
11. *In silico* studies revealed that gyrophoric acid exhibited a moderate absorption profile and acceptable toxicity, indicating the feasibility of scaling up the study to an *in vivo* design.

General conclusion

Based on the presented results, lichens from the cetrarioid clade are suggested as an important natural source of active compounds with neuroprotective activity, acting on various processes and enzymes involved in neurodegenerative diseases. Gyrophoric acid is proposed as a potential neuroprotective agent due to its action against oxidative stress, neuromodulatory properties, and ability to reach its target. Additionally, alectoronic acid is highlighted for its inhibitory activity on AChE.

BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- 2022 Revision of World Population Prospects (2022) Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat.
- Abas, A., Din, L., (2021). The diversity of lichens along elevational gradients in the Tropical Montane Forest of Selangor, Malaysia. *Sains Malaysiana*, 50 (5):1199-1209.
- Abas, A. (2021). A systematic review on biomonitoring using lichen as the biological indicator: A decade of practices, progress and challenges, *Ecological Indicators*, 121,107197.
- Abbas, A., Guo S. (2015). Estimated divergence of some lineages in Parmeliaceae inferred by Bayesian analysis on RPB2 sequence data. *J. Yeast Fungal Res*,13: 73–78.
- Abbott, N.J., (2013). Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis*, 36, 437–449.
- Abbott, N.J., Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*; 37(1):13-25.
- Abbott, N.J., Rönnbäck L, Hansson E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*,7(1):41-53.
- Acharius, E. (1814). Synopsis methodica lichenum
- Agelet, A., Vallès, J. (2003). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part III. Medicinal uses of non-vascular plants, *J Ethnopharmacol.*,84, (2–3):229-234.
- Ahmadi, S., Ghanbari, H., Lotfi, S., Azimi, N. (2021). Predictive QSAR modeling for the antioxidant activity of natural compounds derivatives based on Monte Carlo method. *Mol Divers.*, 25(1):87-97.
- Ahmadjian V., Hale M. E. (1973). The Lichens. *Academic Press*.
- Altuntaş, Ü.; Güzel, İ.; Özçelik, B. (2023). Phenolic Constituents, Antioxidant and Antimicrobial Activity and Clustering Analysis of Propolis Samples Based on PCA from Different Regions of Anatolia. *Molecules* 28, 1121.
- Amenta, F., Tayebati, S.K. (2008). Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. *Curr Med Chem.*,15(5):488-98.
- Amo de Paz, G., Cubas, P., Divakar, P.K., Lumbsch, H.T., Crespo A. (2011). Origin and Diversification of Major Clades in Parmelioid Lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) during the Paleogene Inferred by Bayesian Analysis. *PLoS ONE* 6(12): e28161.
- Amoah, S.K, Sandjo, L.P, Kratz, J.M., Biavatti, M.W. (2016). Rosmarinic Acid---Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Planta Med.*,82(5):388-406.
- An, J., Chen, B., Wang, A., Hao, D., Zhang, Q., Zhao, J., Liu, C., Zhang, L., Zhang, R., & Yang, H. (2018). Modulatory Effects of Natural Products on Neuronal Differentiation. *Neuropsychiatry*, 8(5):1593-1611.
- Andreyev, A.Y, Kushnareva, Y.E, Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 70(2):200-14.
- Angelova, P.R., Esteras, N., Abramov, A.Y. (2021). Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Med Res Rev.*, 41(2):770-784.
- Aoyama, K. (2021). Glutathione in the Brain. *Int J Mol Sci.*, 22(9):5010
- Aptroot, A, van Herk, C.M. (2007). Further evidence of the effects of global warming on lichens, particularly those with Trentepohlia phycobionts. *Environ Pollut.*,146(2):293-8.
- Aquilonius, S.M., Eckernas, S.A., Sundwall, A. (1975). Regional distribution of choline acetyltransferase in the human brain: changes in Huntington's chorea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.38(7):669-77.

- Arca, M. Natoli, S., Micheletta, F., Riggi, S., Di Angelantonio, E., Montali, A., Antonini, T.M., Antonini, R., Diczfalusy, U., Iuliano, L. (2007). Increased plasma levels of oxysterols, in vivo markers of oxidative stress, in patients with familial combined hyperlipidemia: reduction during atorvastatin and fenofibrate therapy. *Free Radic Biol Med.*,42(5):698-705.
- Areche, C.; Parra, J.R.; Sepulveda, B.; García-Beltrán, O.; Simirgiotis, M.J.(2022). UHPLC-MS Metabolomic Fingerprinting, Antioxidant, and Enzyme Inhibition Activities of *Himantormia lugubris* from Antarctica. *Metabolites* , 12(6):560.
- Areiza-Mazo, N., Robles, J., Zamudio-Rodriguez, J.A., Giraldez, L., Echeverria, V., Barrera-Bailon, B., Aliev, G., Sahebkar, A., Ashraf, G.M-, and & Barreto GE (2018). Extracts of *Physalis peruviana* Protect Astrocytic Cells Under Oxidative Stress With Rotenone. *Front. Chem.* 6:276.
- Arendt, T. (2001). Disturbance of neuronal plasticity is a critical pathogenetic event in Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci*,19: 231–245.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B.R. & Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, 468(7323):557-61.
- Arthur, J.R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.*,57(13-14):1825-35.
- Asahina, Y., Shibata, S. (1954). Chemistry of Lichen Substances. Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo.
- Aschenbrenner, I.A., Cernava, T., Berg, G. & Grube, M. (2016). Understanding Microbial Multi-Species Symbioses. *Front Microbiol.*,7:180.
- Asplund, J., Wardle, D.A. (2017). How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biol Rev.* 92: 1720-1738.
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am.*,103(2):263-293.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* (360438),1-32.
- Ayloo, S., Gu, C. (2019). Transcytosis at the blood-brain barrier. *Curr Opin Neurobiol.*, 57:32-38.
- Bačkorová, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Jendželovský, R.; Fedoročko, P. (2011). Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol. In Vitro*, 25, 37–44.
- Bačkorová, M.; Jendželovský, R.; Kello, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Fedoročko, P.(2012). Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol. In Vitro*, 26, 462–468.
- Badotti, F., De Oliveira, F.S., Garcia, C.F., y col. (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiol*17:42.
- Baghel, P., Roy, A., Verma, S. et al. (2020). Amelioration of lipophilic compounds in regard to bioavailability as self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *Futur J Pharm Sci* 6, 21.
- Baker, R.E., Mahmud, A.S., Miller, I.F., Rajeev, M., Rasambainarivo, F., Rice, B.L., Takahashi, S., Tatem, A.J., Wagner, C.E., Wang, L.F., Wesolowski, A., Metcalf, C.J.E. (2022). Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol*,20(4):193-205.
- Bakır, T.Ö., Geyikoglu, F., Çolak, S., Türkez, H., Aslan, A., Bakır, M. (2015). The effects of *Cetraria islandica* and *Pseudevernia furfuracea* extracts in normal and diabetic rats. *Toxicol Ind Health.*, 31(12):1304-17.
- Banks, W.A. (2009). Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol*,9.
- Barreno, E., Vázquez, M. (1981). *Coelocaulon crespoae* Barreno & Vázquez sp. nova (Lichenes). Nota sobre la flora líquénica de brezales españoles. *Lazaroa*, 3: 235-246
- Barron, S.A., Mazliah, J., Bental, E. (1987). Sympathetic cholinergic dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.*,75(1):62-3.

- Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer B, Lippa, A.S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217(4558):408-14.
- Bastien, J.W. (1983). Pharmacopeia of Qollahuaya Andeans. *J. Ethnopharmacol.*, 8:97–111.
- Battistelli, M., Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*, 9, 21.
- Baud, O., Greene, A.E., Li, J., Wang, H., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A. (2004). Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci.*; 24(7):1531-40.
- Bay, M.V., Nam, P.C., Quang, D.T., Mechler, A., Hien, N.K., Hoa, N.T., Vo, Q.V. (2020). Theoretical Study on the Antioxidant Activity of Natural Depsidones. *ACS Omega*, 5(14):7895-790.
- Begley, D.J. (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther.*, 104, 29-45.
- Behera, B.C., Mahadik, N., Morey, M. (2012). Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. *Pharm Biol* 50: 968-979.
- Bellia, G., Pieroni, A. (2015). Isolated, but transnational: the glocal nature of Waldensian ethnobotany, Western Alps, N.W. Italy. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 11: 37.
- Bellucci, A., Mercuri, N. B., Venneri, A., Faustini, G., Longhena, F., Pizzi, M., Missale, C., Spano, P. (2016). Parkinson's disease: from synaptic loss to connectome dysfunction. *Neuropath. & Apl Neurobiol.* 42,77-94.
- Bentinger, M., Brismar, K., Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*. S41-50.
- Berg, R.M., Ofek, K., Qvist, T., Tofteng, F., Soreq, H., Møller, K. (2011). Cholinesterase modulations in patients with acute bacterial meningitis. *Scand J Clin Lab Invest.*, 71(4):350-2.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.*; 272(33):20313-6.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., Tanzi, R.E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.*, 39(1):17-23.
- Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49:3-8.
- Bhalani, D.V., Nutan, B., Kumar, A., Singh, Chandel, A.K. (2022). Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines*, 10(9):2055.
- Bhatia, V., Sharma, S. (2021). Role of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and autophagy in progression of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 421: 117253.
- Bhuvanendran, S., Hanapi, N.A., Ahemad, N., Othman, I., Yusof, S.R., Shaikh, M.F. (2019). Embelin, a Potent Molecule for Alzheimer's Disease: A Proof of Concept From Blood-Brain Barrier Permeability, Acetylcholinesterase Inhibition and Molecular Docking Studies. *Front Neurosci.*, 13:495.
- Bienert, G.P., Møller, A.L., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.M., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem.*, 282(2):1183-92.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 5(1):9-19.
- Bjerke, J.W., Joly, D., Lennart, N., Brossard, T. (2004). Spatial trends in usnic acid concentrations of the lichen *Flavocetraria nivalis* along local climatic gradients in the Arctic (Kongsfjorden, Svalbard). *Polar Biology*, 27. 409-417.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.*, 452:181-97
- Bodor, N., Buchwald, P. (2003). Retrometabolism-Based Drug Design and Targeting. In Burger's *Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, D.J. Abraham (Ed.).

- Bortner, C.D., Cidlowski, J.A. (2003). Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death. *J Biol Chem.*,278(40):39176-84.
- Bowie, A., O'Neill, L.A. (2000). Oxidative stress and nuclear factor-kappa B activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.*,59(1):13-23.
- Bredesen, D.E, Rao, R.V, Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature.*,443(7113):796-802.
- Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.*,1830(5):3289-303.
- Brodo, I.M. (2016). Keys to Lichens of North America: Revised and Expanded. *Yale University Press.*
- Brown, L.S., Foster, C.G., Courtney, J.M., King, N.E., Howells D, W., Sutherland, B.A. (2019). Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Front Cell Neurosci.*,13:282.
- Brunauer, G., Hager, A., Grube, M., Türk, R., Stocker-Wörgötter, E. (2007). Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages. *Plant Physiol Biochem*, 45(2):146-51.
- Büdel, B.& Scheidegger, C. (2008). Thallus morphology and anatomy. In Lichen biology. T. H. Nash III (ed.)
- Buendia, I., Michalska, P., Navarro, E., Gameiro, I., Egea, J., León, R. (2016). Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther.*,157:84-104.
- Cabezas, R., Avila, M., Gonzalez, J., El-Bachá, R.S., Báez, E., García-Segura, L.M., Jurado Coronel, J.C., Capani, F., Cardona-Gomez, G.P., Barreto, G.E. (2014). Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci.* 8:211.
- Cadenas, E., Davies, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000, 29(3-4):222-30.
- Calcott, M.J, Ackerley, D.F, Knight, A., Keyzers, R.A., Owen, J.G. (2018). Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem Soc Rev.*,47(5):1730-1760.
- Campanari, M.L., Navarrete, F., Ginsberg, S.D., Manzanares, J., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M.S. (2016). Increased Expression of Readthrough Acetylcholinesterase Variants in the Brains of Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis.*, 53(3):831-41.
- Campbell, K., Götz, M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.*, 25(5):235-8.
- Carpentier, C., Queiroz, E.F.; Marcourt, L., Wolfender, J.L., Azelmat, J., Grenier, D., Boudreau, S., Voyer, N. (2017). Dibenzofurans and Pseudodepsidones from the lichen *Stereocaulon paschale* Collected in Northern Quebec. *J. Nat. Prod.*, 80, (1), 210-214.
- Carrillo-Mora, P., Alcantar-Shramm, J.M., Almaguer-Benavides, K.M., Macías-Gallardo, J.J., Fuentes-Bello, A., Rodríguez-Barragán, M.A. (2017). Pharmacological Stimulation of Neuronal Plasticity in Acquired Brain Injury. *Clin Neuropharmacol.*,40(3):131-139.
- Carvajal, F.J., Inestrosa, N.C. (2011). Interactions of AChE with A β Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. *Front Mol Neurosci.*, 4:19.
- Casanovas, P., Black, M., Fretwell, P., Convey P. (2015). Mapping lichen distribution on the Antarctic Peninsula using remote sensing, lichen spectra and photographic documentation by citizen scientists. *Polar Research*,34.
- Castino, R., Fiorentino, I., Cagnin, M., Giovia, A., Isidoro, C. (2011). Chelation of lysosomal iron protects dopaminergic SH-SY5Y neuroblastoma cells from hydrogen peroxide toxicity by precluding autophagy and Akt dephosphorylation. *Toxicol Sci.*, 123(2):523-41.
- Castro, A., Martinez, A. (2006). Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Pharm Des.*,12(33):4377-87.

- Cazarin, C.A., Dalmagro, A.P, Gonçalves, A.E, y col. (2021). Usnic acid enantiomers restore cognitive deficits and neurochemical alterations induced by A β ₁₋₄₂ in mice. *Behavioural Brain Research*,397:112945
- Cercasov, V., Pantelică, A., Sălăgean, M., Caniglia, G., Scarlat, A. (2002). Comparative study of the suitability of three lichen species to trace-element air monitoring. *Environ Pollut.* 119(1):129-39.
- Cetin, H., Tufan-Cetin, O., Turk, A.O., Tay, T., Candan, M., Yanikoglu, A., Sumbul, H. (2012). Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae). *Nat. Prod. Res.* 26, 350–355.
- Chang, C.F., Lee, Y.C, Lee, K.H, Lin, H.C, Chen, C.L, Shen, C.J., Huang, C.C. (2016). Therapeutic effect of berberine on TDP-43-related pathogenesis in FTLD and ALS. *J Biomed Sci.* 23(1):72.
- Chaulagain, B., Gothwal, A., Lamptey, R.N.L., Trivedi, R., Mahanta, A.K., Layek, B., Singh, J. (2023). Experimental Models of In Vitro Blood-Brain Barrier for CNS Drug Delivery: An Evolutionary Perspective. *Int J Mol Sci.*,31;24(3):2710.
- Chen, L., Wei, X., Matsuda, Y. (2022). Depside Bond Formation by the Starter-Unit Acyltransferase Domain of a Fungal Polyketide Synthase. *J. Am. Chem. Soc* 144(42), 19225-19230
- Chen, Q.Y., Yin, Y., Li, L., Zhang, Y.J., He, W., Shi, Y. (2022). Geniposidic Acid Confers Neuroprotective Effects in a Mouse Model of Alzheimer's Disease through Activation of a PI3K/AKT/GAP43 Regulatory Axis. *J Prev Alzheimers Dis.*,9(1):158-171.
- Chen, X., Guo, C., Kong, J.(2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.*,7(5):376-85.
- Chen, Z., Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.*,30(2):271-81.
- Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T., Sawada, N. (2008). Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta.*,1778(3):588-600.
- Chiò, A., Mazzini, L., Mora, G. (2020). Disease-modifying therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology*, 167:107986.
- Chung, D., Shum, A., Caraveo, G. (2020). GAP-43 and BASP1 in Axon Regeneration: Implications for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol.* 8:567537.
- Cobb, C.A, Cole, M.P. (2015). Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 84:4-21.
- Cobley, J.N., Fiorello, M.L., Bailey, D.M. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol.*, 15:490-503.
- Cohen, O., Erb, C., Ginzberg, D., Pollak, Y., Seidman, S., Shoham, S., Yirmiya, R., Soreq, H. (2002). Neuronal overexpression of "readthrough" acetylcholinesterase is associated with antisense-suppressible behavioral impairments. *Mol Psychiatry*,7(8):874-85.
- Cohen-Cory, S. (2002). The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science*, 298(5594):770-6.
- Colak, S., Geyikoğlu, F., Aslan, A., Deniz, G.Y. (2014). Effects of lichen extracts on haematological parameters of rats with experimental insulin-dependent diabetes mellitus. *Toxicol Ind Health*, 30, 878-889.
- Colak, S., Geyikoglu, F., Türkez, H., Bakır, T., Aslan, A. (2013). The ameliorative effect of *Cetraria islandica* against diabetes-induced genetic and oxidative damage in human blood. *Pharm Biol.* 51, 1531-1537.
- Colom-Cadena, M., Spires-Jones, T., Zetterberg, H., Blennow, K., Caggiano, A., DeKosky, S.T, Fillit, H., Harrison, J.E, Schneider, L.S, Scheltens, P., de Haan, W., Grundman, M., van Dyck, C.H., Izzo, N.J., Catalano, S.M. Synaptic Health Endpoints Working Group. (2020). The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.*,12(1):21.
- Colović, M.B., Krstić, D.Z., Lazarević-Pašti, T.D., Bondžić, A.M., Vasić, V.M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol.*, 11(3):315-35.

- Convey, P. (2013). Antarctic ecosystems. In S. Levin (ed.): Encyclopedia of biodiversity. *Academic Press*. San Diego, CA.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland. Sinauer Associates.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E, Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L, Pericak-Vance, M.A (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123):921-3.
- Cortés-Gómez, M., Llorens-Álvarez, E., Alom, J., Del Ser, T., Avila, J. Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M.S. (2021). Tau phosphorylation by glycogen synthase kinase 3 β modulates enzyme acetylcholinesterase expression. *J Neurochem*, 157, 2091-2105.
- Corti, O., Lesage, S., Brice, A. (2011). What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev*.91(4):1161-218.
- Courtney, C., Farrell, D. Gray, R., Hills, R. Lynch, L. Sellwood, E., Edwards. S., Hardyman, W., Raftery, J., Crome, P., Lendon, C., Shaw, H., Bentham, P. (2004). Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000): randomised double-blind trial. *Lancet*, 363(9427):2105-15.
- Couto, N., Wood, J., Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med.*,95:27-42.
- Crane, F.L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr.*, 20(6):591-8.
- Crawford, S.D. (2019). Lichens Used in Traditional Medicine. In: Ranković, B. (eds) Lichen Secondary Metabolites. Springer, Cham.
- Crespo, A., Divakar, P.K., Hawksworth, D.L. (2011). Generic concepts in parmelioid lichens, and the phylogenetic value of characters used in their circumscription. *Lichenol* 43: 511–535.
- Crespo, A., Lumbsch, H.T., Mattsson, J.E., Blanco, O., Divakar, P.K., Articus, K., Wiklund, E., Bawingan, P.A., Wedin, M. (2007). Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in Parmeliaceae (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear RPB1 gene. *Molec. Phylog. Evol.* 44: 812-824.
- Cuervo, A., Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging *Cell Res* 24, 92–104
- Cuevas, C., Francesch, A., Galmarini, C. M., Aviles, P., Munt, S. (2012). Ecteinascidin-743 (Yondelis[®]), Aplidin[®], and Irvalec[®], in *Anticancer Agents from Natural Products*, 2nd ed., eds Cragg G. M., Kingston D. G. I., Newman D. J. (Boca Raton, FL: Taylor and Francis), 291–316.
- Culberson, C.F., Elix, John A. (1989). Lichen Substances, Methods in Plant Biochemistry, *Academic Press*, 1: 509-535.
- Culberson, W. L. (1969). The Use of Chemistry in the Systematics of the Lichens. *Taxon*, 18(2), 152–166.
- Cunha-Oliveira, T., Montezinho, L., Mendes, C., Firuzi, O., Saso, L., Oliveira, P.J., Silva, F.S.G. (2020). Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology and Opportunities for Pharmacological Intervention. *Oxid Med Cell Longev*, 2020:5021694.
- Da Wang, C. W., Wang L., Chen Y. (2019). A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Delivery*,26:1,551-565.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.*,52(4):601-23.
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.*,17(7):1104-14.
- Darvesh, S., Cash, M.K., Reid, G.A., Martin, E., Mitnitski, A., Geula, C. (2012). Butyrylcholinesterase is associated with β -amyloid plaques in the transgenic APPSWE/PSEN1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*.71(1):2-14.

- Darvesh, S., Hopkins, D.A. (2003). Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J Comp Neurol*,463(1):25-43.
- Davis, S.M., Pennypacker, K.R. (2017). Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke. *Neurochem Int.*,107:23-32.
- Davison, E.K., Brimble, M.A. (2019). Natural product derived privileged scaffolds in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.*,52:1-8.
- De Boer, D., Nguyen, N., Mao, J., Moore, J., Sorin, E.J. (2021). A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. *Biomolecules.*,11(4):580.
- De Duve, C. (1963). The lysosome. *Sci Am.*, 208:64-72.
- de Paz, G.A., Raggio, J., Gómez-Serranillos, M.P.(2010). HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. *J Pharm Biomed Anal*, 53: 165-171.
- de Pedro, N., Cantizani, J., Ortiz-López, F.J., González-Menéndez, V., Cautain, B., Rodríguez, L., Bills, G.F., Reyes, F., Genilloud, O., Vicente, F. (2016). Protective effects of isolecanoric acid on neurodegenerative *in vitro* models. *Neuropharmacology* 101, 538–548.
- Debnath, J., Baehrecke, E.H., Kroemer, G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*,1(2):66-74.
- Dehouck, M.P, Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., Cecchelli, R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neurochem*, 54(5):1798-801.
- Dennerly, P.A. (2000). Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr Top Cell Regul.*, 36:181-99.
- DePriest, P.T. (1999). Development of Mason E. Hale's list of epithets in the parmelioid genera (lichen forming Ascomycota): a bibliographic review. *Bryologist* 102, 442–461.
- Devraj, K., Klinger, M.E., Myers, R.L., Mokashi, A., Hawkins, R.A., Simpson, I.A. (2011). GLUT-1 glucose transporters in the blood-brain barrier: differential phosphorylation. *J Neurosci Res.* 89(12):1913-25.
- Di Lisa, F., Kaludercic, N., Carpi, A., Menabò, R., Giorgio, M. (2009). Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase. *Basic Res Cardiol.*,104(2):131-9.
- Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., Restani, P. (2021). Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients.*,13(1):273.
- Di Marzo, N., Chisci, E., Giovannoni, R. (2018). The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells.*,7(10):156.
- Dieu, A., Millot, M., Champavier, Y., Mambu, L., Chaleix, V., Sol, V., Gloaguen, V. (2014). Uncommon chlorinated xanthone and other antibacterial compounds from the lichen *Cladonia incrassata*. *Planta Med*, 80, (11), 931-935.
- Divakar, P.K y col. (2015). Evolution of complex symbiotic relationships in a morphologically derived family of lichen-forming fungi. *New Phytol.*,208(4):1217-26.
- Divakar, P.K., Wei, X.L., McCune, B., y col. (2019). Parallel Miocene dispersal events explain the cosmopolitan distribution of the Hypogymnioid lichens. *J Biogeogr.*, 46:945–955.
- Dlugosz, P.J., Billen, L.P., Annis, M.G., Zhu, W., Zhang, Z., Lin, J., Leber, B., Andrews, D.W. (2006). Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J.*, 25(11):2287-96.
- Domingues, H.S, Portugal, C.C., Socodato, R., Relvas, J.B. (2016). Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol.*,4: 71.
- Dora, M.F., Taha, N.M., Lebda, M.A., Hashem, A.E., Elfeky, M.S., El-Sayed, Y.S., Jaouni, S.A., El-Far, A.H. (2021). Quercetin Attenuates Brain Oxidative Alterations Induced by Iron Oxide Nanoparticles in Rats. *Int J Mol Sci.*, 22(8):3829.
- Doroszkiwicz, J., Mroczko, B. (2022). New Possibilities in the Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.*,23(16):8902.

- Dos Santos, T.C., Gomes, T.M., Pinto, B.A.S, Camara, A.L, Paes, A.M.A. (2018). Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. *Front Pharmacol.*,9:1192.
- Dröge, W., Schipper, H.M. (2007). Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell.*,6(3): 361-70.
- Dubois, B., Ruberg, M., Javoy-Agid, F., Ploska, A., Agid, Y. (1983). A subcortical cholinergic system is affected in Parkinson's disease. *Brain Res.*,288(1-2):213-8.
- Dugger, B.N., Dickson, D.W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*,9(7): a028035.
- Dunn, J., Grider, M.H. (2023). Physiology, Adenosine Triphosphate. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Ece, A., Pejın, B. (2015). A computational insight into acetylcholinesterase inhibitory activity of a new lichen depsidone. *J Enzyme Inhib Med Chem.*,30(4):528-32.
- El-Far, A.H, Elewa, Y.H.A, Abdelfattah, E.A, Alsenosy, A.A, Atta, M.S., Abou-Zeid, K.M., Al Jaouni, S.K., Mousa, S.A, Noreldin, A.E. (2021). Thymoquinone and Curcumin Defeat Aging-Associated Oxidative Alterations Induced by D-Galactose in Rats' Brain and Heart. *Int J Mol Sci*, 22(13):6839.
- Elix, J. A., Nash III, T. H. (1997). A monograph of the lichen genus *Pseudoparmelia*. (Ascomycotina, Parmeliaceae). *Bryologist*, 100: 482-498.
- Elix, J. A., Stocker-Worgotter, E. (2008). Biochemistry and Secondary Metabolites. In: T. H. Nash III, Ed., *Lichen biology*, Cambridge University Press, Cambridge, 104-133.
- Elix, J.A, Johnston, J., Parker, J.L. (1988). A computer program for the rapid identification of lichen substances. *Mycotaxon* 31:89-99.
- EMA/112932/2022. European Medicines Agency. Refusal of the marketing authorisation for Adulherm (aducanumab).
- EMA/HMPC/36866/2014. European Medicines Agency (EMA) Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Assessment Report on *Cetraria Islandica* (L.) Acharius s.l., thallus.
- Emsen, B., Ozdemir, O., Engin, T. y col. (2019). Inhibition of growth of U87MG human glioblastoma cells by *Usnea longissima* Ach. *An Acad Bras Cienc.*, 91: e20180994.
- Erfani, S., Valadbeigi, T., Aboutaleb, N., Karimi, N., Moghimi, A., Khaksari, M. (2020). Usnic acid improves memory impairment after cerebral ischemia/reperfusion injuries by anti-neuroinflammatory, antioxidant, and anti-apoptotic properties. *Iran J Basic Med Sci.*,23(9):1225-1231.
- Ermak, G., Davies, K.J. (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol.*,38(10):713-21
- Esslinger, T.L. (1989). Systematics of *Oropogon* (Alectoriaceae) in the New World. *Systematic Botany Monographs*, 28: 1-111
- Esslinger, T.L., Egan, R.S. (1995). A sixth checklist of the lichen-forming, lichenicolous, and allied fungi of the continental United States and Canada. *The Bryologist*, 98(4): 467-549.
- Fagan, R.L, Palfey, B.A. (2010). Flavin-Dependent Enzymes, In *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, 37-113.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., Klionsky, D.J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res.*,24(1):24-41.
- Fernández-Moriano, C., Divakar, P.K., Crespo, A., Gómez-Serranillos, M.P. (2015). Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two Parmeliaceae lichens: Identification of active compounds. *Phytomedicine.*, 22(9):847-55.
- Fernández-Moriano, C., Divakar, P.K., Crespo, A., Gómez-Serranillos, M.P. (2014). Antioxidant and cytoprotective potentials of Parmeliaceae lichens and identification of active compounds. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 81 (2):164-178.
- Fernández-Moriano, C.; Divakar, P.K.; Crespo, A.; Gómez-Serranillos, M.P. (2017). In vitro neuroprotective potential of lichen metabolite fumarprotocetraric acid via intracellular redox modulation. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 316, 83-94.

- Fernández-Moriano, C.; Divakar, P.K.; Crespo, A.; Gómez-Serranillos, M.P. (2017). Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. *Food Chem. Toxicol.*, 105, 262–277.
- Ferreira-Vieira, T.H, Guimaraes, I.M., Silva, F.R., Ribeiro, F.M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol.*,14(1):101-15.
- Fita, I., Rossmann, M. G. (1985). The active center of catalase. *Journal of Molecular Biology*,185 (1):21-37.
- Flynn, J.M., Melov, S. (2013). SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med.*,62:4-12.
- Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.*,30(1-2):1-12.
- Friedl, T., Büdel, B. (2008). Photobionts. – In: Nash III, T. (ed.) *Lichen Biology. Cambridge Univ. Press.*, pp. 9–26.
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.*, 15(6):1583-606.
- Fulda, S. (2010). Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell Biol.*, 2010:370835.
- Furmanek, Ł.; Czarnota, P.; Seaward, M.R.D. (2022). A review of the potential of lichen substances as antifungal agents: The effects of extracts and lichen secondary metabolites on *Fusarium fungi*. *Arch. Microbiol.*, 204, 523.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J., Hernández, F. (2012) Tau protein and adult hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci.*, 6:104.
- Gaikwad, S., Verma, N., Sharma, B.O. y col.(2014). Growth promoting effects of some lichen metabolites on probiotic bacteria. *J Food Sci Technol.*, 51: 2624-2631.
- Gallego, R., Valdés, A., Sánchez-Martínez, J.D. et al. (2022). Study of the potential neuroprotective effect of *Dunaliella salina* extract in SH-SY5Y cell model. *Anal Bioanal Chem.*, 414, 5357–5371.
- Galun, M., Shomer-Ilan, A. (1988). Secondary metabolic products. In M. Galun (Ed.), *CRC handbook of lichenology* (pp. 3–8). *Boca Raton, FL: CRC Press*.
- Gao, Y., Gesenberg, C., Zheng, W. (2017). Oral Formulations for Preclinical Studies: Principle, Design, and Development Considerations. In: *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*, Academic Press,455-495.
- Garcimartín, A., López-Oliva, M.E., González, M.P., Sánchez-Muniz, F.J., Benedí, J.(2017). Hydrogen peroxide modifies both activity and isoforms of acetylcholinesterase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Redox Biol.*,12:719-726.
- Gargas, A., DePriest, P.T., Grube, M., Tehler, A. (1995). Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268: 1492-1495.
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.*; 482(3):419-425.
- Gasiorowska, A., Wydrych, M., Drapich, P., Zadrozny, M., Steczkowska, M., Niewiadomski, W., Niewiadomska, G. (2021). The Biology and Pathobiology of Glutamatergic, Cholinergic, and Dopaminergic Signaling in the Aging Brain. *Front Aging Neurosci.*, 13:654931.
- Gasulla, F., Del Campo, E.M., Casano, L.M., Guéra, A. (2021). Advances in Understanding of Desiccation Tolerance of Lichens and Lichen-Forming Algae. *Plants (Basel).*,10(4):807
- Gaughan, G., Park, H., Priddle, J., Craig, I., Craig, S. (1991). Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q 26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. *Genomics*, 11: 455.
- Gerasimova, J.V., Beck, A., Werth, S., Resl, P. (2022). High Diversity of Type I Polyketide Genes in *Bacidia rubella* as Revealed by the Comparative Analysis of 23 Lichen Genomes. *J Fungi (Basel).*,8(5):449
- Gerlits, O., Ho, K.Y., Cheng, X., Blumenthal, D., Taylor, P., Kovalevsky, A., Radic, Z. (2019). A new crystal form of human acetylcholinesterase for exploratory room-temperature crystallography studies. *Chemico-biological interactions*. 309. 108698.

- Getman, D.K., Eubanks, J.H., Camp, S., Evans, G.A., Taylor, P. (1992). The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet.* 51(1):170-7.
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S.R., Jangamreddy, J.R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A.R., Kashani, H.H., Hashemi, M., Owji, A.A., Łos, M.J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.*, 112:24-49.
- Ghezzi, D., Zeviani, M. (2012). Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology. *Adv Exp Med Biol.*, 748:65-106.
- Gidik, B. (2021). Antioxidant, Antimicrobial Activities and Fatty Acid Compositions of Wild *Berberis* spp. by Different Techniques Combined with Chemometrics (PCA and HCA). *Molecules.*, 26(24):7448.
- Giordani, P. (2019). Lichen Diversity and Biomonitoring: A Special Issue. *Diversity*, 11, 171.
- Giordano, M.E., Caricato, R., Lionetto, M.G. (2020). Concentration Dependence of the Antioxidant and Prooxidant Activity of Trolox in HeLa Cells: Involvement in the Induction of Apoptotic Volume Decrease. *Antioxidants (Basel).*, 9(11):1058.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.*, 221(1):3-12.
- Glorieux, C., Calderon, P.B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.*, 398(10):1095-1108.
- Goga, M., Elečko, J., Marcinčinová, M., Ručová, D., Bačkorová, M., Bačkor, M. (2018). Lichen Metabolites: An Overview of Some Secondary Metabolites and Their Biological Potential. In: Merillon, JM., Ramawat, K. (eds) Co-Evolution of Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry. *Springer, Cham.*
- Gollapudi, S.R.; Telikepalli, H.; Jampani, H.B.; Mirhom, Y.W.; Drake, S.D.; Bhattiprolu, K.R.; Velde, D.V.; Mitscher, L.A. (1994). Alectosarmentin, a new antimicrobial dibenzofuranoid lactol from the lichen, *Alectoria sarmentosa*. *J. Nat. Prod.*, 57, (7), 934-938.
- Gombert, S., Asta, J., Seaward, M.R. Assessment of lichen diversity by index of atmospheric purity (IAP), index of human impact (IHI) and other environmental factors in an urban area (Grenoble, southeast France). *Sci Total Environ.*, 324(1-3):183-99.
- González-Burgos, E., Duarte, A.I., Carretero, M.E., Moreira, P.I., Gómez-Serranillos, M.P. (2016). Kaurane diterpenes as mitochondrial alterations preventive agents under experimental oxidative stress conditions. *Pharm Biol.*, 54(4):705-11.
- Gordy, C., He, Y.W. (2012). The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein Cell.*, 3(1):17-27.
- Gorman, A.M. (2008). Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *J Cell Mol Med.*, 12(6A):2263-80.
- Gosselet, F., Loiola, R.A., Roig, A., Rosell, A., Culot, M. (2021). Central nervous system delivery of molecules across the blood-brain barrier. *Neurochem Int.*, 144:104952.
- Goward, T. (1994). Notes on oldgrowth-dependent epiphytic macrolichens in inland British Columbia, Canada. *Acta Botanica Fennica* 150: 31–38.
- Graybiel, A., Ragsdale, C. (1982). Pseudocholinesterase staining in the primary visual pathway of the macaque monkey. *Nature* 299, 439–442.
- Greene, C., Hanley, N., Campbell, M. (2019). Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS.*, 16(1):3.
- Greig, N.H., Lahiri, D.K., Sambamurti, K. (2002). Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int Psychogeriatr.*, 14, (1):77-91.
- Grimm, M., Grube, M., Schiefelbein, U., Zühlke, D., Bernhardt, J., Riedel, K. (2021). The Lichens' Microbiota, Still a Mystery? *Front Microbiol.*, 12:623839.

- Grube, M., Blaha, J. (2003). On the phylogeny of some polyketide synthase genes in the lichenized genus *Lecanora*. *Mycol Res.*,107(Pt 12):1419-26.
- Grube, M., Cernava, T., Soh, J., Fuchs, S., Aschenbrenner, I., Lassek, C., Wegner, U., Becher, D., Riedel, K., Sensen, C.W., Berg, G. (2015). Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *ISME J.*, 9(2):412-24.
- Grube, M., Wedin, M. (2016) Lichenized Fungi and the Evolution of Symbiotic Organization. *Microbiol Spectr.*,4(6).
- Grujičić, D.; Stošić, I.; Kosanić, M.; Stanojković, T.; Ranković, B.; Milošević-Djordjević, O. (2014). Evaluation of *in vitro* antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica*. *Cytotechnology*, 66, 803-813.
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., Matías-Guío, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurología*, 30(2):119-29.
- Gülçin, I., Oktay, M., Küfrevioğlu, O.I., Aslan, A. (2002). Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *J Ethnopharmacol.*, 79(3):325-9.
- Gulino, R. (2023). Synaptic Dysfunction and Plasticity in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci.*, 24(5):4613.
- Guo, C., Ding, P., Xie, C., Ye, C., Ye, M., Pan, C., Cao, X., Zhang, S., Zheng, S. (2017). Potential application of the oxidative nucleic acid damage biomarkers in detection of diseases. *Oncotarget.*,8(43):75767-75777.
- Guo, C., Sun, L., Chen, X., Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.*, 8(21):2003-14.
- Gupta, A.; Sahu, N.; Singh, A.P.; Singh, V.K.; Singh, S.C.; Upadhye, V.J.; Mathew, A.T.; Kumar, R.; Sinha, R.P. (2022). Exploration of Novel Lichen Compounds as Inhibitors of SARS-CoV-2 Mpro: Ligand-Based Design, Molecular Dynamics, and ADMET Analyses. *Appl. Biochem. Biotechnol.*,194, 6386-6406.
- Hale, M.E. (1983). *The Biology of Lichens*. 3rd Edition, *Edward Arnold Ltd.*, London.
- Hale, M.E. (1989). *Lichens of California*. *University of California Press*.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.*,59(5):1609-23.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. *Clarendon Press*, Oxford
- Hanapi, N.A., Mohamad Arshad, A.S, Abdullah, J.M., Tengku Muhammad, T.S., Yusof, S.R. (2021). Blood-Brain Barrier Permeability of Asiaticoside, Madecassoside and Asiatic Acid in Porcine Brain Endothelial Cell Model. *J Pharm Sci.*, 110(2):698-706.
- Hannan, M.A., Dash, R., Sohag, A.A.M., Haque, M.N., Moon, I.S. (2020). Neuroprotection Against Oxidative Stress: Phytochemicals Targeting TrkB Signaling and the Nrf2-ARE Antioxidant System. *Front Mol Neurosci.*,13:116.
- Haraldsdóttir, S., Guolaugsdóttir, E., Ingólfssdóttir, K. y col. (2004). Anti-proliferative effects of lichen-derived lipoxygenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin *in vitro*. *Planta Med*, 70: 1098-1100.
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E.M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P.J., Simmons, Z., van den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers.*, 3:17071.
- Harrington, K.A., Augood, S.J., Kingsbury, A.E., Foster, O.J., Emson, P.C. (1996). Dopamine transporter (Dat) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2) gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res.*, 36(1):157-62.
- Hartsock, A., Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta.*,1778(3):660-9.
- Hawksworth, D.L., Honegger, R. (1994) The lichen thallus: a symbiotic phenotype of nutritionally specialized fungi and its response to gall producers. In: Williams MAJ (ed) *Plant galls: organisms, interactions, populations*. *Clarendon Press*, Oxford, pp 77-98.

- Hebda, R.J., Turner, N.J., Birchwater, S., y col. (1996). Ulkatcho Food and Medicine Plants. *Ulkatcho Band*, Anahim Lake, Canada
- Helms, H.C., Abbott, N.J., Burek, M., et al. (2016). *In vitro* models of the blood–brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 36(5):862-890.
- Hervé, F., Ghinea, N., Scherrmann, J.M. (2008). CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.*, 10(3):455-72.
- Hitchcock, S.A. (2008). Blood-brain barrier permeability considerations for CNS-targeted compound library design. *Curr Opin Chem Biol.*, 12, 318-323.
- Ho, E., Karimi Galouhahi, K., Liu, C.C., Bhindi, R., Figtree, G.A. (2013). Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.*, 1(1):483-91.
- Ho, N.T, Van Bay, M., Mechler, A., Vo, Q.V. (2020). Is Usnic Acid a Promising Radical Scavenger? *ACS Omega.*, 5(28):17715-17720.
- Honda, N.K.; Pavan, F.R.; Coelho, R.G.; de Andrade Leite, S.R.; Micheletti, A.C.; Lopes, T.I.; Misutsu, M.Y.; Beatriz, A.; Brum, R.L.; Leite, C.Q. (2010). Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine*, 17, 328–332.
- Honegger, R. (2009). Lichen-Forming Fungi and Their Photobionts. In: Deising, H.B. (eds) Plant Relationships. The Mycota, vol 5. *Springer*, Berlin, Heidelberg.
- Honegger, R., Conconiy, S., Kutasi, V. (1996). Field Studies on Growth and Regenerative Capacity in the Foliose Macrolichen *Xanthoria parietina* (Teloschistales, Ascomycotina). *Botanica Acta*, 109: 187-193.
- Honegger, R., Edwards, D. and Axe, L. (2013). The earliest records of internally stratified cyanobacterial and algal lichens from the Lower Devonian of the Welsh Borderland. *New Phytol*, 197: 264-275.
- Hong, J.M., Suh, S.S, Kim, T.K. y col. (2018). Anti-Cancer Activity of Lobaric Acid and Lobarstin Extracted from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum*. *Molecules* 2018; 23.
- Hong, Y., An, Z. (2018). Hesperidin attenuates learning and memory deficits in APP/PS1 mice through activation of Akt/Nrf2 signaling and inhibition of RAGE/NF- κ B signaling. *Arch Pharm Res.*, 41(6):655-663.
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S.G., Croteau, D.L., Bohr, V.A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.*, 15(10):565-581.
- <https://www.rae.es/>
- <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>.
- Hu, H., Tian, M., Ding, C., Yu, S. (2019). The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol.* 2019, 9:3083.
- Hu, Y., Lin, Q. Zhao, H., Li, X., Sang, S., McClements, D.J., Long, J., Jin, Z., Wang, J., Qiu C. (2023). Bioaccessibility and bioavailability of phytochemicals: Influencing factors, improvements, and evaluations. *Food Hydrocolloids*, 135, 108165.
- Hui, Y., Chengyong, T., Cheng, L., Haixia, H., Yuanda, Z., Weihua, Y. (2018). Resveratrol Attenuates the Cytotoxicity Induced by Amyloid- β_{1-42} in PC12 Cells by Upregulating Heme Oxygenase-1 via the PI3K/Akt/Nrf2 Pathway. *Neurochem Res.*, 43(2):297-305.
- Hung, S.Y., Fu, W.M. (2017). Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J Biomed Sci.*, 24(1):47.
- Ibrahim, S.R.M., Sirwi, A., Eid, B.G., Mohamed, S.G.A., Mohamed, G.A. (2021). Fungal Depsides-Naturally Inspiring Molecules: Biosynthesis, Structural Characterization, and Biological Activities. *Metabolites.*, 11(10):683.
- Igoli, J.O., Gray, A.I., Clements, C.J. y col. (2014). Antitrypanosomal activity & docking studies of isolated constituents from the lichen *Cetraria islandica*: possibly multifunctional scaffolds. *Curr Top Med Chem*, 14: 1014-1021.
- Ihlen, P. G., Ekman, S. (2002). Outline of phylogeny and character evolution in *Rhizocarpon* (Rhizocarpaceae, lichenized Ascomycota) based on nuclear ITS and mitochondrial SSU ribosomal DNA sequences. *Biological Journal of the Linnean Society*, 77 (4):535–546.

- Illana-Esteban, C. (2012). Líquenes usados en medicina tradicional. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid*, 36. 163-174.
- Isobe, I., Watanabe, T., Yotsuyanagi, T., Hazemoto, N., Yamagata, K., Ueki, T., Nakanishi, K., Asai, K., Kato, T. (1996). Astrocytic contributions to blood-brain barrier (BBB) formation by endothelial cells: a possible use of aortic endothelial cell for in vitro BBB model. *Neurochem Int.*, 28(5-6):523-33.
- Ivanova, V.; Backor, M.; Dahse, H.M.; Graefe, U. (2010). Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*. *Prep Biochem Biotechnol*, 40, (4), 377-388.
- Jahns, H.M. (1973). Chapter 1 - Anatomy, morphology, and development, *The Lichens*, Academic press, 3-58.
- Jamwal, S., Kumar, P. (2019). Insight Into the Emerging Role of Striatal Neurotransmitters in the Pathophysiology of Parkinson's Disease and Huntington's Disease: A Review. *Curr Neuropharmacol.*, 17(2):165-175.
- Jansen, T., Daiber, A. (2012). Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase? *Front Pharmacol.*;3:30.
- Jellinger, K.A. (2010). Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med.*, 14(3):457-87.
- Jesus, A.; Sebastião, A.I.; Brites, G.; Correia-da-Silva, M.; Cidade, H.; Cruz, M.T.; Sousa, E.; Almeida, I.F. (2023). A Hydrophilic Sulfated Resveratrol Derivative for Topical Application: Sensitization and Anti-Allergic Potential. *Molecules*, 28(7):3158.
- Jia, W., Lu, R., Martin, T.A., Jiang, W.G. (2014). The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (review). *Mol Med Rep.*, 9(3):779-85.
- Jia, W., Martin, T.A., Zhang, G., Jiang, W.G. (2013). Junctional adhesion molecules in cerebral endothelial tight junction and brain metastasis. *Anticancer Res.*, 33(6):2353-9.
- Joe, I.S., Jeong, S.G., Cho, G.W. (2015). Resveratrol-induced SIRT1 activation promotes neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett.*, 584:97-102.
- Johnson, J.A., Johnson, D.A., Kraft, A.D., Calkins, M.J., Jakel, R.J., Vargas, M.R., Chen, P.C. (2008). The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.*, 1147:61-9.
- Joulain, D., Tabacchi, R. (2009). Lichen extracts as raw materials in perfumery. *J. Flav. Fragr.* 24: 49-61.
- Jurkovic Mlakar, S., Osredkar, J., Marc, J. (2008). Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. *Biochemia Medica.*, 18 (2).
- Kadry, H., Noorani, B., Cucullo, L. (2020). A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS*, 17(1):69.
- Kalia, L.V., Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet*, 386(9996):896-912.
- Kalia, S.K., Sankar, T., Lozano, A.M. (2013). Deep brain stimulation for Parkinson's disease and other movement disorders. *Curr Opin Neurol.*, 26(4):374-80.
- Kalra, R., Conlan, X.A., Areche, C., Dilawari, R., Goel, M. (2021). Metabolite Profiling of the Indian Food Spice Lichen, *Pseudevernia furfuracea* Combined With Optimised Extraction Methodology to Obtain Bioactive Phenolic Compounds. *Front Pharmacol.*, 12:629695.
- Kalra, R., Conlan, X.A., Goel, M. (2020). Fungi as a Potential Source of Pigments: Harnessing Filamentous Fungi. *Front Chem.*, 8:369.
- Kandiah, N., Pai, M.C., Senanarong, V., Looi, I., Ampil, E., Park, K.W., Karanam, A.K., Christopher, S. (2017). Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clin Interv Aging.*, 12:697-707.
- Kappen, L., Schroeter, B., Scheidegger, C., Sommerkorn, M., Hestmark, G. (1996). Cold resistance and metabolic activity of lichens below 0°C. *Advances in Space Research*, 18 (12):119-128.
- Kärnefelt, I., Mattsson, J. E., Thell, A. (1992). Evolution and phylogeny of cetrarioid lichens. *Pl. Syst. Evol.* 183, 113-160.

- Kärnefelt, I., Thell, A., Randle, T., Saag, A. (1994). The genus *Flavocetraria* Kärnefelt & Thell (Parmeliaceae, Ascomycotina) and its affinities. *Acta Botanica Fennica* 150: 79–86.
- Kaushik, S., Cuervo, A.M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.*,19, 365–381.
- Kealey, J.T., Craig, J.P., Barr, P.J. (2021). Identification of a lichen depside polyketide synthase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng Commun.*,13:e00172.
- Kelly, L.J., Hollingsworth, P.M., Coppins, B.J., Ellis, C.J., Harrold, P., Tosh, J., Yahr, R. (2011). DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context. *New Phytol.*, 191(1):288-300.
- Khoo, T.K., Yarnall, A.J., Duncan, G.W., Coleman, S., O'Brien, J.T., Brooks, D.J., Barker, R.A., Burn, D.J. (2013). The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. *Neurology*, 80(3):276-81.
- Kiernan, M.C., Vucic, S., Talbot, K., McDermott, C.J., Hardiman, O., Shefner, J.M., Al-Chalabi, A., Huynh, W., Cudkovic, M., Talman P., Van den Berg, L.H., Dharmadasa, T., Wicks, P., Reilly, C., Turner, M.R. (2021). Improving clinical trial outcomes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 17(2):104-118.
- Kim, C., Yousefian-Jazi, A., Choi, S.H., Chang, I., Lee, J., Ryu, H. (2021). Non-Cell Autonomous and Epigenetic Mechanisms of Huntington's Disease. *Int J Mol Sci.*, 22(22):12499.
- Kim, S.M., Park, Y.J., Shin, M.S., Kim, H.R., Kim, M.J., Lee, S.H., Yun, S.P., Kwon, S.H. (2017). Acacetin inhibits neuronal cell death induced by 6-hydroxydopamine in cellular Parkinson's disease model. *Bioorg Med Chem Lett.*,27(23):5207-5212.
- Kim, Y., Park, J., Choi, Y.K. (2019). The Role of Astrocytes in the Central Nervous System Focused on BK Channel and Heme Oxygenase Metabolites: A Review. *Antioxidants (Basel)*, 8(5):121.
- Kinney, J.W., Bemiller, S.M., Murtishaw, A.S., Leisgang, A.M., Salazar, A.M., Lamb, B.T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 4:575-590.
- Klepac, N., Relja, M., Klepac, R., Hećimović, S., Babić, T., Trkulja, V. (2007). Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects: a cross-sectional study. *J Neurol.*, 254(12):1676-83.
- Klionsky, D.J. y col. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*,17(1):1-382.
- Koepsell, H. (2021). Update on drug-drug interaction at organic cation transporters: mechanisms, clinical impact, and proposal for advanced in vitro testing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 17(6):635-653.
- Kong, X., Zhong, M., Su, X., y col. (2016). Tetramethylpyrazine promotes migration of neural precursor cells via activating the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol. Neurobiol.*, 53(1), 6526-6539.
- Košak, U., Brus, B., Knez, D., Žakelj, S., Trontelj, J., Pišlar, A., Šink, R., Jukič, M., Živin, M., Podkova, A., Nachon, F., Brazzolotto, X., Stojan, J., Kos, J., Coquelle, N., Sařat, K., Colletier, J.P., Gobec, S.(2018). The Magic of Crystal Structure-Based Inhibitor Optimization: Development of a Butyrylcholinesterase Inhibitor with Picomolar Affinity and in Vivo Activity. *J Med Chem.*, 61(1):119-139.
- Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S. y col.(2013). *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Chem Toxicol.*, 53: 112-118.
- Kosanic, M.; Rankovic, B.; Stanojkovic, T.; Vasiljevic, P.; Manojlovic, N.(2014). Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia. *EXCLI J.*, 13, 1226–1238.
- Kraichak, E., Divakar, P.K., Crespo, A., Leavitt, S.D., Nelsen, M.P., Lücking, R., Lumbsch, H.T. (2015). A Tale of Two Hyper-diversities: Diversification dynamics of the two largest families of lichenized fungi. *Sci Rep.*, 5:10028.
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A., Nash III, T. (2009). Desiccation-Tolerance in Lichens: A Review. *The Bryologist.* 111. 576-593.

- Kranner, I., Birtic, S. (2005). A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integr Comp Biol.* 45(5):734-40.
- Kress, J.K., Erickson, D.L. (2008). DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *PNAS* 105:2761–2762.
- Lai, M.J., Chen, X.L., Qian, Z.G., Xu, L., Ahti, T. (2009). Cetrarioid lichen genera and species in NE China. *Ann.Bot.Fennici.*, 46:365-380
- Lanone, S., Bloc, S., Foresti, R., Almolki, A., Taillé, C., Callebert, J., Conti, M., Goven, D., Aubier, M., Dureuil, B., El-Benna. J., Motterlini, R., Boczkowski, J. (2005). Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. *FASEB J.*, 19(13):1890-2.
- Lauinger, I.L.; Vivas, L.; Perozzo, R.; Stairiker, C.; Tarun, A.; Zloh, M.; Zhang, X.; Xu, H.; Tonge, P.J.; Franzblau, S.G.; y col. (2013). Potential of lichen secondary metabolites against *Plasmodium liver* stage parasites with FAS-II as the potential target. *J. Nat. Prod.*, 76, 1064–1070.
- Lawrey, J.D. (2000). Chemical interactions between two lichen-degrading fungi. *J. Chem. Ecol.*, 26, 1821–1831.
- Lawrey, J.D.; Torzilli, A.P.; Chandhoeke, V. (1999). Destruction of lichen chemical defenses by fungal pathogen. *Am. J. Bot.*, 86, 187–189.
- Le Roux, A., Kuzmanovski, I., Habrant, D., Meunier, S., Bischoff, P., Nadal, B., Thetiot-Laurent, S.A., Le Gall, T., Wagner. A., Novič, M. (2011). Design and synthesis of new antioxidants predicted by the model developed on a set of pulvinic acid derivatives. *J Chem Inf Model.* 51(12):3050-9.
- Leanza, G., Gulino, R., Zorec, R. (2018). Noradrenergic Hypothesis Linking Neurodegeneration-Based Cognitive Decline and Astroglia. *Front Mol Neurosci.*, 11:254.
- Lebail J.B.E.F (1853). Des lichens, considérés sous le point de vue économique, médical, et physiologique (nutrition) *M.D.thesis*, Faculté de Médecine de Paris, France.
- Lee J., Giordano, S., Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: crosstalk and redox signalling. *Biochem J.*, 441 (2): 523–540.
- Lee, J.H., Amarsanaa, K., Wu, J., Jeon, S.C., Cui, Y., Jung, S.C., Park, D.B., Kim, S.J., Han, S.H., Kim, H.W., Rhyu, I.J., Eun, S.Y. (2018). Nobiletin attenuates neurotoxic mitochondrial calcium overload through K⁺ influx and $\Delta\Psi_m$ across mitochondrial inner membrane. *Korean J Physiol Pharmacol.*, 22(3):311-319.
- Lee, J.M., Johnson, J.A. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol.*, 37(2):139-43.
- Lee, S., Lee, Y., Ha, S., Chung, H.Y., Kim, H., Hur, J.S., Lee, J. (2020). Anti-inflammatory effects of usnic acid in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1730:146642.
- Lee, S., Suh, Y.J., Yang, S., Hong, D.G., Ishigami, A., Kim, H., Hur, J.S., Chang, S.C., Lee, J. (2021). Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Evernic Acid in an MPTP-Induced Parkinson's Disease Model. *Int J Mol Sci.*, 22(4):2098.
- Lee, S.H., Dan. Y. (2012). Neuromodulation of brain states. *Neuron.* 76(1):209-22.
- Leffler, C.W., Parfenova, H., Jaggar, J.H., Wang, R. (2006). Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation. *J Appl Physiol (1985)*, 100(3):1065-76.
- Legouin, B., Lohézic-Le Dévéhat, F., Ferron, S., Rouaud, I., Le Pogam, P., Cornevin, L., Bertrand, M., Boustie, J. (2017). Specialized Metabolites of the Lichen *Vulpicida pinastri* Act as Photoprotective Agents. *Molecules.* 12;22(7):1162.
- Leong, P.K. (2016). Induction of the Glutathione Antioxidant Response/Glutathione Redox Cycling by Nutraceuticals: Mechanism of Protection against Oxidant-Induced Cell Death. *Journal of Nutraceuticals and Food Science*, 1: 1.
- Levin, V.A. (1980). Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J Med Chem.*, (6):682-4.

- Levine, B., Klionsky, D.J. (2017). Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci U S A.*,114(2):201-205.
- Levine, B., Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*,176(1-2):11-42.
- Li, C., Sui, C., Wang, W., Yan, J., Deng, N., Du, X., Cheng, F., Ma, X., Wang, X., Wang, Q. (2021). Baicalin Attenuates Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Injury by Modulating the BDNF-TrkB/PI3K/Akt and MAPK/Erk1/2 Signaling Axes in Neuron-Astrocyte Cocultures. *Front Pharmacol.*, 12:599543.
- Li, Q., Liu, Y., Sun, M. (2017). Autophagy and Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol*, (3):377-388
- Li, W.W., Li, J., Bao, J.K. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.*, 69(7):1125-36.
- Li, X., Song, J., Dong, R. (2019). Cubeben induces autophagy via PI3K-AKT-mTOR pathway to protect primary neurons against amyloid beta in Alzheimer's disease. *Cytotechnology*,71(3):679-686.
- Li, Y., Zhuang, P., Shen, B., Zhang, Y., Shen, J. (2012). Baicalin promotes neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells through modulating p-stat3 and bHLH family protein expression. *Brain Res.* 1429:36-42.
- Liao, K.K., Wu, M.J., Chen, P.Y., y col. (2012). Curcuminoids promote neurite outgrowth in PC12 cells through MAPK/ERK- and PKC-dependent pathways. *J. Agri. Food. Chem.*, 60(1), 433-443.
- Lim, J.S, Yoo, M., Kwon, H.J., Kim, H., Kwon, Y.K. (2010) Wogonin induces differentiation and neurite outgrowth of neural precursor cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 402(1):42-7.
- Lin, M.T., Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*,443(7113):787-95.
- Lindequist, U. (2016). Marine-Derived Pharmaceuticals - Challenges and Opportunities. *Biomol Ther.*, 24(6):561-571.
- Linnaeus, C. (1753). Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Holmiae, Impensis Laurentii Salvii. [L. Salvius, Stockholm.].
- Liot, G., Valette, J., Pépin, J., Flament, J., Brouillet, E. (2017). Energy defects in Huntington's disease: Why "in vivo" evidence matters. *Biochem Biophys Res Commun.*,483(4):1084-1095.
- Lipinski, C.A, Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46(1-3):3-26.
- Lipinski, C.A. (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 44(1):235-49.
- Liu, L., Zhang, Z., Shao, C.L., Wang, J.L., Bai H, Wang, C.Y. (2015). Bioinformatical analysis of the sequences, structures, and functions of fungal polyketide synthase product template domains. *Sci Rep* 5:10463.
- Liu, M., Bai, X., Yu, S., Zhao, W., Qiao, J., Liu, Y., Zhao, D., Wang, J., Wang, S. (2019). Ginsenoside Re inhibits ROS/ASK-1 dependent mitochondrial apoptosis pathway and activation of Nrf2-antioxidant response in beta-amyloid-challenged SH-SY5Y cells. *Molecules*,24:268
- Liu, R., Bian, Y., Liu, L., Liu, L., Liu, X., Ma, S. (2022). Molecular pathways associated with oxidative stress and their potential applications in radiotherapy. *International Journal of Molecular Medicine*, 49, 65.
- Liu, Z., Lansley, A.B., Duong, T.N., Smart, J.D., Pannala, A.S. (2022). Increasing Cellular Uptake and Permeation of Curcumin Using a Novel Polymer-Surfactant Formulation. *Biomolecules*, 12(12):1739
- Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A.C, Dimitrion, P, Zuo, L. (2017). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:2525967.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.*, 4(8):118-26.
- Loewi, O., Navratil, E. (1926). Übertragbarkeit der Herznevenwirkung, X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoffs. *Pflugers Arch* 214:678-688.

- Lombardo, S.M.; Schneider, M.; Türeli, A.E.; Günday Türeli, N. (2020). Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design. *Beilstein J Nanotechnol*, 11, 866-883.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6):1194-217.
- Lotankar, S., Prabhavalkar, K.S., Bhatt, L.K. (2017). Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neurosci Bull*, 33(5):585-597.
- Loy, C.T., Schofield, P.R., Turner, A.M., Kwok, J.B. (2014). Genetics of dementia. *Lancet*, 383(9919):828-40.
- Lu, J., Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*, 66:75-87.
- Lücking, R., Leavitt, S.D., Hawksworth, D.L. (2021). Species in lichen-forming fungi: balancing between conceptual and practical considerations, and between phenotype and phylogenomics. *Fungal Diversity* 109, 99–154.
- Ludwig, P.E., Reddy, V., Varacallo, M. (2023). Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS). *StatPearls Publishing*.
- Luo, H., Li, C., Kim, J.C., Liu, Y., Jung, J.S., Koh, Y.J., Hur, J.S. (2013). Biruloquinone, an acetylcholinesterase inhibitor produced by lichen-forming fungus *Cladonia macilentata*. *J Microbiol Biotechnol*, 23(2):161-6.
- Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53:401-26.
- MacDonald, A., Lu, B., Caron, M., Caporicci-Dinucci, N., Hatrock, D., Petrecca, K., Bourque, G., Stratton, J.A. (2021). Single Cell Transcriptomics of Ependymal Cells Across Age, Region and Species Reveals Cilia-Related and Metal Ion Regulatory Roles as Major Conserved Ependymal Cell Functions. *Front Cell Neurosci*, 15:703951.
- Macías, J.A. (2021). Enhancing card sorting dendrograms through the holistic analysis of distance methods and linkage criteria. *J. Usability Studies* 16, (2): 73–9.
- Madgula, V.L., Avula, B., Yu, Y.B., Wang, Y.H., Tchanchou, F., Fisher, S. Luo, Y. Khan, I.A. Khan, S.I. (2010). Intestinal and blood-brain barrier permeability of ginkgolides and bilobalide: in vitro and in vivo approaches. *Planta Med*. 76(6):599-606.
- Madreiter-Sokolowski, C.T., Thomas, C., Ristow, M. (2020). Interrelation between ROS and Ca²⁺ in aging and age-related diseases. *Redox Biol*, 36:101678.
- Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E.X., Zerlin, M. (2001). Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 49(3):279-88.
- Mahmood, Z., Shukla, Y. (2010). Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res*, 316(6):887-99.
- Mahringer, A., Fricker, G. (2016). ABC transporters at the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, (5):499-508.
- Maiese, K.; Chong, Z.Z.; Wang, S.; Shang, Y.C. (2012). Oxidant Stress and Signal Transduction in the Nervous System with the PI 3-K, Akt, and mTOR Cascade. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 13830-13866.
- Malaspina, P., Catellani, E., Burlando, B., Brignole, D., Cornara, L., Bazzicalupo, M., Candiani, S., Obino, V., De Feo, V., Caputo, L., Giordani, P. (2020). Depigmenting potential of lichen extracts evaluated by in vitro and in vivo tests. *PeerJ*;8: e9150.
- Malikova, I.N., Strakhovenko, V.D., Shcherbov, B.L. (2019). Distribution of radionuclides in moss-lichen cover and needles on the same grounds of landscape-climatic zones of Siberia. *J Environ Radioact*, 198:64-78.
- Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M. y col. (2012). Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*, 19: 1166-1172.
- Mapari, S., Gaikwad, S., Khare, R., Syed, M., Doshi, P., Behera, B.C. (2021). Neuroprotective potential of selected lichen compounds on mouse neuroblastoma (N2a) cells. *EXCLI J*, 20:491-494.
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F.K., Margis-Pinheiro, M. (2020). Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J* 275(15):3959-70.

- Marucci, G., Buccioni, M., Ben, D.D., Lambertucci, C., Volpini, R., Amenta, F. (2021). Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 190:108352.
- Massoulié, J., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Morel, N., Simon, S. (1998). Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *J Physiol Paris*, 92(3-4):183-90.
- Massoulié, J., Sussman, J., Bon, S., Silman, I. (1993): Chapter 15: Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Progress in Brain Research*, 98, 139-146.
- Mateos-Aparicio, P., Rodríguez-Moreno, A. (2009). The Impact of Studying Brain Plasticity. *Front Cell Neurosci*, 13:66.
- Matos, P., Geiser, L., Hardman, A., Glavich, D., Pinho, P., Nunes, A., Soares, A.M.V.M., Branquinho, C. (2017). Tracking global change using lichen diversity: towards a global-scale ecological indicator. *Methods Ecol Evol*, 8: 788-798.
- Mattson, M. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 120–130.
- Mattson, M.P. (2007). Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal*, 8(11-12):1997-2006.
- Maulidiyah Maulidiyah, M.N., Nazila, W., Musdalifah, A., Salim, L.O.A., Nurdin, M. (2021). Isolation and antibacterial activity of diffractic acid compound from lichen *Usnea blepharea* Motyka. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 11, 121–130.
- McColgan, P., Tabrizi, S.J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *Eur J Neurol*, 25(1):24-34.
- Melo, M.G.; dos Santos, J.P.; Serafini, M.R.; Caregnato, F.F.; Pasquali, M.A.; Rabelo, T.K.; da Rocha, R.F.; Quintans, L.; Araújo, A.A.; da Silva, F.A.; y col. (2011). Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicol. In Vitro*, 25, 462–468.
- Meng, F.; Xi, Y.; Huang, J.; Ayers, P.W. (2021). A curated diverse molecular database of blood-brain barrier permeability with chemical descriptors. *Scientific Data*, 8, 289.
- Michinaga, S., Koyama, Y. (2019). Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function after Brain Damage. *Int. J. Mol.Sci.*, 20(3):571.
- Mikitsh, J.L., Chacko, A.M. (2014). Pathways for small molecule delivery to the central nervous system across the blood-brain barrier. *Perspect Medicin Chem.*, 6:11-24.
- Millot, M., Dieu, A., Tomasi, S. (2016). Dibenzofurans and derivatives from lichens and ascomycetes. *Nat Prod Rep.*, 33(6):801-11.
- Ming, G.L., Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4):687-702.
- Mirza, F.J., Amber, S., Sumera, H.D, Ahmed, T., Zahid, S. (2021). Rosmarinic acid and ursolic acid alleviate deficits in cognition, synaptic regulation and adult hippocampal neurogenesis in an A β ₁₋₄₂-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Phytomedicine*.153490.
- Mishra G.K., Upreti, D.K. (2015). Altitudinal distribution of cetrarioid lichens in Govind Wildlife Sanctuary, Garhwal Himalaya, Uttarakhand, India. *Geophytology* 45(1): 9-19.
- Mishra, A., Reynolds, J.P., Chen, Y., Gourine, A.V., Rusakov, D.A., Attwell, D. (2016). Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat Neurosci.*, 19(12):1619-1627.
- Mohammadi, M., Bagheri, L., Badreldin, A., Fatehi, P., Pakzad, L., Suntres, Z., van Wijnen, A.J.(2022). Biological Effects of Gyrophoric Acid and Other Lichen Derived Metabolites, on Cell Proliferation, Apoptosis and Cell Signaling pathways. *Chem Biol Interact.*, 351:109768.
- Morén, C., deSouza, R.M., Giraldo, D.M., Uff, C. (2022). Antioxidant Therapeutic Strategies in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.*, 23(16):9328.
- Morris, J.C. (2013). Neurodegenerative disorders of aging: the downside of rising longevity. *Mo Med.*, 110(5):393-4.
- Morris, M.E., Rodriguez-Cruz, V., Felmler, M.A. (2017). SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. *AAPS J.*, 19(5):1317-1331.

- Moss, D.E. (2020). Improving Anti-Neurodegenerative Benefits of Acetylcholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease: Are Irreversible Inhibitors the Future? *Int J Mol Sci.*,21(10):3438.
- Müller, K. (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 56(1-2):9-16.
- Münch, C., Dikic. I. (2018). Hitchhiking on selective autophagy. *Nat Cell Biol.*,20(2):122-124.
- Nageli, C.W., Schwendener, S. (1867). Das Mikroskop. II. Teil. Die Anwendung des Mikroskops. Leipzig
- Naik, P., Cucullo, L. (2012). In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J Pharm Sci.*, 101(4):1337-54.
- Nan C, Guo L, Zhao Z, et al. Tetramethylpyrazine induces differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Onc* 48(1), 2287-2294 (2016)
- Nash III, T. H. Lichen biology. 2nd. ed.
- Nasim, N., Sandeep, I.S., Mohanty, S. (2022). Plant-derived natural products for drug discovery: current approaches and prospects. *Nucleus.*,65(3):399-411.
- Naziroğlu M. (2011). TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res.*,36:355–366.
- Negre-Salvayre, A., Auge, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R. y col (2010). Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.*, 44(10):1125-71.
- Nellsen, M., Chavez, N., Sacket-Hermann, E., Thell, A., Randlane, T., Divakar, P., Rico, V., Lumbsch, T. (2011). The cetrarioid core group revisited (Lecanorales: Parmeliaceae). *The Lichenologist.* 43. 537-551.
- Nguyen, K.H., Chollet-Krugler, M., Gouault, N., Tomasi, S. (2013). UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat Prod Rep.*,30 (12):1490-508.
- Nguyen, T.T., Yoon, S., Yang, Y., Lee, H.B., Oh, S., Jeong, M.H., Kim, J.J., Yee, S.T., Crişan, F., Moon, C., Lee, K.Y., Kim, K.K., Hur, J.S., Kim, H. (2014). Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. *PLoS One.*, 9(10): e111575.
- Ni, G. X., Liang, Ce., Wang J., Duan, C.Q, Wang P., Wang Y. (2020). Astragaloside IV improves neurobehavior and promotes hippocampal neurogenesis in MCAO rats through BDNF-TrkB signaling pathway, *Biomed. Pharmacother.*,130,110353.
- Ni, Z.; Nie, X.; Zhang, H.; Wang, L.; Geng, Z.; Du, X.; Qian, H.; Liu, W.; Liu, T.(2022). Atranorin driven by nano materials SPION lead to ferroptosis of gastric cancer stem cells by weakening the mRNA 5-hydroxymethylcytidine modification of the Xc-/GPX4 axis and its expression. *Int. J. Med. Sci.*,19, 1680–1694.
- Nichols, E. y col. (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, 7 (2): e105 - e125.
- Nimis, P.L., Lazzarin, G., Lazzarin, A., Skert, N. (2000). Biomonitoring of trace elements with lichens in Veneto (NE Italy). *Sci Total Environ.*,255(1-3):97-111.
- Nopoulos, P.C. (2016). Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum. *Dialogues Clin Neurosci.*, 18(1):91-8.
- Nylander, M.W. (1866) Les Lichens Du Jardin Du Luxembourg. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 13, 364-371.
- Ogwu, M., Osawaru, M. (2016). Principal component analysis: A tool for multivariate analysis of genetic variability. *Afr. J. Plant Sci.*
- Oh, J.M.; Kim, Y.J.; Gang, H.S.; Han, J.; Ha, H.H.; Kim, H. (2018). Antimicrobial Activity of Divaricatic Acid Isolated from the Lichen *Evernia mesomorpha* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 23, 3068.
- Oku, M., Sakai, Y. (2018). Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *Bioessays*, 40(6): e1800008.

- Onder, S., Schopfer, L.M., Jiang, W., Tacal, O., Lockridge, O. (2022). Butyrylcholinesterase in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, 90:1-9.
- Orozco-Ibarra, M., Pedraza-Chaverri, J. (2010). Hemo oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central. *Arch Neurocién*, 15 (1): 47-55.
- Øvstedal, D. O., Tønberg, T., Elvebakk, A. (2009). The lichen flora of Svalbard. *Sommerfeltia*, 33: 1-393.
- Padayatty, S.J., Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis.*, 22(6):463-93.
- Palop, J.J., Chin, J., Mucke, L. (2006). A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113):768-73.
- Paluszczak, J., Kleszcz, R., Studzińska-Srokam E, y col. (2018). Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem.*, 441: 109-124.
- Panieri, E., Santoro, M.M. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.*, 7(6): e2253.
- Park, S.E., Kim, N.D., Yoo, Y.H. (2004). Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res.*, 64(8):2652-5
- Partridge, L., Fuentealba, M., Kennedy, B.K. (2020). The quest to slow ageing through drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, 19(8):513-532.
- Pavlovic, V., Stojanovic, I., Jadranin, M. y col. (2013). Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. *Food Chem Toxicol*, 51: 160-164.
- Pawera, L., Łuczaj, Ł., Pieroni, A., Polesny, Z. (2017). Traditional Plant Knowledge in the White Carpathians: Ethnobotany of Wild Food Plants and Crop Wild Relatives in the Czech Republic. *Human Ecology*. 45. 1-17.
- Per Brodal. (2010). The Central Nervous System: Structure and Function. *Oxford University Press*, USA.
- Peralta, M.A.; da Silva, M.A.; Ortega, M.G.; Cabrera, J.L.; Paraje, M.G. (2017). Usnic acid activity on oxidative and nitrosative stress of azole-resistant *Candida albicans* biofilm. *Planta Med.*, 83, (3-04), 326-333.
- Percário, S., da Silva, Barbosa, A., Varela, E.L.P., Gomes, A.R.Q., Ferreira, M.E.S., de Nazaré Araújo Moreira, T., Dolabela, M.F. (2020). Oxidative Stress in Parkinson's Disease: Potential Benefits of Antioxidant Supplementation. *Oxid Med Cell Longev.*:2360872.
- Perrier, N.A., Salani, M., Falasca, C., Bon, S., Augusti-Tocco, G., Massoulié, J. (2006). Readthrough acetylcholinesterase expression remains minor after stress or exposure to inhibitors. *J Mol Neurosci.*, 30(1-2):75-6.
- Perry, J.J., Shin, D.S., Getzoff, E.D., Tainer, J.A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta.*, 1804(2):245-62.
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.*, 30(1):11-26.
- Picone, P., Bondim, M.L., Montana, G., Bruno, A., Pitarresi, G., Giammonam G., Di Carlo, M. (2009). Ferulic acid inhibits oxidative stress and cell death induced by Ab oligomers: improved delivery by solid lipid nanoparticles. *Free Radic Res.*, 43(11):1133-45.
- Pineda-Ramírez, N., Alquisiras-Burgos, I., Ortiz-Plata, A., Ruiz-Tachiquín, M.E., Espinoza-Rojo, M., Aguilera, P. (2020). Resveratrol Activates Neuronal Autophagy Through AMPK in the Ischemic Brain. *Mol Neurobiol.*, 57(2):1055-1069.
- Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.*, 97:55-74.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.*, 8416763.

- Platzer, M., Kiese, S., Tybussek, T., Herfellner, T., Schneider, F., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. (2022). Radical Scavenging Mechanisms of Phenolic Compounds: A Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) Study. *Front Nutr.*, 9:882458.
- Poelt, J. (1973). Classification. In: *The Lichens*. Academic Press, New York, 599–632.
- Poller, B., Gutmann, H., Krähenbühl, S., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.O., Tuffin, G., Drewe, J., Huwyler, J. (2008) The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. *J Neurochem.*, 107(5):1358-68.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci.*, 38(7):592-607.
- Porada, P., Giordani, P. (2021). Bark Water Storage Plays Key Role for Growth of Mediterranean Epiphytic Lichens. *Front. For. Glob. Change*, 4:668682.
- Porter, A.G, Jänicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, 6(2):99-104.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem.*, 53:4290-302.
- Puderbaugh, M., Emmady, P.D. (2023). Neuroplasticity. In *StatPearls Publishing*.
- Puris, E., Fricker, G., Gynther, M. (2022). Targeting Transporters for Drug Delivery to the Brain: Can We Do Better? *Pharm Res* 39, 1415–1455.
- Radak, Z., Zhao, Z., Goto, S., Koltai, E. (2011). Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol Aspects Med.*, 32(4-6):305-15.
- Rahimi, V.B., Askari, V.R., Mousavi, S.H. (2018). Ellagic acid reveals promising anti-aging effects against d-galactose-induced aging on human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y: A mechanistic study. *Biomed Pharmacother.*, 108:1712-1724.
- Rahman, N.A., Rasil, A.N.H.M., Meyding-Lamade, U., Craemer, E.M., Diah, S., Tuah, A.A., Muharram, S.H. (2016). Immortalized endothelial cell lines for in vitro blood-brain barrier models: A systematic review. *Brain Res.*, 1642:532-545.
- Rai, H., Upreti, D.K. (2013). Terricolous Lichens in India: Morphotaxonomic Studies. *Springer New York*
- Ramis, I.B.; Vianna, J.S.; Reis, A.J.; von Groll, A.; Ramos, D.F.; Viveiros, M.; da Silva, P.E.A. (2018). Antimicrobial and efflux inhibitor activity of usnic acid against *Mycobacterium abscessus*. *Planta Med*, 84, (17), 1265-1270.
- Randlane, T., Saag, A. (1993). World list of cetrarioid lichens. *Mycotaxon*, 47: 395–403.
- Randlane, T., Saag, A. (1998). Synopsis of the genus *Nephromopsis* (fam. Parmeliaceae, lichenized Ascomycota). *Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie* 19: 175–191.
- Randlane, T., Saag, A. (2007). Cetrarioid lichens in the southern hemisphere, an identification key and distribution patterns of the species. In: I. Kärnefelt & A. Thell (eds), *Lichenological Contributions in Honour of David Galloway, Bibliotheca Lichenologica* 95: 489–499.
- Randlane, T., Thell, A., Saag, A. (1995). New data about the genera *Cetrariopsis*, *Cetrelia* and *Nephromopsis* (fam. Parmeliaceae). *Acta Botanica Fennica*, 150: 143-151.
- Ransy, C., Vaz, C., Lombès, A., Bouillaud, F. (2020). Use of H₂O₂ to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. *Int J Mol Sci.*, 21(23):9149.
- Rashedi, I., Panigrahi, S., Ezzati, P., Ghavami, S., Los, M. (2007). Autoimmunity and apoptosis--therapeutic implications. *Curr Med Chem.*, 14(29):3139-51.
- Reddy, D.S., Abeygunaratne, H.N. (2022). Experimental and Clinical Biomarkers for Progressive Evaluation of Neuropathology and Therapeutic Interventions for Acute and Chronic Neurological Disorders. *Int J Mol Sci.*, 23(19):11734.

- Reddy, R.G., Veeraval, L., Maitra, S., Chollet-Krugler, M., Tomasi, S., Dévéhat, F.L., Boustie, J., Chakravarty, S. (2016). Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics. *Phytomedicine*, 23(12):1527-1534.
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1863(12):2977-2992.
- Reed, J.C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17(25):3225-36.
- Regnault, J.B. (1802). Observations on pulmonary consumption, or an essay on the Lichen islandicus, considered both as an ailment and a medicine in that disorder. London, J. Smeeton.
- Reiter, R.J., Mayo, J.C., Tan, D.X., Sainz, R.M., Alatorre-Jiménez, M., Qin, L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res.*, 61(3):253-78.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Leon, J., Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.*, 50(4):1129-46.
- Rekha, K.R., Inmozhi Sivakamasundari, R. (2018). Geraniol Protects Against the Protein and Oxidative Stress Induced by Rotenone in an *In Vitro* Model of Parkinson's Disease. *Neurochem Res.*, 43(10):1947-1962.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.*, 20(7):933-56.
- Rink, C., Khanna, S. (2011). Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke. *Antioxid Redox Signal.*, 14(10):1889-903.
- Russo, P., Frustaci, A., Del Bufalo, A., Fini, M., Cesario, A. (2013). Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease. *Curr Med Chem.* 2013;20(13):1686-93.
- Ryan, K.C., Ashkavand, Z., Norman, K.R. (2020). The Role of Mitochondrial Calcium Homeostasis in Alzheimer's and Related Diseases. *Int J Mol Sci.*, 21(23):9153.
- Ryter, S.W., Otterbein, L.E., Morse, D., Choi, A.M. (2002). Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem.* 2002, 234-235(1-2):249-63.
- Sabatini, M., Comba, S., Altabe, S., Recio-Balsells, A.I., Labadie, G.R., Takano, E., Gramajo, H., Arabolaza, A. (2018). Biochemical characterization of the minimal domains of an iterative eukaryotic polyketide synthase. *FEBS J*, 285(23):4494-4511.
- Saib, H., Yekkour, A., Toumi, M., Guediou, B., Benamar, M.A. y col. (2023). Lichen biomonitoring of airborne trace elements in the industrial-urbanized area of eastern Algiers (Algeria). *Atmospheric Pollution Research*, 14 (1), pp.101643.
- Salinas, A.E, Wong, M.G. (1999). Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem.*, 6(4):279-309.
- Salminen, L.E., Paul, R.H. (2014). Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. *Rev Neurosci.*, 25(6):805-19.
- San Miguel-Chávez, R. (2017). Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. InTech.
- Sánchez-Martínez, J.D., García, A.R., Álvarez-Rivera, G., Valdés, A., Brito, M.A., Cifuentes, A. (2022). In Vitro Study of the Blood-Brain Barrier Transport of Natural Compounds Recovered from Agrifood By-Products and Microalgae. *Int J Mol Sci.*, 24(1):533.
- Sánchez-Martínez, J.D., García, A.R., Álvarez-Rivera, G., Valdés, A., Brito, M.A., Cifuentes, A. (2022). In Vitro Study of the Blood-Brain Barrier Transport of Natural Compounds Recovered from Agrifood By-Products and Microalgae. *Int J Mol Sci.*, 24(1):533.
- Sancho, L.G.; Pintado, A.; Green, T.G.A. (2019). Antarctic Studies Show Lichens to be Excellent Biomonitoring of Climate Change. *Diversity*, 11, 42.

- Satarker, S., Bojja, S.L., Gurram, P.C., Mudgal, J., Arora, D., Nampoothiri, M. (2022). Astrocytic Glutamatergic Transmission and Its Implications in Neurodegenerative Disorders. *Cells*,11(7):1139.
- Sato, H., Hara, K., Komine, M., Yamamoto, Y. (2011). Analysis of lichen substances including triterpenoids by high performance liquid chromatography with a differential refractive index detector and a photodiode array detector. *Mycosystema*,30 (6):944-949.
- Schallreuter, K.U., Gibbons, N.C., Zothner, C., Elwary, S.M., Rokos, H., Wood, J.M.(2006). Butyrylcholinesterase is present in the human epidermis and is regulated by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun.*,349(3):931-8.
- Schoch y col. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 6241–6246
- Schultz, L., Zurich, M.G., Culot, M., da Costa, A., Landry, C., Bellwon, P., Kristl, T., Hörmann, K. y col. (2015). Evaluation of drug-induced neurotoxicity based on metabolomics, proteomics, and electrical activity measurements in complementary CNS in vitro models. *Toxicol In Vitro.*,30(1):138-65.
- Seaward, M. R. D. y col. (1988). Recent levels of radionuclides in lichens from southwest Poland with particular reference to ¹³⁴Cs and ¹³⁷Cs. *Journal of Environmental Radioactivity*, 7, 123-129.
- Seminara, A., Fritz, J., Brenner, M.P., Pringle, A. (2018). A universal growth limit for circular lichens. *J R Soc Interface.*, 15(143):20180063.
- Sena, L.A., Chandel, N.S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*, 48(2):158-67.
- Sharma, G., Sharma, A.R., Lee, S.S., Bhattacharya, M., Nam, J.S., Chakraborty, C. (2019). Advances in nanocarriers enabled brain targeted drug delivery across blood brain barrier. *Int J Pharm.*, 559:360-372.
- Sharma, R.A., Euden, S.A., Platton, S.L., Cooke, D.N., Shafayat, A., Hewitt, H.R., Marczylo, T.H., Morgan, B., Hemingway, D., Plummer, S.M., Pirmohamed, M., Gescher, A.J., Steward, W.P. (2004). Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res.*,10(20):6847-54.
- Shaukat, Z., Liu, D., Hussain, R., Khan, M., Gregory, S.L. (2016). The Role of JNK Signalling in Responses to Oxidative DNA Damage. *Curr Drug Targets.*, 17(2):154-63.
- Sheth, B.P., Thaker, V.S. (2017). DNA barcoding and traditional taxonomy: an integrated approach for biodiversity conservation. *Genome.*, 60(7):618-628.
- Shi, G., Zhou, J., Huang, K., Bi, F.F. (2022). Trends in global amyotrophic lateral sclerosis research from 2000 to 2022: A bibliometric analysis. *Front Neurosci.*, 16:965230.
- Shichiri, M. (2014). The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *J Clin Biochem Nutr.*, 54(3):151-60.
- Shishido, T.K.; Wahlsten, M.; Laine, P.; Rikkinen, J.; Lundell, T.; Auvinen, P. (2021). Microbial Communities of *Cladonia* Lichens and Their Biosynthetic Gene Clusters Potentially Encoding Natural Products. *Microorganisms*,9, 1347.
- Shrestha, G., Raphael, J. Leavitt, S.D., St. Clair, L.L. (2014). *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of extracts from 34 species of North American lichens. *Pharmaceutical Biology*, 52:10, 1262-1266.
- Sieteiglesias, V., González-Burgos, E., Bermejo-Bescós, P., Divakar, P.K., Gómez-Serranillos, M.P. (2019). Lichens of Parmelioid Clade as Promising Multitarget Neuroprotective Agents. *Chem Res Toxicol.*, 32(6):1165-1177.
- Sifuentes-Franco, S., Sánchez-Macías, D.C., Carrillo-Ibarra, S., Rivera-Valdés, J.J., Zuñiga, L.Y., Sánchez-López, V.A. (2022). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coenzyme Q10 Supplementation on Infectious Diseases. *Healthcare (Basel)*, 10(3):487.
- Silman, I., Sussman, J.L. (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol.*,5(3):293-302.
- Silver, A. (1974). The Biology of Cholinesterases. North-Holland, Amsterdam.

- Singh, G. (2023). Linking Lichen Metabolites to Genes: Emerging Concepts and Lessons from Molecular Biology and Metagenomics. *J. Fungi*, 9, 160.
- Singh, R., Sadiq, N.M. (2023). Cholinesterase Inhibitors. In *StatPearls Publishing*.
- Singh, S., Singh, P., Ravindra, R. (2011). Screening of antioxidant potential of Arctic lichens. *Polar Biology*, 34, 1775-1782.
- Sisodia, R.; Geol, M.; Verma, S.; Rani, A.; Dureja, P. (2013). Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. *Nat. Prod. Res.*, 27, 2235–2239.
- Small D.H., Michaelson, S. Sberna, G. (1996). Non-classical actions of cholinesterases: Role in cellular differentiation, tumorigenesis, and Alzheimer's disease, *Neurochemistry International*, 28, (5–6): 453-483.
- Smeyne, M., Smeyne, R.J. (2013). Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.*, 62:13-25.
- Smith-Dijak, A.I., Sepers, M.D., Raymond, L.A. (2019). Alterations in synaptic function and plasticity in Huntington disease. *J Neurochem.*, 150(4):346-365.
- Smyrska-Wieleba, N., Mroczek, T. (2023). Natural Inhibitors of Cholinesterases: Chemistry, Structure-Activity and Methods of Their Analysis. *Int J Mol Sci.*, 24(3):2722.
- Sohrabi, M., Lücking, R., Lumbsch, H.T. (2014). One hundred and seventy-five new species of Graphidaceae – a special issue of *Phytotaxa*. *Phytotaxa* 189:5–6.
- Solár, P.; Hřčková, G.; Koptašiková, L.; Velebný, S.; Solárová, Z.; Bačkor, M. (2016). Murine breast carcinoma 4T1 cells are more sensitive to atranorin than normal epithelial NMuMG cells *in vitro*: Anticancer and hepatoprotective effects of atranorin *in vivo*. *Chem. Biol. Interact.* 250, 27–37.
- Song, H., Kim, K.T., Park, S.Y., Lee, G.W., Choi, J., Jeon, J., Cheong, K., Choi, G., Hur, J.S., Lee, Y.H. (2022). A comparative genomic analysis of lichen-forming fungi reveals new insights into fungal lifestyles. *Sci Rep.*, 12(1):10724.
- Soreq, H., Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.*, 2(4):294-302.
- Sorkin, B.C., Kuszak, A.J., Bloss, G., Fukagawa, N.K., Hoffman, F.A. y col. (2020). Improving natural product research translation: From source to clinical trial. *FASEB J.*, 34(1):41-65.
- Spribille, T., Resl, P., Stanton, D.E., Tagirdzhanova, G. (2022). Evolutionary biology of lichen symbioses. *New Phytol*, 234: 1566-1582.
- Stadnytska, N.; Fito, I.; Novikov, V.; Jasicka-Misiak, I.; Wieczorek, P. (2020). Effect of extraction solvent on total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Cetraria islandica*. *Int. J. Pharmtech Res.* 13, 198-205.
- Stamatovic, S.M., Johnson, A.M., Keep, R.F., Andjelkovic, A.V. (2016). Junctional proteins of the blood-brain barrier: new insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers.*, 4(1): e1154641.
- Stocker-Wörgötter, E. (2008). Metabolic diversity of lichen forming, ascomycetous fungi: culturing, production of polyketides and shikimi acid derivatives, and PKS genes. *Nat. Prod. Rep.*, 25: 188-200.
- Stocker-Wörgötter, E., Cordeiro, L.M.C, Iacomini, M. (2014). Accumulation of potential pharmaceutically relevant metabolites in lichens and cultured lichen symbionts. In *Studies in Natural Product Chemistry*, 337-380.
- Studzińska-Sroka, E., Majchrzak-Celińska, A., Zalewski, P., Szwajgier, D., Baranowska-Wójcik, E., Kaproń, B., Plech, T., Żarowski, M., Cielecka-Piontek, J. (2021). Lichen-Derived Compounds and Extracts as Biologically Active Substances with Anticancer and Neuroprotective Properties. *Pharmaceuticals*. 2021,14(12):1293.
- Studzińska-Sroka, E.; Majchrzak-Celińska, A.; Zalewski, P.; Szwajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Żarowski, M.; Plech, T.; Cielecka-Piontek, J. (2021). Permeability of *Hypogymnia physodes* Extract Component—Physodic Acid through the Blood–Brain Barrier as an Important Argument for Its Anticancer and Neuroprotective Activity within the Central Nervous System. *Cancers*, 13, 1717.
- Sugimoto, H., Ogura, H., Arai, Y., Limura, Y., Yamanishi, Y. (2002). Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *Jpn J Pharmacol.*, 89(1):7-20.

- Suwalsky, M.; Jemiola-Rzeminska, M.; Astudillo, C.; Gallardo, M.J.; Staforelli, J.P.; Villena, F.; Strzalka, K. (2015). An *in vitro* study on the antioxidant capacity of usnic acid on human erythrocytes and molecular models of its membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1848: (11), 2829-2838.
- Szczepańska, K. (2017). *Cetrariella commixta* and the Genus *Melanelia* (Parmeliaceae, Ascomycota) in Poland. *Herzogia*, 30(1):272-288.
- Tabrizi, S.J., Estevez-Fraga, C., van Roon-Mom, W.M.C., Flower, M.D., Scahill, R.I., Wild, E.J., Muñoz-Sanjuan, I., Sampaio, C., Rosser, A.E., Leavitt, B.R. (2022). Potential disease-modifying therapies for Huntington's disease: lessons learned and future opportunities. *Lancet Neurol.*, 21(7):645-658.
- Tajes, M., Ramos-Fernández, E., Weng-Jiang, X., Bosch-Morató, M., Guivernau, B., Eraso-Pichot, A., Salvador, B., Fernández-Busquets, X., Roquer, J., Muñoz, F.J. (2014). The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Mol Membr Biol.*, 31(5):152-67.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W.B., Karbownik, M., Calvo, J.R. (2000). Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept.*, 9(3-4):137-59.
- Tang, F., Guo, S., Liao, H., Yu, P., Wang, L., Song, X., Chen, J., Yang, Q. (2017). Resveratrol Enhances Neurite Outgrowth and Synaptogenesis Via Sonic Hedgehog Signaling Following Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation Injury. *Cell Physiol Biochem.*, 43(2):852-869.
- Tang, V.W., Goodenough, D.A. (2003). Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J.*, 84(3):1660-73.
- Tapsell, L.C., Neale, E.P., Probst, Y. (2019). Dietary Patterns and Cardiovascular Disease: Insights and Challenges for Considering Food Groups and Nutrient Sources. *Curr Atheroscler Rep.*, 21(3):9.
- Tay, T., Türk, A.O., Yilmaz, M. y col. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Z Naturforsch C J Biosci*, 59: 3 84-388.
- Teleanu, D.M., Niculescu, A.G., Lungu, I. I, Radu, C.I., Vladăncenco, O., Roza, E., Costăchescu, B, G.rumezescu, A.M., Teleanu, R.I. (2022). An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.*, 23(11):5938.
- Tewari, D., Stankiewicz, A.M., Mocan, A., Sah, A.N., Tzvetkov, N.T., Huminiecki, L., Horbańczuk, J.O., Atanasov, A.G. (2018). Ethnopharmacological Approaches for Dementia Therapy and Significance of Natural Products and Herbal Drugs. *Front Aging Neurosci.*, 10:3.
- Thadhani, V.M.; Choudhary, M.I.; Ali, S.; Omar, I.; Siddique, H.; Karunaratne, V. (2011). Antioxidant activity of some lichen metabolites. *Nat. Prod. Res.*, 25, 1827-1837.
- Thell, A. y col. (2009). Phylogeny of the cetrarioid core (Parmeliaceae) based on five genetic markers. *Lichenologist*, 41:489-511
- Thell, A., Crespo, A., Divakar, P.K., Kärnefelt, I., Leavitt, S.D., Lumbsch, H.T. and Seaward, M.R.D. (2012). A review of the lichen family Parmeliaceae – history, phylogeny and current taxonomy. *Nordic Journal of Botany*, 30: 641-664.
- Thell, A., Goward, T., Randlane, T., Kärnefelt, I., Saag, A. (1995). A Revision of the North American Lichen Genus *Ahtiana* (Parmeliaceae). *Bryologist*. 98.
- Thell, A., Randlane, T., Saag, A. & Kärnefelt, I. (2005). A new circumscription of the lichen genus *Nephromopsis* (Parmeliaceae, lichenized Ascomycetes). *Mycological Progress*, 4(4): 303-316.
- Thell, A., Stenroos, S., Feuerer, T. y col. (2002). Phylogeny of cetrarioid lichens (Parmeliaceae) inferred from ITS and β -tubulin sequences, morphology, anatomy and secondary chemistry. *Mycol Progress* 1, 335-354.
- Thomson, J. W. (1984). American Arctic Lichens. 1. The Macrolichens. *Columbia University Press*.
- Thomson, J., Bird, C. (2011). The lichen genus *Dactylina* in North America. *Canadian Journal of Botany*, 56. 1602-1624.

- Tomovic, J.; Rancic, A.; Vasiljević, P.; Maskovic, P.; Zivanovic, S.; Manojlovic, N.; Sovrlić, M. (2015). Antioxidant activity of lichen *Cetraria aculeata*. *Praxis medica*, 44, 107-113.
- Tönnies, E., Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.*, 57(4):1105-1121.
- Torres-Benítez, A., Ortega-Valencia, J.E., Sanchez, M., Divakar, P.K., Simirgiotis, M.J., Gómez-Serranillos, M.P. (2022). Metabolomic Profiling, Antioxidant and Enzyme Inhibition Properties and Molecular Docking Analysis of Antarctic Lichens. *Molecules*, 27(22):8086.
- Tosatto, S.C., Bosello, V., Fogolari, F., Mauri, P., Roveri, A., Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Maiorino, M. (2008). The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxid Redox Signal.*, 10(9):1515-26.
- Trest, M. T., et al. (2015). Potential impacts of UV exposure on lichen communities: a pilot study of *Nothofagus dombeyi* trunks in southernmost Chile. *Ecosyst. Health Sustain.*, 1(4):1-12.
- Trist, B.G., Hare, D.J., Double, K.L. (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell.*, 18(6): e13031.
- Vakalopoulos, C. (2017). Alzheimer's Disease: The Alternative Serotonergic Hypothesis of Cognitive Decline. *J Alzheimers Dis.* 60(3):859-866.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 39(1):44-84.
- van der Helm, M.W., Odijk, M., Frimat, J.P., van der Meer, A.D., Eijkel, J.C.T., van den Berg, A., Segerink, L.I. (2016). Direct quantification of transendothelial electrical resistance in organs-on-chips. *Biosens Bioelectron.*, 85:924-929.
- Vidoni, C., Secomandi, E., Castiglioni, A., Melone, M.A.B., Isidoro, C. (2018). Resveratrol protects neuronal-like cells expressing mutant Huntingtin from dopamine toxicity by rescuing ATG4-mediated autophagosome formation. *Neurochem Int.*, 117:174-187.
- Vijay, N., Morris, M.E. (2014). Role of monocarboxylate transporters in drug delivery to the brain. *Curr Pharm Des.*, 20(10):1487-98.
- Virchow, R. (1856). Über das granuliert Ansehen der Wandungen der Gerhirnventrikel. *Allg. Z. Psychiatr.*, 3:424-50.
- Wachtel-Galor, S., Benzie, I.F.F. (2011). Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs. In *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Walker, M. D. (1989). Microhabitat Preferences of *Dactylina Arctica* and *D. Beringica* on Pingos in Northern Alaska. *The Bryologist*, 92(4) 467-72.
- Wang, N., Qiu, P., Cui, W., Yan, X., Zhang, B., He, S. (2019). Recent Advances in Multi-target Anti-Alzheimer Disease Compounds (2013 Up to the Present). *Curr Med Chem.*, 26(30):5684-5710.
- Wang, R., Reddy, P.H. (2017). Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.*, 57(4):1041-1048.
- Wang, R.F., Wei, X. L., We, J.C. (2015). The genus *Allocetraria* (Parmeliaceae) in China. *Mycotaxon.*, 130, 577-591.
- Wang, S.F., Liu, L.F., Wu, M.Y., Cai, C.Z., Su, H., Tan, J., Lu, J.H., Li, M. (2017). Baicalein prevents 6-OHDA/ascorbic acid-induced calcium-dependent dopaminergic neuronal cell death. *Sci Rep.*, 7(1):8398.
- Wang, Y., Geng, C., Yuan, X., Hua, M., Tian, F., Li, C. (2018). Identification of a putative polyketide synthase gene involved in usnic acid biosynthesis in the lichen *Nephromopsis pallescens*. *PLoS One.*, 13(7): e0199110.
- Ward, J.P.T. (2017). From Physiological Redox Signalling to Oxidant Stress. In: Wang, YX. (eds) *Pulmonary Vasculature Redox Signaling in Health and Disease*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 967. Springer, Cham.

- Watkins, P.B., Zimmerman, H.J., Knapp, M.J., Gracon, S.I., Lewis, K.W. (1994). Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA.*, 271(13):992-8
- Wilcock, G.K., Esiri, M.M., Bowen, D.M., Smith, C.C. (1982). Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *J. Neurol. Sci.*, 57:407-417.
- Winblad, B., Cummings, J., Andreasen, N., Grossberg, G., Onofri, M., Sadowsky, C., Zechner, S., Nagel, J., Lane, R. (2007). A six-month double-blind, randomized, placebo-controlled study of a transdermal patch in Alzheimer's disease-rivastigmine patch versus capsule. *Int J Geriatr Psychiatry*, 22(5):456-67.
- Winner, B., Winkler, J. (2015). Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 7(4): a021287.
- Winterbourn, C.C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett.*, 82-83:969-74.
- Wright, C.I., Geula, C., Mesulam, M.M. (1993). Neurological cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann Neurol.*, 34(3):373-84.
- Wu, H.C., Hu, Q.L., Zhang, S.J., Wang, Y.M., Jin, Z.K., Lv, L.F., Zhang, S., Liu, Z.L., Wu, H.L., Cheng, O.M. (2018). Neuroprotective effects of genistein on SH-SY5Y cells overexpressing A53T mutant α -synuclein. *Neural Regen Res.*, (8):1375-1383.
- Xia, Y.; Wu, Q.; Mak, S.; Liu, E.Y.L.; Zheng, B.Z.Y.; Dong, T.T.X.; Pi, R.; Tsim, K.W.K. (2022). Regulation of acetylcholinesterase during the lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglial cells. *FASEB J* 36, e22189
- Xiong, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Fu, L.; Yang, Z.; Hsieh, C.; Yin, M.; Zeng, X.; Wu, C.; Lu, A.; y col. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res* 49, W5-w14,
- Xu, M., Heidmarsson, S., Olafsdottir, E.S., Buonfiglio, R., Kogej, T., Omarsdottir, S. (2016). Secondary metabolites from cetrarioid lichens: Chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential. *Phytomedicine.*, 23(5):441-59.
- Yadav, D., Kumar, P. (2022). Restoration and targeting of aberrant neurotransmitters in Parkinson's disease therapeutics. *Neurochem Int.*, 156:105327.
- Yan, F., Wang, H., Gao, Y., Xu, J., Zheng, W. (2017). Artemisinin Protects Retinal Neuronal Cells against Oxidative Stress and Restores Rat Retinal Physiological Function from Light Exposed Damage. *ACS Chem Neurosci.* 16;8(8):1713-1723.
- Yan, Y., Zhao, J., Han, S. y col. (2015). Tetramethylpyrazine induces SH-SY5Y cell differentiation toward the neuronal phenotype through activation of the PI3K/ Akt/Sp1/TopoII β pathway. *Eur. J. Cell. Biol* 94(1), 626-641.
- Yang, W.C., Bao, H.Y., Liu, Y.Y., Nie, Y.Y., Yang, J.M., Hong, P.Z., Zhang, Y. (2018). Depsidone Derivatives and a Cyclopeptide Produced by Marine Fungus *Aspergillus unguis* under Chemical Induction and by Its Plasma Induced Mutant. *Molecules.* 3;23(9):2245.
- Yang, Z., Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.*, 22(2):124-31.
- Yıldız, M.O., Çelik, H., Caglayan, C., Genç, A., Doğan, T., Satıcı, E. (2022). Neuroprotective effects of carvacrol against cadmium-induced neurotoxicity in rats: role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Metab Brain Dis.*, 37(4):1259-1269.
- Yilmaz, M., Türk, A.O., Tay, T. y col. (2004). The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Z Naturforsch C J Biosci.*, 59: 249-254.
- Youdim, K.A., Dobbie, M.S., Kuhnle, G., Proteggente, A.R., Abbott, N.J., Rice-Evans, C. (2003). Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem.*, 85(1):180-92.

- Yuan, S., Liu, K.J., Qi, Z. (2020). Occludin regulation of blood-brain barrier and potential therapeutic target in ischemic stroke. *Brain Circ.*,6(3):152-162.
- Yun, H.R., Jo, Y.H., Kim, J., Shin, Y., Kim, S.S., Choi, T.G. (2020). Roles of Autophagy in Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.*, 21(9):3289.
- Zambare, V.P., Christopher, L.P. (2012). Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharm Biol*; 50(6):778-98.
- Zhang, J.Y.; Jiang, H.; Gao, W.; Wu, J.; Peng, K.; Shi, Y.F.; Zhang, X.J. (2008). The JNK/AP1/ATF2 pathway is involved in H₂O₂-induced acetylcholinesterase expression during apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 65, 1435-1445.
- Zhang, K., Ma, Z., Wang, J., Xie, A., Xie, J. (2011). Myricetin attenuated MPP1-induced cytotoxicity by antioxidation and inhibition of MKK4 and JNK activation in MES23.5 cells. *Neuropharmacology* 61:329– 335.
- Zhang, W., Xiao, S., Ahn, D.U. (2013). Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 53(11):1191-201.
- Zhang, X.X., Tian, Y., Wang, Z.T., Ma, Y.H., Tan, L., Yu, J.T. (2021). The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *J Prev Alzheimers Dis.*,8(3):313-321.
- Zhao, Y., Wang, M, Xu, B. (2021). A comprehensive review on secondary metabolites and health-promoting effects of edible lichen. *JFF*, 80,104283.
- Zhou, L.J., Zhu, X.Z. (2000). Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J Pharmacol Exp Ther.*,293(3):982-8.
- Zhou, R.; Yang, Y.; Park, S.Y.; Nguyen, T.T.; Seo, Y.W.; Lee, K.H.; Lee, J.H.; Kim, K.K.; Hur, J.S.; Kim, H.(2017). The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility and tumorigenesis. *Sci. Rep.* 7, 8136.
- Zhu, T., Wang, L., Wang, L.P., Wan, Q. (2022). Therapeutic targets of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke: Applications for natural compounds from medicinal herbs. *Biomed Pharmacother*, 48:112719.
- Zolezzi, J.M., Carvajal, F.J., Ríos, J.A., Ordenes, D., Silva-Alvarez, C., Godoy, J.A., Inestrosa, N.C. (2013). Tetrahydroperforin induces mitochondrial dynamics and prevents mitochondrial Ca²⁺ overload after A β and A β -AChE complex challenge in rat hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis.*, 37(4):735-46.
- Zorova, L.D., Popkov, V.A., Plotnikov, E.Y., Silachev, D.N., Pevzner, I.B., Jankauskas, S.S., Babenko, V.A., Zorov, S.D., Balakireva, A.V., Juhaszova, M., Sollott, S.J., Zorov, D.B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem.*, 552:50-59.