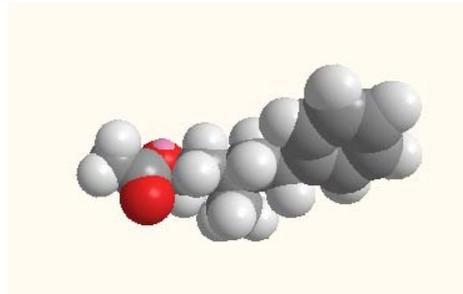


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Dirección General de Investigación
Coordinación General de Programas

PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION
CIENCIAS BÁSICAS

**PROYECTO
ELUCIDACIÓN DEL SITIO DE REACCIÓN DE CALYXAMINAS A Y B EN LA
ACETILCOLINESTERASA Y DISEÑO DE UN FÁRMACO DERIVADO DE
CALYXAMINAS A Y B POTENCIALMENTE ACTIVO CONTRA EL ALZHEIMER,
POR MEDIO DE NANOTENOLOGÍA COMPUTACIONAL.**



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

Equipo de investigación:

Coordinador

Lic. Juan Francisco Carrascoza Mayén

Febrero – octubre 2010

Lic. Rodrigo José Vargas Rosales

Noviembre-diciembre 2010

Investigador Asociado

Dr. Oscar Manuel Cóbar Pinto

Investigador

Lic. Rodrigo José Vargas Rosales

Febrero-octubre 2010

Guatemala, Noviembre de 2010



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



Dirección General de Investigación
Coordinación General de Programas

PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION
CIENCIAS BÁSICAS

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN 2010

**ELUCIDACIÓN DEL SITIO DE REACCIÓN DE CALYXAMINAS A Y B EN LA
ACETILCOLINESTERASA Y DISEÑO DE UN FÁRMACO DERIVADO DE
CALYXAMINAS A Y B POTENCIALMENTE ACTIVO CONTRA EL ALZHEIMER,
POR MEDIO DE NANOTECNOLOGÍA COMPUTACIONAL.**

Equipo de investigación:

Coordinador

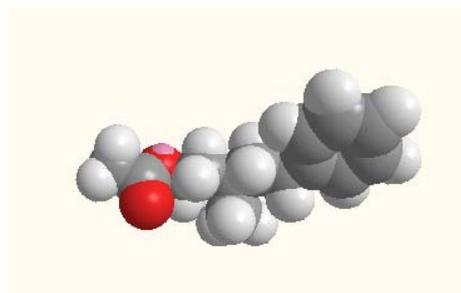
Lic. Juan Francisco Carrascoza Mayén
Febrero – octubre 2010
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales
Noviembre-diciembre 2010

Investigador Asociado

Dr. Oscar Manuel Cóbar Pinto

Investigador

Lic. Rodrigo José Vargas Rosales
Febrero-octubre 2010



Instituciones Participantes Y Co-Financiantes:

Dirección General de Investigación/Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia/Universidad de San Carlos de Guatemala
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas

Guatemala 30 de Noviembre de 2010

INDICE GENERAL

1. RESÚMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
4. JUSTIFICACIÓN	8
5. OBJETIVOS	9
6. METODOLOGÍA	10
7. RESULTADOS	14
8. DISCUSION DE RESULTADOS	64
9. CONCLUSIONES	109
10. RECOMENDACIONES	111
11. BIBLIOGRAFIA	112
12. ANEXOS	114

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 Taxonomía: Homo sapiens	14
TABLA 2 Taxonomía: Torpedo californica	15
TABLA 3 Taxonomía: Torpedo californica	16
TABLA 4 Taxonomía: Torpedo californica	17
TABLA 5 Taxonomía: Torpedo californica	18
TABLA 6 Taxonomía: Torpedo californica	19
TABLA 7 Taxonomía: Mus musculus	20
TABLA 8 Taxonomía: Drosophila melanogaster	20
TABLA 9 Coordenadas de Calyxamina A	21
TABLA 10 Constantes Fisicoquímicas Obtenidas para Calyxamina A	24
TABLA 11 Coordenadas de Calyxamina B	25
TABLA 12 Constantes Fisicoquímicas Obtenidas para Calyxamina B	28
TABLA 13 Determinación de Constantes Farmacofóricas para Calyxaminas	29
TABLA 14 DETERMINACIÓN DEL SITIO ACTIVO: Calyxamina A	37
TABLA 15 RESULTADOS OBTENIDOS DE EVALUACIÓN: Calyxamina A - Acetilcolinesterasa	38
TABLA 16 Resultados Obtenidos De Evaluación: Calyxamina B - Acetilcolinesterasa	38
TABLA 17 Docking Acetilcolina-Acetilcolinesterasa	39
TABLA 18 Docking Acetilcolina-Acetilcolinesterasa	39
TABLA 19 Docking Calyxamina y la Acetilcolinesterasa.	39
TABLA 20 valores y constantes farmacofóricas de la primera serie de diseños.	51
TABLA 21 Valores y constantes farmacofóricas de la segunda serie de diseños.	54
TABLA 22 Propiedades Farmacofóricas	54
TABLA 23 Propiedades Farmacofóricas Segunda Serie de Derivados: Continuación	55
TABLA 24 Tabla de Propiedades Fisicoquímicas, Segunda Serie de Derivados. Continuación	55
TABLA 25 Tabla de Comparación de Propiedades Farmacofóricas	556
TABLA 26 Potencial Electrostático:	57
TABLA 27 Potencial Hidrofóbico	58
TABLA 28 Donador	59
TABLA 29 Aceptor	60
TABLA 30 Evaluación del Candidato Final Seleccionado	61
TABLA 31 Tabla de Comparaciones entre 5082 y las moléculas de referencia	61
TABLA 32 Análisis de Propiedades Farmacofóricas de Calyxaminas:	65
TABLA 33 Análisis de Propiedades Farmacofóricas de Calyxaminas:	66
TABLA 34 Comparación de los valores obtenidos en el docking para Calyxamina B con otros valores de Calyxamina A y de la Acetilcolina.	76

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA No.1 Potencial Lipofílico _____	30
GRAFICA No.2 Potencial Eléctrico _____	31
GRAFICA No.3 Cargas de Poisson Boltzman _____	32
GRAFICA No.4 Densidad de Dadores de Protones _____	33
GRAFICA No.5 Densidad de Aceptores de Protones _____	33
GRAFICA No.6 Relación de la Densidad de Aceptores y Donadores de Protones ____	34
GRAFICA No.7 Curvatura Local _____	34
GRAFICA No.8 Análisis de Profundidad de cavidades. _____	35
GRAFICA No.9 Puentes de Hidrogeno _____	36
GRAFICA No.10 Determinación del Sitio Activo de Calyxaminas en Acetilcolinesterasa: _____	40
GRAFICA No.11 Corrida 9, Rango 1_1 , Calyxamina A- Acetilcolinesterasa Análisis de las interacciones cercanas. _____	40
GRAFICA No.12 Corrida 3, Rango 1_1 Calyxamina A– Acetilcolinesterasa. _____	41
GRAFICA No.13 Peores Evaluaciones: _____	41
GRAFICA No.14 Docking para Calyxamina B _____	42
GRAFICA No.15 Segundo Sitio Activo encontrado para Calyxamina A, _____	42
GRAFICA No.16 Interacciones para Calyxamina B Rango 1_1 _____	43
GRAFICA No.17 Interacciones para Calyxamina B Rango 2_1 _____	43
GRAFICA No.18 Todas las evaluaciones, Docking 1 Acetilcolina-Acetilcolinesterasa __	44
GRAFICA No.19 Mejor Evaluación Docking 1, Rango 1_1, Acetilcolina-Acetilcolinesterasa _____	44
GRAFICA No.20 Acercamiento Docking 1, Rango 1_1 Acetilcolina-Acetilcolinesterasa _____	445
GRAFICA No.21 Docking 2, Actilcolina-Acetilcolinesterasa _____	45
GRAFICA No.22 Acercamiento Docking 2, Rango 1_1 Acetilcolina-Acetilcolinesterasa. _____	46
GRAFICA No.23 Sitios activos para 5082 en Acetilcolinesterasa, _____	62
GRAFICA No.24 Sitios activos para 5082 en Acetilcolinesterasa _____	62
GRAFICA No.25 Sitio Activo principal 5082 en Acetilcolinesterasa, _____	63
GRAFICA No.26 Sitio Activo principal 5082 en Acetilcolinesterasa; _____	633
GRAFICA No.27 Esquema de la Acetilcolinesterasa. _____	69
GRAFICA No.28 Análisis Docking Calyxamina B: _____	77
GRAFICA No.29 Análisis Docking Calyxamina B: Primer sitio de reaccion en la Acetilcolinesterasa _____	78
GRAFICA No.30 Comparación entre las interacciones encontradas en ambos docking de Acetilcolina-Acetilcolinesterasa _____	85
GRAFICA No.31 Factores estructurales comunes. _____	88
GRAFICA No.32 Analizando el diseño de moléculas en base a grupos farmacofóricos. _____	89

GRAFICA No.33 Diseño fino de derivados.	90
GRAFICA No.34 Sitio activo de Acetilcolinesterasa utilizado para crear un proto-modelo y diseñar en función de este los derivados y los docking.	90
GRAFICA No.35 Mejores Moléculas diseñadas según el análisis Físico – Químico.	94
GRAFICA No.36 Potencial hidrofóbico	98
GRAFICA No.37 CoMSIA estérico de 4179:	98
GRAFICA No.38 Interacciones en electrostáticas de 5082:	101

1. RESÚMEN

El objetivo de este trabajo fue diseñar un nuevo fármaco que inhiba exitosamente la acetilcolinesterasa, tomando como base para el diseño, las propiedades farmacofóricas de las Calyxaminas A y B y su sitio de enlace a la Acetilcolinesterasa, utilizando la innovadora técnica de la Nanotecnología Computacional para este diseño.

Para lograr esto se utilizaron novedosos programas que apoyan actualmente las investigaciones Nanotectológicas y Bioinformáticas a nivel mundial como SYBYL, Autodock, Gaussian, VMD, UCFS Chimera y Otros. Programas con los cuales se elucidó el sitio de enlace de las Calyxaminas A y B en la Acetilcolinesterasa y en base a este complejo formado virtualmente, se diseñaron miles de derivados que fueron evaluados completamente en sus actividades farmacofóricas con Acetilcolinesterasa y por medio de un riguroso análisis químico se discernió un único candidato líder.

Al final de esta investigación se obtuvo un fármaco como candidato líder que posee una afinidad de enlace mayor con la acetilcolinesterasa, de la que poseen las Calyxaminas A y B, y se conoce con exactitud cuál es el sitio en el que se enlazan la Calyxaminas A y B en la Acetilcolinesterasa, mediante un método que ha sido llamado “diseño inteligente de drogas”

El impacto de esta investigación en la rama de la salud, es el aporte que representa para Guatemala inventar nuevos fármacos que sean líderes en el mercado mediante la novedosa técnica del diseño inteligente de medicamentos que ofrece la Nanotecnología computacional, lo cual se espera que haga un avance en desarrollo neto como evolución en las investigaciones científicas de Guatemala para afrontar el nuevo milenio

En sí la incorporación de la Nanotecnología Computacional en el diseño de fármacos es un costo sumamente bajo (en comparación con los actuales de diseño de drogas), lo cual implica que Guatemala tiene a su alcance la posibilidad de inventar fármacos para solucionar los problemas de salud específicos de nuestra región.

En cuanto al desarrollo de fármacos activos contra el Alzheimer, esta alternativa ofrece la ventaja de diseñar directamente con base al sitio activo de la enzima que se quiere inhibir en forma directa, (y no a manera de prueba y error como se hace con los métodos desarrollados hasta ahora y que representan un gasto de millones de dólares para obtener un candidato líder), por lo que la eficiencia de el candidato líder que se obtuvo por esta técnica, es superior por mucho, en su eficiencia en el tratamiento de esta enfermedad que actualmente alcanza a 17,000 personas en Guatemala (Asociación Guatemalteca contra el Alzheimer, 2007); y tiene un impacto económico comercial de escala mundial en el tratamiento de una de las enfermedades más comunes de la tercera edad (Alzheimer’s Desease Internacional, 2009).

Palabras Claves: Nanotecnología, Calyxaminas, Derivados, Diseño inteligente de drogas, Acetilcolinesterasa, Fármacos.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo, ha sido posible gracias al apoyo financiero de la Dirección General de Investigación DIGI y co-financiamiento de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2. INTRODUCCIÓN

Las Calyxaminas fueron descubiertas en *Calyx Podatypa* una esponja marina del Caribe mesoamericano, por Rodríguez y Cobar et al en 1997 y sintetizadas por primera vez por Rodríguez y Cobar ese mismo año, y se demostró que poseían actividad biológica y que inhibían eficientemente la acetilcolinesterasa (Cobar et al 2005)

Por otra parte, las técnicas de “diseño inteligente de drogas” *in silico*, que se basan en la predicción y corroboración de propiedades farmacofóricas por medio de programas computacionales, para el desarrollo eficiente, certero y económico de nuevos fármacos, ha ganado campo a gran velocidad en los últimos diez años, como la técnica líder y de vanguardia para la obtención de nuevos medicamentos para el tratamiento de enfermedades. (Song CM y col 2009)

Dado que Calyxaminas A y B son novedosos compuestos con potencial actividad contra el Alzheimer. Y dado su reciente descubrimiento, esta investigación buscó responder dos preguntas principales:

Cuál es el sitio bio-activo en Acetilcolinesterasa por el cual las Calyxaminas A y B inhiben esta enzima, y en base a este sitio activo, elucidado por técnicas de Nanotecnología Computacional, podría mejorarse la eficiencia del enlace Calyxamina –Enzima, modificando los grupos químicos funcionales de Calyxaminas A y B

La respuesta a ambas preguntas condujo al diseño de un nuevo compuesto como fármaco líder, derivado de las Calyxaminas, del cual se infiere su acción específica, y se podrá (en futuras investigaciones) sintetizar químicamente, teniendo una alta certeza de su eficacia y eficiencia en el tratamiento del mal de Alzheimer.

3. ANTECEDENTES

Estudios realizados por Massoulie y colaboradores han planteado que la estructura de la enzima acetilcolinesterasa existe en dos formas moleculares las cuales son oligómeros homoméricos simples de subunidades catalíticas y asociaciones heteroméricas de subunidades catalíticas con subunidades estructurales (Massoulie y col. 1993). Esta última constituida por tetrámeros de subunidades catalíticas, enlazados por medio de enlaces disulfuro a cada una de tres bandas de una subunidad estructural del tipo de colágena (Taylor y Radié, 1994). Esta especie molecular se relaciona con la lámina basal exterior de la sinapsis y es abundante en las áreas de unión del músculo estriado. Tanto la acetilcolinesterasa como la butilcolinesterasa pertenecen a la súper familia de proteínas donde se encuentran las esterasas y las hidrolasas que no se encuentran en el sistema nervioso (Taylor y Radié, 1994).

Según estudios realizados sobre la acetilcolinesterasa humana, esta posee tres dominios definidos los cuales son sitios de fijación para ligandos inhibidores (Harel y col. 1993). Se sabe que fármacos como la tacrina y el edrofonio se fijan al subsitio de colina a cercanías del triptófano 86 y del glutamato 202, la acción de la tacrina es más duradera dado que es más hidrofóbica y atraviesa la barrera hematoencefálica con mayor facilidad.

Fármacos con actividad colinomimética indirecta, como lo son los inhibidores de la colinesterasa se han utilizado como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer (Gil Néciga y col. 2008). El único fármaco que se dispone actualmente para el tratamiento es el Donepezilo, un inhibidor de la acetilcolinesterasa que actúa aumentando la concentración existente de acetilcolina a causa de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Anterior al uso del Donepezilo se utilizaba la tacrina, se prefiere el donepezilo debido a la hepatotoxicidad de la tacrina (Shevtsov PN y col 2008). Si bien el donepezilo es el fármaco utilizado a preferencia sobre la tacrina, el donepezilo posee un espectro de acción limitado, y un tiempo de eliminación alrededor de las 70 horas lo que lo hace ser un fármaco tóxico. (Landmark K, Reikvam A 2008). Por lo anterior se hace necesario continuar con la búsqueda de fármacos menos tóxicos y de alta especificidad para el tratamiento de Alzheimer.

Los Inhibidores de la colinesterasa se introdujeron en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer en los años noventa, con grandes expectativas. Las esperanzas y gran interés suscitado por estos fármacos son bien demostrado por 12.000 referencias que figuran en PubMed para 1995-2007 (Pepeu G. 2009).

Considerando que un aumento de acetilcolina en el cerebro y la mejora de los déficit cognitivos se han demostrado en modelos animales con el mal de Alzheimer, el envejecimiento de las ratas a ratones transgénicos, la efectividad clínica de los inhibidores de la colinesterasa ha sido y sigue siendo una cuestión de contrastar opiniones.

Estos van desde las conclusiones negativas a juicio el donepezilo, debido a su limitada actividad y con beneficios por debajo de un umbral mínimo a la evaluación de NICE 2007 declarando que el donepezilo, rivastigmina, galantamina son eficaces para la enfermedad de Alzheimer de leve a moderada, independientemente de su selectividad por los diferentes acetilcolinesterasa y butilcolinesterasa (Buche).

El desarrollo de nuevos inhibidores de la colinesterasa representan el futuro de la terapia colinérgica para la enfermedad de Alzheimer, pero otras indicaciones para estos medicamentos pueden ser considerados, incluyendo la demencia vascular, deterioro cognitivo leve, y la ética sensible mejora de la memoria y el aprendizaje en sujetos sanos (Pepeu G. 2009).

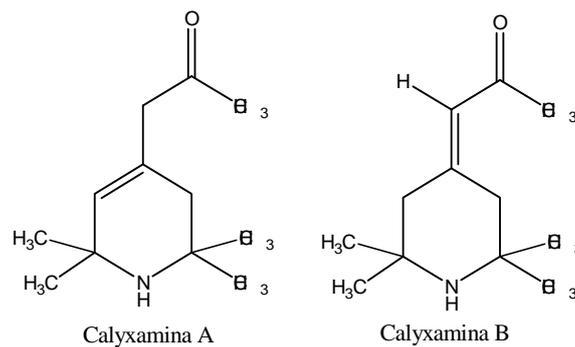
Gracias a la técnica de cristalografía de Rayos X, es posible estudiar a detalle estructuras moleculares, como es el caso de la enzima Acetilcolinesterasa humana, secuenciada y disponible en formato virtual por varios investigadores, entre las más recientes se encuentra la acetilcolinesterasa humana en formato .pdb por ejemplo la Realizada por Bagautdinov B, Yutani K. en el 2008.

Recientemente en estudios realizados por Cobar y colaboradores 2005 en Guatemala se evidenció que las Calyxaminas A y B, mostraban in vitro actividad inhibidora por la acetilcolinesterasa. (Cobar, *et.al.* 2005). Las Calyxaminas son producidas por las esponjas marinas las cuales son un primitivo grupo de organismos multicelulares, cuyo origen se remonta a unos 1.6 mil millones de años en la Era Paleozoica. Son "filtros" que inhalan agua a través de sus numerosos poros ubicados en su exoesqueleto. Los poros llevan a un sistema de canales interno que permea a todo el organismo de la esponja, exhala al exterior por sus ósculas. Todo este sistema es ayudado por un movimiento ciliar, permitiendo que partículas microscópicas de nutrientes, como bacterias y microalgas sean ingeridos.

Sin embargo y no obstante su primitiva estructura, son los invertebrados marinos que mayor número de metabolitos secundarios produce (Blunt, J. *et.al.* 2008), por lo que su estudio químico se ha incrementado en los últimos años.

De la esponja *Calyx podatypa* de Laubenfels (clase *Demospongiae*, orden *Haplosclerida*, familia *Oceanapiidae*), se ha reportado el aislamiento y elucidación estructural de varios tipos de metabolitos secundarios, especialmente esteroides (Doss, G. A.; Djerassi, 1988), péptidos cíclicos de prolina y dicetopiperazinas (Adamczeski, *et.al.* 1995) además de una serie de compuestos piridínicos 3-sustituídos (Stierle, D.; Faulkner, D. 1991) y ácidos grasos noveles (Carballeira, N. *et.al.* 1998, Carballeira, N.; Pagan, M. 2000).

Dentro de éstos metabolitos, las Calyxaminas A y B (Rodríguez, A.D. *et.al.* 1997b) noveles alcaloides 2,2,6,6-tetrametil-piperidínicos, se encontró que poseían efecto inhibitorio sobre la enzima Acetilcolinesterasa (Cobar, *et.al.* 2005), cobrando desde entonces importancia como potenciales fármacos contra la Enfermedad de Alzheimer.



La nanobiología es una disciplina de rápido surgimiento, que aporta las herramientas de la nanotecnología a las ciencias biológicas. La introducción de nuevas técnicas puede acelerar el desarrollo de tratamientos muy específicos en biomedicina, aumentar su eficiencia y minimizar sus efectos secundarios. La introducción de cuerpos extraños en el complejo mecanismo del cuerpo humano es, sin embargo, una gran lección de humildad y de desafío, como ha demostrado la experiencia pasada.

Con el fin de que nanobiología pueda alcanzar su pleno potencial, es necesario idear un medio para modificar las propiedades de las nanopartículas, tal como se expresa en el cuerpo humano, de una manera predecible. La ayuda de ordenadores es la opción para acelerar el desarrollo de estas tecnologías. Sin embargo, los procedimientos para la anotación y la simulación de las propiedades de nanopartículas se debe desarrollar y entender sus limitaciones ante los métodos de cálculo puede ser totalmente explotadas. (Cachau RE y col 2007).

El diseño de drogas a nano escala utilizando nuevas herramientas ha sido un gran avance en la búsqueda de mejorar y encontrar nuevas alternativas a diferentes tratamientos. Inhibidores de aldosterona se han desarrollado utilizando estas herramientas a nanoescala. (Lucas S y col. 2008). Inhibidores de la topoisomerasa 1 se han diseñado logrando síntesis efectivas posteriores de fenantriones modificados, gracias a estas técnicas computacionales. (Lee SH y col. 2009).

Los diseños de drogas toman en cuenta las propiedades farmacofóricas de los compuestos, un farmacóforo es el conjunto de aspectos químicos estructurales de una molécula, la cual es responsable de su actividad biológica específica. Este grupo es el responsable de la interacción de la molécula ligando en el sitio activo de la macromolécula receptor con la que interactúa (Ekins, S. 2006). Un farmacóforo representa una función química, que es válida para cualquier molécula que la posea y para la actividad biológica específica.

Recientemente, con el avance de la tecnología informática y de software, se han diseñado métodos "in silico" que permiten determinar una serie de parámetros de cualquier molécula o serie de moléculas con una sub-estructura química en común y que posean similar actividad biológica (Vogel, H.; et. al. 2006). El modelaje farmacofórico se ha convertido en una herramienta útil para predecir actividad biológica específica de moléculas orgánicas, reduciendo tiempo y dinero previo a su investigación "in vivo" como potenciales fármacos (Taha, M.; et. al. 2008).

Los parámetros farmacofóricos a determinar de las moléculas a sintetizar son; Hidrofobicidad, Aceptores/Dadores de puentes de Hidrógeno, Formadores de enlaces iónicos (Topological Polar Surface Area –TPSA-), Número de Átomos Aromáticos, “cLogP”, todo ello para tener una idea de su capacidad para acomodarse al sitio activo de la enzima cuya estructura ya se encuentran elucidada por varios autores y pueden seleccionarse en la base de datos de “Protein Data Bank” (base de datos de libre acceso).

Podemos definir a “Topological Polar Surface Area”, como la suma de las contribuciones superficiales de los átomos polares de la molécula (usualmente Oxígenos, Nitrógenos y los Hidrógenos unidos a ellos). Estudios “*in silico*” han mostrado que sus resultados correlacionan bien con sus propiedades de transporte como absorción intestinal o penetración en las barreras cerebrales sanguíneas (Ertl, P. 2000).

El número de donadores y aceptores de Hidrógeno, el peso molecular y el “Coeficiente de Partición n-octanol/agua” (cLogP) permiten predecir, mediante sus “Propiedades de Lipinski”, su capacidad para unirse a donadores y aceptores de Hidrógeno en los sitios activos de enzimas y su capacidad para absorberse oralmente, ya que está relacionado con su solubilidad e influencia su habilidad para penetrar entre membranas celulares, incluyendo aquellas de los epitelios intestinales (Lipinski, C. *et.al.* 1997).

Asimismo la nanotecnología computacional permite de manera “*in silico*” predecir el dominio de la acetilcolinesterasa en el cual las Calyxaminas A y B, así como los derivados fabricados inteligentemente reaccionan y con ello predecir su reversibilidad.

4. JUSTIFICACIÓN

En cuanto al desarrollo científico se refiere, Guatemala se ha mantenido al margen de la investigación en el diseño de fármacos durante décadas, limitándose a la extracción de principios activos y a la síntesis de compuestos presentes en la naturaleza, principalmente por causa del alto costo de investigación que este representa, lo que implica gastos de diseño, síntesis, ensayos clínicos, que con los métodos hasta ahora practicados, dicho gasto se eleva hasta millones de dólares en el transcurso de aproximadamente 10 años, para producir un candidato líder que pueda ser vendido al público, por lo cual este tipo de investigaciones estaba reservado para países del primer mundo.

La enfermedad de Alzheimer es una de las principales causas de demencia en personas de la tercera edad (Alzheimer's Association 2009). Los fármacos que en la actualidad se administran a los pacientes poseen efectos secundarios considerables, y están orientados únicamente al tratamiento, dada la naturaleza de la enfermedad. (Kubis AM, Janusz M 2008). Por lo cual esta investigación pretende generar aportes que den alternativas a los fármacos actuales.

- Es necesaria la validación de los estudios *in silico* con la finalidad de contribuir al desarrollo tecnológico-científico en el área de diseño de moléculas con impacto en el campo de la salud, los beneficios que dentro de ello se obtienen son importantes:
- Mejora de la calidad de los tratamientos mediante el desarrollo de fármacos diseñados inteligentemente, por lo cual la eficiencia y eficacia del medicamento se multiplica, traduciéndose en una respuesta inmediata en el paciente y de mejor alcance.
- Disminución en el costo de investigación de fármacos líderes, es decir que sean realmente efectivos, debido a que las moléculas diseñadas *in silico* están especializadas en el sitio de acción en el cual deben intervenir, en vez de diseñar decenas de candidatos probables, sintetizarlos uno a la vez y probarlos y descartarlos uno por uno, lo cual se traduce en bajo costo para el paciente.
- El bajo costo que representa el diseño de Calyxaminas *in silico*, hace posible que Guatemala pueda intervenir en el área científica del desarrollo de medicamentos de última generación, con los métodos de vanguardia utilizados a nivel internacional. Por lo cual, se eleva la participación científica del país con la propuesta de investigaciones de impacto real en este tema.

Finalmente se recalca el hecho de que el apoyo a científicos que se desarrollan en el campo de la Nanotecnología Computacional, es oportuno, dado el alto impacto que las investigaciones nanotecnológicas están teniendo en el desarrollo de conocimiento en varias de las áreas científicas, por lo cual estimular habilidades para intervenir en estas áreas apoya la competitividad integral del país en la ciencia y en la tecnología generando un avance neto de la ciencia a nivel nacional.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Determinar el sitio de reacción de Calyxaminas A y B y diseñar un fármaco potencialmente activo contra la acetilcolinesterasa, derivado de Calyxaminas A y B, por medio de programas computacionales.

5.2 Específicos:

1. Determinar las características bioquímicas de la Acetilcolinesterasa.
2. En base a las características bioquímicas determinadas, y con la ayuda de programas de enlace proteína-ligando, determinar el sitio activo de Calyxaminas A y B en la Acetilcolinesterasa.
3. Obtener derivados de Calyxaminas A y B, que mejoren la energía total de enlace fármaco-enzima.
 - Discernir entre los derivados obtenidos, cual:
 - Posee Mejores características farmacofóricas
 - Posee alta afinidad fármaco-ligando
 - Es más fácilmente sintetizable.
 - Cumple preferentemente la regla de Lipinski (No indispensable).
4. Corroborar la eficiencia de la formación de enlace fármaco-enzima del candidato electo, mediante programas computacionales de enlace automatizado.

6. METODOLOGÍA

Detalles del Procedimiento

La búsqueda de una secuencia canónica fue el primer paso en la determinación de una estructura óptima sobre la cual se diseñó el derivado de Calyxaminas.

Una vez que se obtuvo una secuencia canónica, se procedió a crear un archivo .pdb de la proteína pero sin conformación terciaria, con el objeto de poder analizar las 85 secuencias obtenidas de las estructuras presentes hasta esta fecha en Protein Data Bank sobre Acetilcolinesterasa, con lo cual se puede hacer una primera discriminación basada en la estructura primaria de las muestras. Habiendo obtenido este análisis, se procedió a tabular los resultados para obtener una idea gráfica del estado del total de los datos.

Modelado de Calyxaminas

Modelaje Molecular de Calyxamina A

- Minimización de energía y geometría molecular total utilizando Avogadro/Linux, como primera aproximación para la obtención de coordenadas X, Y, Z.
- Modelaje Molecular de Calyxamina A utilizando STO-G3 en GAMESS/Linux basada en los resultados obtenidos en Avogadro.
- Modelaje Molecular de Calyxamina A: minimización de energía y geometría molecular total utilizando ChemOffice/Windows, como primera aproximación para la obtención de coordenadas X, Y, Z.
- Modelaje Molecular de Calyxamina A utilizando STO-G3 en ChemOffice como interface para GAMESS para Windows.

Determinación de Frecuencia para Calyxamina A se utilizó STO-G3, con lo cual se computaron las constantes fisicoquímicas: Cv, Cp, S, H, E, G. Utilizando ChemOffice/Windows.

Modelaje Molecular de Calyxamina B y de Acetilcolina.

- minimización de energía y geometría molecular total utilizando:
- STO-G3, método Hartree-Fock Restringido en GAMESS/Windows.
- Función de Onda: R-Closed Shell.
- Interacciones SCF máximas: 50
- Máximo No. De pasos 50
- Tolerancia de convergencia 0.001 Hartree/Bohr
- Temperatura 298.15 Hartree/Bohr
- Suponiendo: Hückel
- Simetría C1

Determinación de Frecuencia para Calyxamina B utilizando STO-G3, con lo cual se computaron las constantes fisicoquímicas: Cv, Cp, S, H, E, G. Utilizando ChemOffice/Windows.

Se realizó la descripción Farmacofórica¹ de las Calyxaminas A y B: Mediante relaciones QSAR-ADME basadas en relaciones CoMSIA de SYBYL, obteniendo las descripciones de los grupos químicos potencialmente activos:

- Hidrofobicidad
- Aromaticidad
- Aceptores/Dadores de puentes de Hidrógeno
- Potencial electroquímico y estérico.
- CLogP
- Coeficiente de Refractividad

Las Calyxaminas A y B se guardaron en formatos compatibles con SYBYL y Autodock 4.01.

Descripción bioquímica de la Acetilcolinesterasa mediante el programa MOLCAD/SYBYL/Tripes.

Proceso de enlace automatizado (docking) Calyxamina – Acetilcolinesterasa. Se utilizó el programa Autodock 4.01

Medición de las Energías de Enlace: Se utilizó el programa APBS -- Adaptive Poisson-Boltzmann Solver Version 0.5.1-- desarrollado por Nathan A. Baker, con las siguientes características:

- Vpbe_ctor: Using max ion radius (2 A) for exclusion function
- Debye length: 30.4285 A
- Current memory usage: 62.004 MB total, 62.004 MB high water
- Using cubic spline charge discretization.
- Grid dimensions: 65 x 65 x 65
- Grid spacings: 1.593 x 1.825 x 1.758
- Grid lengths: 101.970 x 116.792 x 112.494
- Grid center: (-2.128, -0.580, 0.224)
- Multigrid levels: 5

Docking: Los docking fueron realizados mediante el programa Autodock 4.01 con las siguientes características: Toda otra característica que no se incluye en esta lista fue asignada por default según las características que trae pre diseñadas el programa.

- Número de corridas en Algoritmo Lamarkiano: 100
- Tamaño de la población: 300
- Máximo Número de Evaluaciones: 2.5 millones
- Número Máximo de Generaciones: 27,000
- Número máximo de individuos que sobreviven por cada corrida: 1
- Número de generaciones de las cuales se escoge el peor individuo: 10

¹ Farmacóforo/ico: Según Peter Gund, es un grupo de características estructurales en una molécula que es reconocida como receptor y es responsable de la actividad biológica de esta. (Gund. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 1977, 5: pp 117-143)

Diseño de Derivados

Se trabajó con RACHEL de SYBYL para desarrollar un grupo de derivados de las Calyxaminas. Para obtener este grupo de derivados se ha trabajado con el modelo de Calyxamina previamente hecho y adicionalmente se ha modelado una molécula de Acetilcolina, dicha molécula de Acetilcolina también se evaluó en presencia de la Acetilcolinesterasa en un docking *in silico*, en donde se encontró que la Acetilcolina y la Calyxamina poseían lugares en común de reacción.

El trabajo de desarrollado con RACHEL parte de estos resultados para comenzar el diseño automático de cientos de derivados que posteriormente deberán ser analizados cada uno de ellos en base a los criterios previamente establecidos: Energía de enlace proteína – ligando, factibilidad de síntesis, regla de Lipinski, etc.

A continuación se describen los detalles utilizados para realizar el diseño de los derivados:

- Se tomó la secuencia de Calyxamina B $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{R}$. Donde R es la secuencia pirrolínica que se cambió. La Calyxamina A/B fue ubicada en el centro del sitio activo obtenido como mejor interacción para la Acetilcolina (ver sección de resultados, gráfica de interacciones cercanas Acetilcolina-Acetilcolinesterasa).
- El punto objetivo tomado dentro de la Acetilcolinesterasa fue TRP86.
- El tiempo de desarrollo de derivados de la primera secuencia fue de aproximadamente 7 horas.
- El tiempo de desarrollo de derivados de la segunda secuencia fue de aproximadamente 8 horas.

Ambas series de derivados fueron suspendidas no por alcanzar el máximo punto de convergencia pero si por llegar a un punto de escasos alcances de moléculas exitosas.

Selección del candidato líder:

A todas las series se les calcularon sus propiedades farmacofóricas y constantes fisicoquímicas utilizando relaciones QSAR-ADME *in silico*.

Las tablas de propiedades farmacofóricas están descritas en la sección de resultados tal y como fueron obtenidas por el programa.

Posteriormente se seleccionó y estudio un mapa topológico de los compuestos que tuvieron los mejores resultados.

El mejor compuesto encontrado fue extraído en forma de complejo virtual computacional en conjunto con la enzima y se le realizó un docking Lamarkiano tal y como se ha descrito en la sección previa.

Se estudiaron dos compuestos como candidatos probables, codificados con los números 12857 y 5082, en este informe solamente se han adjuntado los resultados obtenidos para el compuesto 5082 no solo porque se estima que posee mejores constantes, sino también porque los resultados obtenidos para 12857 carecen de importancia pues no fueron realizados para la misma enzima estándar.

7. RESULTADOS

Comparación de Todas las Secuencias de Acetilcolinesterasa Presentes en Protein Data Bank

TABLA 1 Taxonomía: *Homo sapiens*

Técnica: Difracción por Rayos X

No.	Código	% Identidad vs Canónica	Autor	Título	Observaciones
1	3LII	86.48	H.Dvir,I.Silman,M.Harel,T.L.Rosenberry,J.L.Sussman	Recombinant Human Acetylcholinesterase	Hydrolase
2	1F8U	86.32	Kryger, G., Harel, M., Shafferman, A., Silman, I., Sussman, J.L.	Crystal Structure Of Mutant E202q Of Human Acetylcholinesterase Complexed With Green Mamba Venom Peptide Fasciculin-Ii	Ache HUMANA en complejo con veneno de serpiente. Ache extremo similar a <i>T. californica</i>
3	1B41	86.48	Kryger, G., Harel, M., Shafferman, A., Silman, I., Sussman, J.L.	Human Acetylcholinesterase Complexed With Fasciculin-Ii, Glycosylated Protein	Ache HUMANA unida a toxina
4	2WQZ	NA	Fabrichny, I.P., Leone, P., Sulzenbacher, G., Comoletti, D., Miller, M.T., Taylor, P., Bourne, Y., Marchot, P.	Crystal Structure Of Synaptic Protein Neuroligin-4 In Complex With Neurexin-Beta 1: Alternative Refinement	Neuroligina unida a fragmento de ache humana
5	2ZFH	NA	Bagautdinov, B., Yutani, K., RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI)	Crystal Structure Of Putative Cuta1 From Homo Sapiens At 2.05A Resolution	Proteina transferasa asociada a la Ache pero no se encuentra ninguna referencia a esta enzima.
6	2AOX	NA	Horton, J.R., Sawada, K., Nishibori, M., Cheng, X.	Histamine Methyltransferase (Primary Variant T105) Complexed With The Acetylcholinesterase Inhibitor And Alzheimer's Disease Drug Tacrine	Complejo de histamina metil transferasa con tacrina, un inhibidor del ache en una proteína trasferasa
7	2AOW	NA	Horton, J.R., Sawada, K., Nishibori, M., Cheng, X.	Histamine Methyltransferase (Natural Variant I105) Complexed With The Acetylcholinesterase Inhibitor And Alzheimer's Disease Drug Tacrine	Complejo de histamina metil tranferasa nativa con tacrina
8	1VZJ	NA	Dvir, H., Harel, M., Bon, S., Liu, W.-Q., Vidal, M., Garbay, C., Sussman, J.L., Massoulié, J., Silman, I.	Structure Of The Tetramerization Domain Of Acetylcholinesterase: Four-Fold Interaction Of A Www Motif With A Left-Handed Polyproline Helix	Un dominio de ache tetramerizado en su hélice

TABLA 2 Taxonomía: Torpedo californica
Técnica: Difracción por Rayos X

No.	Codigo	% Identidad vs Canónica	Autor	Título	observaciones
9	2ACE	50.49	Harel, M., Raves, M.L., Silman, I., Sussman, J.L.	Native Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) From Torpedo Californica	acetilcolinesterasa NATIVA de torpedo, de sussman y col.
10	2VT6	50.65	Colletier, J.P., Bourgeois, D., et. Al.	Native Torpedo Californica Acetylcholinesterase Collected With A Cumulated Dose Of 9400000 Gy	acetilcolinesterasa torpedo nativa, con sobredosis de rayos X
11	2VT7	50.65	Colletier, J.P., Bourgeois, D., et. Al.	Native Torpedo Californica Acetylcholinesterase Collected With A Cumulated Dose Of 800000 Gy	acetilcolinesterasa torpedo, nativa con daño por rayos X
12	2J3D	50.65	Harel, M., Sussman, J.L.	Native Monoclinic Form Of Torpedo Acetylcholinesterase	acetilcolinesterasa de torpedo en su forma monoclinica nativa
13	3I6M	50.65	D.Lamba,C.Bartolucci,C	3d Structure Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase Complexed With N-Piperidinopropyl-Galanthamine	acetilcolinesterasa torpedo, unida a galantamina en varios dominios, molécula torcionada
14	3I6Z	50.65	D.Lamba,C.Bartolucci,C	3D Structure Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase Complexed With N-Saccharinohexyl-Galanthamine	acetilcolinesterasa torpedo, formando complejo con galantamina.
15	2WFZ	50.65	Sanson, B., Nachon, F., et. Al.	Non-Aged Conjugate Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase With Soman	acetil colinesterasa torpedo, unida en complejo con pralidoxima y otros utilizados en ancianos, técnica de envejecimiento
16	2WGO	50.65	Sanson, B., Nachon, F., et. Al.	Aged Conjugate Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase With Soman (Obtained By In Crystallo Aging)	acetilcolinesterasa torpedo, complejo con geriátricos expuestos a envejecimiento
17	2WG1	50.65	Sanson, B., Nachon, F., et. Al.	Ternary Complex Of The Aged Conjugate Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase With Soman And 2-Pam	acetilcolinesterasa torpedo, complejo con geriátricos, envejecidas
18	2W6C	50.65	Paz, A., Xie, Q., Greenblatt, et. Al.	Ache In Complex With A Bis(-)-Nor-Meptazinol Derivative	acetilcolinesterasa torpedo, complejo con derivados de meptazinol
19	2VJA	50.65	Colletier, J.P., Bourgeois, D., et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With A Non Hydrolysable Substrate Analogue, 4-Oxo-N,N,N-Trimethylpentanaminium - Orthorhombic Space Group -Dataset A At 100k	Temperatura y cristalización de ach torpedo, cristal ortorombico. Complejo con soporte no hidrolizable
20	2VJB	50.65	Colletier, J.P., Bourgeois, D., et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With A Non Hydrolysable Substrate Analogue, 4-Oxo-N,N,N-Trimethylpentanaminium - Orthorhombic Space Group -Dataset D At 100k	Temperatura y cristalización de ach torpedo, cristal ortorombico. Complejo con soporte no hidrolizable
21	2VJC	50.65	Colletier, J.P., Bourgeois, et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With A Non Hydrolysable Substrate Analogue, 4-Oxo-N,N,N-Trimethylpentanaminium - Orthorhombic Space Group -Dataset A At 150k	Temperatura y cristalización de AchE torpedo, cristal ortorombico. Complejo con soporte no hidrolizable
22	2VJD	50.65	Colletier, J.P., Bourgeois, D et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With A Non Hydrolysable Substrate Analogue, 4-Oxo-N,N,N-Trimethylpentanaminium - Orthorhombic Space Group -Dataset C At 150k	Temperatura y cristalización de AchE torpedo, cristal ortorombico. Complejo con soporte no hidrolizable
23	2VQ6	50.65	Harel, M., Silman, I., Sussman, J.L.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase Complexed With 2-Pam	AchE torpedo formando un complejo con 2-pam
24	2V96	50.65	Colletier, J.-P., Sanson, B., et. Al.	Structure Of The Unphotolysed Complex Of Tcache With 1-(2-Nitrophenyl)-2,2,2-Trifluoroethyl-Arsenocholine At 100k	AchE torpedo complejo con arsenicolina en otros dominios a diferentes temperaturas

TABLA 3 Taxonomía: Torpedo californica
Técnica: Difracción por Rayos X

No.	Codigo	% Identidad vs Canónica	Autor	Título	observaciones
25	2V97	50.65	Colletier, J.-P., Sanson, B., et. Al.	Structure Of The Unphotolysed Complex Of Tcache With 1-(2-Nitrophenyl)-2,2,2-Trifluoroethyl-Arsenocholine After A 9 Seconds Annealing To Room Temperature	AchE torpedo complejo con arsenicholine en otros dominios a diferentes temperaturas
26	2V98	50.65	Colletier, J.-P., Sanson, B., et. Al.	Structure Of The Complex Of Tcache With 1-(2-Nitrophenyl)-2, 2,2-Trifluoroethyl-Arsenocholine After A 9 Seconds Annealing To Room Temperature, During The First 5 Seconds Of Which Laser Irradiation At 266nm Took Place	AchE complejo con neurotransmisor con cambio de temperatura y radiación
27	2VA9	50.65	Colletier, J.-P., Sanson, B., et. Al.	Structure Of Native Tcache After A 9 Seconds Annealing To Room Temperature During The First 5 Seconds Of Which Laser Irradiation At 266nm Took Place	AchE complejo con neurotransmisor con cambio de temperatura y radiación
28	2J3Q	50.65	Harel, M., Cusack, B., et. Al.	Torpedo Acetylcholinesterase Complexed With Fluorophore Thioflavin T	AchE en complejo con Fluoruro de Tioflavina en 3 dominios.
29	2J4F	50.49	Kreimer, D.I., Dolginova, E.A., et. Al.	Torpedo Acetylcholinesterase - Hg Heavy-Atom Derivative	AchE unido a átomos pesados con mercurio
30	2CKM	50.65	Brumshtein, B., Rydberg, E.H., et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase Complexed With Alkylene-Linked Bis-Tacrine Dimer (7 Carbon Linker)	AchE ligada a tacrina, conformación distinta por unión en carbono 7
31	2CMF	50.65	Rydberg, E.H., Brumshtein, B., et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase Complexed With Alkylene-Linked Bis-Tacrine Dimer (5 Carbon Linker)	AchE ligada a tacrina, conformación distinta por union en carbono (5)
32	2BAG	50.65	Lamba, D., Bartolucci, C., S et. Al.	3D Structure Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase Complexed With Ganstigmine	AchE ligada a gastigmina un carbamato usado en Alzheimer
33	2C4H	50.65	Colletier, J.P., Fournier, D., Greenblatt et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With 500mm Acetylthiocholine	AchE torpedo C. unida a acetilcolina en varios sitios periféricos
34	2C58	50.65	Colletier, J.P., Fournier, D., et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With 20mm Acetylthiocholine	AchE torpedo C. unida a acetilcolina en diferentes concentraciones de sustrato y en la periferia
35	2C5F	50.65	Colletier, J.P., Fournier, D., et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With A Non Hydrolysable Substrate Analogue, 4-Oxo-N,N,N-Trimethylpentanaminium	AchE en complejo con análogo de molécula NO hidrolizable
36	2C5G	50.65	Colletier, J.P., Fournier, D., et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With 20mm Thiocholine	AchE en complejo con ticolina a una alta concentración
37	2CEK	50.65	Sanson, B., Colletier, J.P., et. Al.	Conformational Flexibility In The Peripheral Site Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase Revealed By The Complex Structure With A Bifunctional Inhibitor	AchE muestra flexibilidad periférica por afinidad a una estructura de inhibidor bi funcional
38	1ZGB	50.65	Haviv, H., Wong, D.M., et. Al.	Crystal Structure Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With An (R)-Tacrine(10)-Hupyridone Inhibitor.	AchE en complejo con R-tacrina (enantiomero)
39	1ZGC	50.65	Haviv, H., Wong, D.M., et. Al.	Crystal Structure Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With An (RS)-Tacrine(10)-Hupyridone Inhibitor.	AchE en complejo con RS-tacrina (enantiomero)
40	1U65	50.65	Harel, M., Hyatt, J.L., Brumshtein, et. Al.	Ache W. CPT-11	pro-fármaco analogo de camptotencina ligado a AchE en su dominio

TABLA 4 Taxonomía: Torpedo californica**Técnica: Difracción por Rayos X**

No.	Codigo	% Identidad vs Canónica	Autor	Título	observaciones
41	1UT6	50.65	Brumshtein, B., Wong, D.M., et. Al.	Structure Of Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) Complexed With N-9-(1',2',3',4'-Tetrahydroacridinyl)-1,8-Diaminooctane At 2.4 Angstroms Resolution.	AchE en complejo con análogo de tacrina, se observa cambios conformacionales en molécula AchE torpedo
42	1ODC	50.65	Wong, D.M., Greenblatt, H.M., et. Al.	Structure Of Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) Complexed With N-4'-Quinolyl-N'-9"-(1",2",3",4" -Tetrahydroacridinyl)-1,8-Diaminooctane At 2.2a Resolution	derivado de fármaco en complejo con AchE, se observan cambios en la conformación por afinidad a la molécula
43	1W4L	50.65	Greenblatt, H.M., Guillou, C., et. Al.	Complex Of Tcache With Bis-Acting Galanthamine Derivative	drástica deformación de molécula al hacer complejo con AchE. Bivalente capaz de llegar al sitio "Garganta"
44	1W6R	50.65	Greenblatt, H.M., Guillou, C., et. Al.	Complex Of Tcache With Galanthamine Derivative	complejo AchE y derivado de Galantamina.
45	1W75	50.65	Greenblatt, H.M., Guillou, C., et. Al.	Native Orthorhombic Form Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase (Ache)	Derivado de galantamina en complejo con AchE, derivado bi-valente.
46	1W76	50.65	Greenblatt, H.M., Guillou, C., et. Al.	Orthorhombic Form Of Torpedo Californica Acetylcholinesterase (Ache) Complexed With Bis-Acting Galanthamine Derivative	Derivado de galantamina en complejo con AchE, derivado bi-valente.
47	1H22	50.65	Wong, D.M., Greenblatt, H.M., et. Al.	Structure Of Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) Complexed With (S,S)-(-)-Bis(10)-Huprydone At 2.15a Resolution	complejo AchE y derivado de fármaco extraído se musgo, evidencia complementaridad de ligando
48	1H23	50.65	Wong, D.M., Greenblatt, H.M., et. Al.	Structure Of Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) Complexed With (S,S)-(-)-Bis(12)-Huprydone At 2.15a Resolution	complejo AchE y derivado de fármaco extraído se musgo, evidencia complementaridad de ligando
49	1GPK	50.65	Dvir, H., Harel, M., Chetrit, M., et. Al.	Structure Of Acetylcholinesterase Complex With (+)-Huperzine A At 2.1a Resolution	complejo con isómeros de huperzine ligados por vanderwalls sin sitio activo
50	1GPN	50.65	Dvir, H., Harel, M., Jiang, H.L., et. Al.L.	Structure Of Acetylcholinesterase Complexed With Huperzine B At 2.35a Resolution	complejo de AchE con huperzina, pruebas de reordenamiento de sitio activo
51	1JJB	50.65	Koellner, G., Steiner, T., et. Al.	A Neutral Molecule In Cation-Binding Site: Specific Binding Of PEG-SH To Acetylcholinesterase From Torpedo Californica	inhibidor de AchE atípico en dominios conocidos.
52	1GQR	50.65	Raves, M.L., Harel, M., et. Al.	Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) Complexed With Rivastigmine	interacción AchE con rivastigmina una anti-Alzheimer común.
53	1GQS	50.65	Bar-on, P., Millard, C.B., et. Al.	Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) Complexed With Nap	interacción AchE con carbamato anti-Alzheimer común.
54	1HBJ	50.65	Greenblatt, H.M., Kryger, G., et. Al.	X-Ray Crystal Structure Of Complex Between Torpedo Californica Ache And A Reversible Inhibitor, 4-Amino-5-Fluo Ro-2-Methyl-3-(3-Trifluoroacetylbenzylthiomethyl)Quinoline	complejo de AchE con derivado de Quinolonas

TABLA 5 Taxonomía: Torpedo californica**Técnica: Difracción por Rayos X**

No.	Codigo	% Identidad vs Canónica	Autor	Título	observaciones
55	1E66	50.65	Dvir, H., Harel, M et. Al.	Structure Of Acetylcholinesterase Complexed With (-)-Huprine X At 2.1a Resolution	complejo de AchE con Huprine interacción en dominio "garganta"
56	1EA5	50.65	Harel, M., Weik, M et. Al.	Native Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) From Torpedo Californica At 1.8a Resolution	AchE nativa con acetilcolina señalada en dos dominios
57	1E3Q	50.65	Felder, C.E., Harel, M., et. Al.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase Complexed With Bw284c51	AchE de torpedo C. en complejo con inhibidor de diseño
58	1QID	50.65	Kryger, G., Weik, M., et. Al.	Specific Chemical And Structural Damage At Nine Time Points (Point A) Caused By Intense Synchrotron Radiation To Torpedo Californica Acetylcholinesterase	AchE torpedo C. dañada por radiación en cristalografía rayos X
59	1QIE	50.65	Kryger, G., Weik, M., et. Al.	Specific Chemical And Structural Damage At Nine Time Points (Point B) Caused By Intense Synchrotron Radiation To Torpedo Californica Acetylcholinesterase	AchE torpedo C. dañada por radiación en cristalografía rayos X, en otro punto distinto al 1QID
60	1QIF	50.65	Kryger, G., Weik, M., et. Al.	Specific Chemical And Structural Damage At Nine Time Points (Point C) Caused By Intense Synchrotron Radiation To Torpedo Californica Acetylcholinesterase	AchE torpedo C. dañada por radiación en cristalografía rayos X, en otro punto distinto al 1QID y 1QIE
61	1QIG	50.65	Kryger, G., Weik, M., Ravelli, R.B.G.	Specific Chemical And Structural Damage At Nine Time Points (Point D) Caused By Intense Synchrotron Radiation To Torpedo Californica Acetylcholinesterase	AchE torpedo C. dañada por radiación en cristalografía rayos X, en otro punto (punto D)
62	1QIH	50.65	Kryger, G., Weik, M., Ravelli, R.B.G.	Specific Chemical And Structural Damage At Nine Time Points (Point E) Caused By Intense Synchrotron Radiation To Torpedo Californica Acetylcholinesterase	AchE torpedo C. dañada por radiación en cristalografía rayos X, en otro punto (punto E)
63	1QII	50.65	Kryger, G., Weik, M., Ravelli, R.B.G.	Specific Chemical And Structural Damage At Nine Time Points (Point F) Caused By Intense Synchrotron Radiation To Torpedo Californica Acetylcholinesterase	AchE torpedo C. dañada por radiación en cristalografía rayos X, en otro punto (punto F)
64	1QIJ	50.65	Kryger, G., Weik, M., Ravelli, R.B.G.	Specific Chemical And Structural Damage At Nine Time Points (Point G) Caused By Intense Synchrotron Radiation To Torpedo Californica Acetylcholinesterase	AchE torpedo C. dañada por radiación en cristalografía rayos X, en otro punto (punto G)
65	1QIK	50.65	Kryger, G., Weik, M., Ravelli, R.B.G.	Specific Chemical And Structural Damage At Nine Time Points (Point H) Caused By Intense Synchrotron Radiation To Torpedo Californica Acetylcholinesterase	AchE torpedo C. dañada por radiación en cristalografía rayos X, en otro punto (punto H)
66	1QIM	50.65	Kryger, G., Weik, M., Ravelli, R.B.G.	Specific Chemical And Structural Damage At Nine Time Points (Point I) Caused By Intense Synchrotron Radiation To Torpedo Californica Acetylcholinesterase	AchE torpedo C. dañada por radiación en cristalografía rayos X, en otro punto (punto I)
67	1DX6	50.65	Greenblatt, H.M., et. Al.	Structure Of Acetylcholinesterase Complexed With (-)-Galanthamine At 2.3a Resolution	AchE en complejo con galantamina con resolución a 2,3 amstrongs
68	1QTI	50.49	Bartolucci, C., Perola, E., et. Al.	Acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7)	AchE de torpedo C. unida a pro-farmaco derivado de galantamina
69	1VXO	50.65	Millard, C.B., Silman, et. Al.	Methylphosphonylated Acetylcholinesterase (Aged) Obtained By Reaction With O-Ethyl-S-[2-[Bis(1-Methylethyl)Amino]Ethyl] Methylphosphonothioate (Vx)	cristalografía rayos X, obtenida de la reacción envejecida con pro-fármaco
70	1VXR	50.65	Millard, C.B., Koellner, G., et. Al.	O-Ethylmethylphosphonylated Acetylcholinesterase Obtained By Reaction With O-Ethyl-S-[2-[Bis(1-Methylethyl)Amino]Ethyl] Methylphosphonothioate (Vx)	reacción entre AchE e histidina, hidrólisis

TABLA 6 Taxonomía: Torpedo californica
Técnica: Difracción por Rayos X

No.	Codigo	% Identidad vs Canónica	Autor	Título	observaciones
71	2DFP	50.65	Kryger, G., Millard, C.B., Silman, I., Sussman, J.L.	X-Ray Structure Of Aged Di-Isopropyl-Phosphoro-Fluoridate (Dfp) Bound To Acetylcholinesterase	cristalografía de AchE en reacción irreversible con un fosforado
72	1CFJ	50.65	Millard, C.B., Silman, I., Sussman, J.L.	Methylphosphonylated Acetylcholinesterase (Aged) Obtained By Reaction With O-Isopropylmethylphosphonofluoridate (Gb, Sarin)	cristalografía de AchE en reacción irreversible DFP un fosforado
73	1SOM	50.65	Greenblatt, H.M., Millard, C.B., Sussman, J.L., Silman, I.	Torpedo Californica Acetylcholinesterase Inhibited By Nerve Agent Gd (Soman).	AchE inhibida por agente farmacológico
74	1EVE	50.65	Kryger, G., Silman, I., Sussman, J.L.	Three Dimensional Structure Of The Anti-Alzheimer Drug, E2020 (Aricept), Complexed With Its Target Acetylcholinesterase	evaluación del comportamiento del complejo entre AchE y aricept un fármaco anti Alzheimer
75	1AX9	50.49	Raves, M.L., Ravelli, R.B.G., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I.	Acetylcholinesterase Complexed With Edrophonium, Laue Data	Evaluación de edrofonio en AchE por técnica de cristalografía de la Laue
76	2ACK	50.49	Raves, M.L., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I.	Acetylcholinesterase Complexed With Edrophonium, Monochromatic Data	Evaluación de edrofonio en AchE en posición monocromática
77	1VOT	50.49	Raves, M.L., Harel, M., Silman, I., Sussman, J.L.	Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) Complexed With Huperzine A	Complejo de Huperzina con AchE a 2,5 Armstrong de resolución
78	1AMN	50.33	Harel, M., Silman, I., Sussman, J.L.	Transition State Analog: Acetylcholinesterase Complexed With M-(N,N,N-Trimethylammonio)Trifluoroacetophenone	Estructura formada en la transición del complejo AchE y trifluoroacetofenona
79	1FSS	50.65	Harel, M., Kleywegt, G.J., Silman, I., Sussman, J.L.	Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) Complexed With Fasciculin-Ii	AchE interacción con veneno de serpiente
80	1ACJ	50.65	Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I.	Quaternary Ligand Binding To Aromatic Residues In The Active-Site Gorge Of Acetylcholinesterase	Ligando aromáticos en "garganta" de AchE
81	1ACL	50.49	Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I.	Quaternary Ligand Binding To Aromatic Residues In The Active-Site Gorge Of Acetylcholinesterase	misma molécula que ACJ a 2,8 Armstrong

TABLA 7 Taxonomía: *Mus musculus***Técnica: Difracción por Rayos X**

No.	Codigo	% Identidad vs Canónica	Autor	Título	observaciones
82	2WU3	77.52	Hornberg, A., Artursson, E., et. Al.	Crystal Structure Of Mouse Acetylcholinesterase In Complex With Fenamiphos And Hi-6	ratón, acetilcolinesterasa unida en complejo con fenadiphos y HI6(insecticida)
83	2WU4	76.71	Hornberg, A., Artursson, E., Warne, et. Al.	Crystal Structure Of Mouse Acetylcholinesterase In Complex With Fenamiphos And Ortho-7	ratón, acetilcolinesterasa unida en complejo con derivado de fanadiphos(insecticida)
84	2WLS	77.20	Pang, Y.P., Ekstrom, F., Polsinelli, et. Al.	Crystal Structure Of Mus Musculus Acetylcholinesterase In Complex With Amt13	colinesterasa artropoda complejo con AMTS13(insecticida organoclorado)
85	1OCE	50.49	Bartolucci, C., Perola, E., et. Al.	Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) Complexed With Mf268	AchE en complejo con analogo de la fisostigmina directo a la serina en "garganta" de la molécula
86	1EEA	50.33	Raves, M.L., Giles, K., Schrag, J.D., et. Al.	Acetylcholinesterase	Estructura cuaternaria tetramérica de AchE

TABLA 8 Taxonomía: *Drosophila melanogaster***Técnica: Difracción por Rayos X**

No.	Codigo	% Identidad vs Canónica	Autor	Título	observaciones
87	1QO9	32.25	Harel, M., Silman, I., Sussman, J.L.	Native Acetylcholinesterase From Drosophila Melanogaster	Estructura nativa de la mosca de fruta

Modelado Molecular:**CALYXAMINA A**

Coordenadas obtenidas por medio de Gamess (Firefly)

TABLA 9 *Coordenadas de Calyxamina A*

ATOM	CHARGE	X	Y	Z
C	6	0.7269006043	1.4284286610	0.8660377203
C	6	1.9190827954	0.9937093956	-0.0517409259
N	7	2.1789385412	-0.4823623719	0.0063759275
C	6	0.9976828770	-1.4062134132	-0.0423381281
C	6	-0.1679959353	-0.9399485423	0.8914335071
C	6	-0.4867738963	0.5296677136	0.6515820699
C	6	-1.6567426502	1.0120694772	0.2755972785
C	6	3.2192487072	1.6841428557	0.4424230436
C	6	1.6605869677	1.4474852191	-1.5145656827
C	6	1.5101039666	-2.7891815765	0.4374000673
C	6	0.4766146030	-1.5663803856	-1.4964856979
C	6	-2.9051140664	0.2047776189	0.0250394152
O	8	-3.9597174684	1.0355471337	-0.3508711697
O	8	-3.0603844784	-1.0034412253	0.1109811604
H	1	1.0364202226	1.3491745651	1.9076105474
H	1	0.4763059351	2.4665887629	0.6710701980
H	1	2.6323169641	-0.6534586135	0.9164262293
H	1	-1.0441173101	-1.5571426250	0.7242694828
H	1	0.1410234828	-1.0573108545	1.9294944046
H	1	-1.7847546961	2.0742773589	0.1183828324
H	1	3.4561348566	1.3830761365	1.4585325766
H	1	4.0518185085	1.4128335142	-0.1997443078
H	1	3.1054319038	2.7633991210	0.4250052631
H	1	0.6570736714	1.2058376763	-1.8399325665
H	1	1.7874909668	2.5221251060	-1.5930657381
H	1	2.3686898252	0.9652427769	-2.1809525899
H	1	1.9014235420	-2.7290228861	1.4482521840
H	1	2.3010907176	-3.1399491090	-0.2185859599
H	1	0.7021509972	-3.5140630088	0.4266614349
H	1	-0.1211473848	-0.7186554611	-1.8068831821
H	1	-0.1464011919	-2.4524400578	-1.5612801946
H	1	1.3108823733	-1.6756718859	-2.1801288982
H	1	-4.7225959321	0.4208094346	-0.4939551344

Modelado Molecular: *Calyxamina A*

Coordenadas obtenidas por medio de Gamess (Firefly)

Calyxamina A.mol2

```
@<TRIPOS>MOLECULE
Calyxamina A
      33   33   1     0     0
SMALL
USER_CHARGES

@<TRIPOS>ATOM
      1  C    0.7269  1.4284  0.866  C.3      1  ****      0
      2  C    1.9191  0.9937 -0.0517 C.3      1  ****      0
      3  N    2.1789 -0.4824  0.0064 N.3      1  ****      0
      4  C    0.9977 -1.4062 -0.0423 C.3      1  ****      0
      5  C   -0.168  -0.9399  0.8914 C.3      1  ****      0
      6  C   -0.4868  0.5297  0.6516 C.2      1  ****      0
      7  C   -1.6567  1.0121  0.2756 C.2      1  ****      0
      8  C    3.2192  1.6841  0.4424 C.3      1  ****      0
      9  C    1.6606  1.4475 -1.5146 C.3      1  ****      0
     10  C    1.5101 -2.7892  0.4374 C.3      1  ****      0
     11  C    0.4766 -1.5664 -1.4965 C.3      1  ****      0
     12  C   -2.9051  0.2048  0.025  C.2      1  ****      0
     13  O   -3.9597  1.0355 -0.3509 O.3      1  ****      0
     14  O   -3.0604 -1.0034  0.111  O.2      1  ****      0
     15  H    1.0364  1.3492  1.9076 H       1  ****      0
     16  H    0.4763  2.4666  0.6711 H       1  ****      0
     17  H    2.6323 -0.6535  0.9164 H       1  ****      0
     18  H   -1.0441 -1.5571  0.7243 H       1  ****      0
     19  H     0.141  -1.0573  1.9295 H       1  ****      0
     20  H   -1.7848  2.0743  0.1184 H       1  ****      0
     21  H    3.4561  1.3831  1.4585 H       1  ****      0
     22  H    4.0518  1.4128 -0.1997 H       1  ****      0
     23  H    3.1054  2.7634  0.425  H       1  ****      0
     24  H    0.6571  1.2058 -1.8399 H       1  ****      0
     25  H    1.7875  2.5221 -1.5931 H       1  ****      0
     26  H    2.3687  0.9652  -2.181  H       1  ****      0
     27  H    1.9014  -2.729  1.4483 H       1  ****      0
     28  H    2.3011 -3.1399 -0.2186 H       1  ****      0
     29  H    0.7022 -3.5141  0.4267 H       1  ****      0
     30  H   -0.1211 -0.7187 -1.8069 H       1  ****      0
     31  H   -0.1464 -2.4524 -1.5613 H       1  ****      0
     32  H    1.3109 -1.6757 -2.1801 H       1  ****      0
     33  H   -4.7226  0.4208  -0.494  H       1  ****      0
```

@<TRIPOS>BOND

1	1	2	1
2	1	6	1
3	1	15	1
4	1	16	1
5	2	3	1
6	2	8	1
7	2	9	1
8	3	4	1
9	3	17	1
10	4	5	1
11	4	10	1
12	4	11	1
13	5	6	1
14	5	18	1
15	5	19	1
16	6	7	2
17	7	12	1
18	7	20	1
19	8	21	1
20	8	22	1
21	8	23	1
22	9	24	1
23	9	25	1
24	9	26	1
25	10	27	1
26	10	28	1
27	10	29	1
28	11	30	1
29	11	31	1
30	11	32	1
31	12	13	1
32	12	14	2
33	13	33	1

TABLA 10 Constantes Fisicoquimicas Obtenidas para Calyxamina A
(Gamess/Windows)

	E	H	G	CV	CP	S
	KCAL/MOL	KCAL/MOL	KCAL/MOL	CAL/MOL-K	CAL/MOL-K	CAL/MOL-K
ELEC.	0	0	0	0	0	0
TRANS.	0.889	1.481	-10.964	2.981	4.968	41.741
ROT.	0.889	0.889	-8.609	2.981	2.981	31.855
VIB.	222.611	222.611	210.189	46.298	46.298	41.665
TOTAL	224.389	224.981	190.616	52.26	54.247	115.26

E = energía
 H = entalpia
 G = energía libre de gibbs
 CV = capacidad calorífica a volumen constante
 CP = capacidad calorífica a presión constante
 S = entropía
 ELEC. = Energía Electrostática
 TRANS. = Energía Traslacional
 ROT. = Energía Rotacional
 VIB. = Energía Vibracional
 TOTAL = Sumatoria de todas las energías de enlace.

CALYXAMINA B

Coordenadas obtenidas por medio de Gamess (Firefly)

TABLA 11 *Coordenadas de Calyxamina B*

COORDINATES ATOM	OF CHARGE	ALL X	ATOMS Y	ARE Z
C	6	-0.6682839236	1.4912424422	0.4414467721
C	6	-2.0296560351	0.8935435355	-0.0067934540
N	7	-2.1014794344	-0.5040455921	0.5041777374
C	6	-1.0201735800	-1.4520041049	0.0939416160
C	6	0.3305941734	-0.7332997825	-0.0032393227
C	6	0.5064144905	0.5566277538	0.1471480161
C	6	1.8355107331	1.3167162876	0.0684219124
C	6	-3.1823343025	1.6757665318	0.6760053420
C	6	-2.1900762629	1.0286488064	-1.5496384642
C	6	-0.9487990637	-2.5313521691	1.2155981674
C	6	-1.3025720131	-2.1869462613	-1.2546592929
C	6	3.1963875827	0.5807955446	-0.0547517968
O	8	3.1545729361	-0.8063901507	-0.1292997849
O	8	4.2654302909	1.1638419697	-0.0873747320
H	1	-0.6989965619	1.7009831028	1.5109396995
H	1	-0.5139489737	2.4443344496	-0.0616794770
H	1	-3.0085213461	-0.9079576842	0.2254746733
H	1	1.1713792760	-1.3785426215	-0.2082072023
H	1	1.9170311074	1.9487105197	0.9545354398
H	1	1.7889114544	2.0084752086	-0.7763522656
H	1	-3.1464243323	1.5358804178	1.7516942598
H	1	-4.1468851053	1.3294683274	0.3163111452
H	1	-3.0981706350	2.7363013542	0.4577703465
H	1	-2.3324867825	2.0724736370	-1.8133543307
H	1	-1.3138350377	0.6668751528	-2.0762207312
H	1	-3.0573364506	0.4706303631	-1.8936969852
H	1	-0.7453258440	-2.0652067771	2.1745188823
H	1	-0.1694806513	-3.2594496368	1.0056453697
H	1	-1.8968264878	-3.0553432599	1.2851040032
H	1	-0.5379400455	-2.9371746686	-1.4267271262
H	1	-2.2665154951	-2.6876424198	-1.2188703116
H	1	-1.2988266924	-1.5059850376	-2.0976143340
H	1	4.1060656572	-1.0708214334	-0.1928551939

Calyxamina B.mol2

#	Name:	Calyxamina B						
@<TRIPOS>MOLECULE								
Calyxamina B								
		33	33	1	0	0		
SMALL								
GAST_HUCK								
@<TRIPOS>ATOM								
1	C	-0.6689	1.4911	0.443	C.3	1	<1>	0.048067
2	C	-2.0289	0.894	-0.0068	C.3	1	<1>	0.027244
3	N	-2.1014	-0.5049	0.5032	N.3	1	<1>	-0.36527
4	C	-1.0198	-1.4507	0.0936	C.3	1	<1>	-0.0399
5	C	0.3314	-0.7335	-0.003	C.2	1	<1>	-0.07708
6	C	0.507	0.5563	0.1491	C.2	1	<1>	0.028214
7	C	1.8362	1.3158	0.0686	C.3	1	<1>	0.12899
8	C	-3.1841	1.6748	0.6756	C.3	1	<1>	-0.04364
9	C	-2.1906	1.0289	-1.5503	C.3	1	<1>	-0.04364
10	C	-0.9474	-2.5292	1.2147	C.3	1	<1>	-0.09718
11	C	-1.3051	-2.1861	-1.254	C.3	1	<1>	-0.09718
12	C	3.1967	0.58	-0.0546	C.2	1	<1>	0.263939
13	O	3.1566	-0.8084	-0.1305	O.3	1	<1>	-0.28864
14	O	4.2652	1.1638	-0.0876	O.2	1	<1>	-0.36165
15	H	-0.701	1.6984	1.5121	H	1	<1>	0.070434
16	H	-0.5145	2.4429	-0.0589	H	1	<1>	0.070434
17	H	-3.0066	-0.9086	0.2199	H	1	<1>	0.10354
18	H	1.1728	-1.3795	-0.2058	H	1	<1>	0.040031
19	H	1.9208	1.9496	0.9541	H	1	<1>	0.093197
20	H	1.7895	2.0056	-0.7758	H	1	<1>	0.093197
21	H	-3.1467	1.5354	1.7507	H	1	<1>	0.025055
22	H	-4.1466	1.3263	0.3159	H	1	<1>	0.025055
23	H	-3.1014	2.7353	0.456	H	1	<1>	0.025055
24	H	-2.3339	2.0725	-1.8137	H	1	<1>	0.025055
25	H	-1.3151	0.6703	-2.0771	H	1	<1>	0.025055
26	H	-3.0577	0.4708	-1.8934	H	1	<1>	0.025055
27	H	-0.7438	-2.0622	2.1735	H	1	<1>	0.00704
28	H	-0.1679	-3.2565	1.0051	H	1	<1>	0.00704
29	H	-1.8958	-3.0536	1.2855	H	1	<1>	0.00704
30	H	-0.5421	-2.9385	-1.4272	H	1	<1>	0.00704
31	H	-2.2686	-2.6845	-1.2145	H	1	<1>	0.00704

	32	H	-1.3003	-1.5059	-2.0983	H	1	<1>	0.00704
	33	H	4.1095	-1.0706	-0.1919	H	1	<1>	0.254322
@<TRIPOS>BOND									
	1		1	2			1		
	2		1	6			1		
	3		1	15			1		
	4		1	16			1		
	5		2	3			1		
	6		2	8			1		
	7		2	9			1		
	8		3	4			1		
	9		3	17			1		
	10		4	5			1		
	11		4	10			1		
	12		4	11			1		
	13		5	6			2		
	14		5	18			1		
	15		6	7			1		
	16		7	12			1		
	17		7	19			1		
	18		7	20			1		
	19		8	21			1		
	20		8	22			1		
	21		8	23			1		
	22		9	24			1		
	23		9	25			1		
	24		9	26			1		
	25		10	27			1		
	26		10	28			1		
	27		10	29			1		
	28		11	30			1		
	29		11	31			1		
	30		11	32			1		
	31		12	13			1		
	32		12	14			2		
	33		13	33			1		
@<TRIPOS>SUBSTRUCTURE									
	1	****		1	TEMP		0	****	****
									0
									ROOT

TABLA 12 Constantes Fisicoquímicas Obtenidas para Calyxamina B
(Gamess/Windows)

	E	H	G	CV	CP	S
	KCAL/MOL	KCAL/MOL	KCAL/MOL	CAL/MOL-K	CAL/MOL-K	CAL/MOL-K
ELEC.	0	0	0	0	0	0
TRANS.	0.889	1.481	-10.964	2.981	4.968	41.741
ROT.	0.889	0.889	-8.66	2.981	2.981	32.027
VIB.	221.625	221.625	209.354	44.963	44.963	41.156
TOTAL	223.402	223.995	189.73	50.925	52.912	114.924

E = energía
 H = entalpia
 G = energía libre de gibbs
 CV = capacidad calorífica a volumen constante
 CP = capacidad calorífica a presión constante
 S = entropía
 ELEC. = Energía Electrostática
 TRANS. = Energía Traslacional
 ROT. = Energía Rotacional
 VIB. = Energía Vibracional
 TOTAL = Sumatoria de todas las energías de enlace.

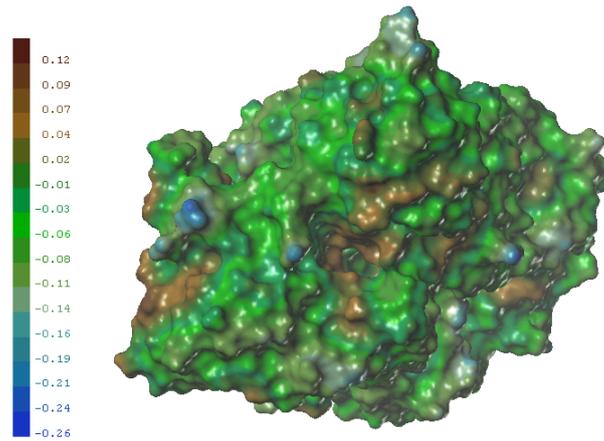
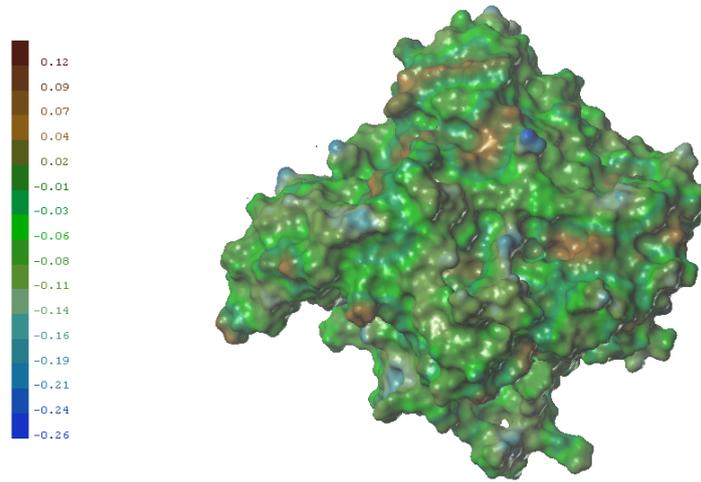
TABLA 13 Determinación de Constantes Farmacofóricas para Calyxaminas

Compuesto	RELACION ESTERICA ELECTROSTATICA	RELACION DE H DADORES Y ACEPTORES	CLOGP	CLOGP ERROR	COMFA
ACETILCOLINA	1.9024	0.1152	-7.099	30	575
CALYXAMINA A	0.3204	0.1504	-0.141	0	100
CALYXAMINA B	0.3229	0.1597	-0.441	0	102

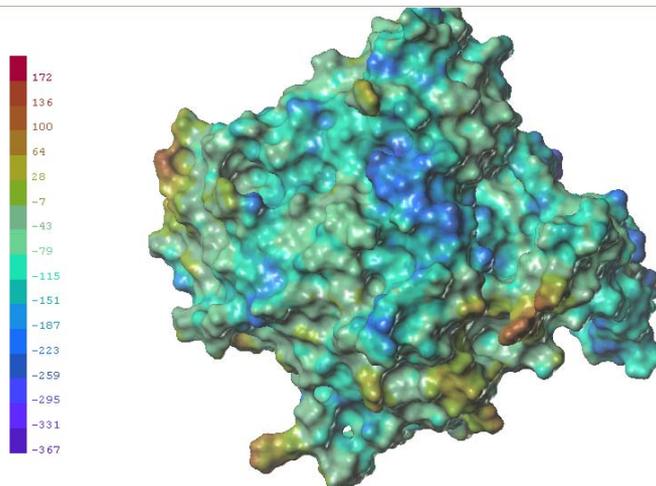
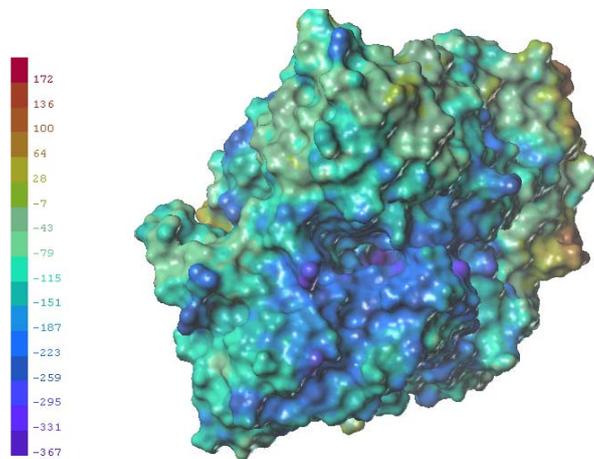
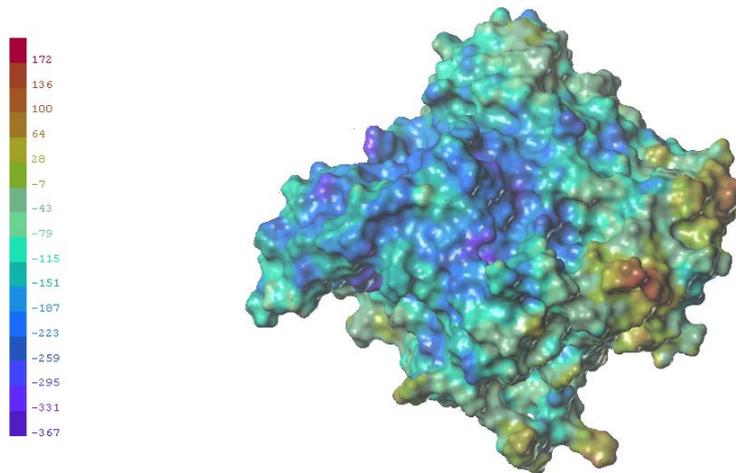
Compuesto	ESTERICO	ELECTROSTATICA	HIDROFOBICO	H DONADORES	H ACEPTORES
ACETILCOLINA	0.2009	1.8971	0.0667	0	0.1629
CALYXAMINA A	0.4481	0.0475	0.2861	0.0931	0.167
CALYXAMINA B	0.4405	0.085	0.2695	0.0842	0.1918

Análisis de Propiedades Bioquímicas de Acetilcolinesterasa

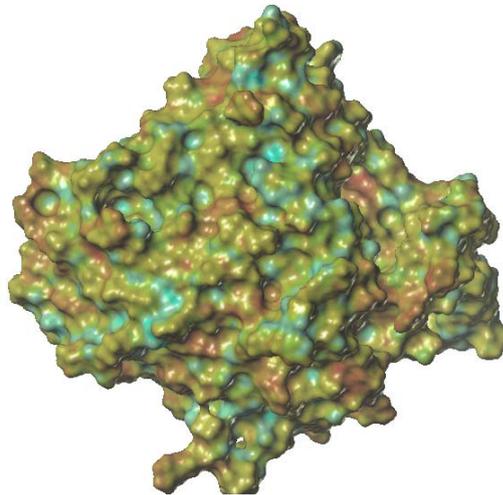
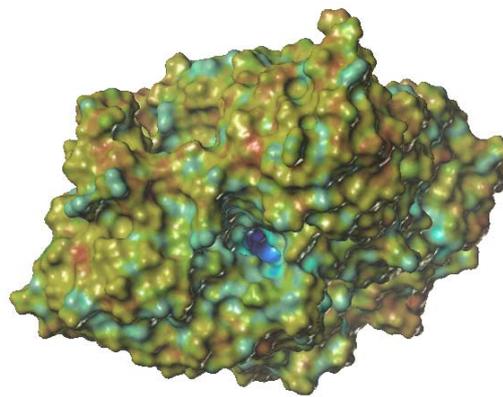
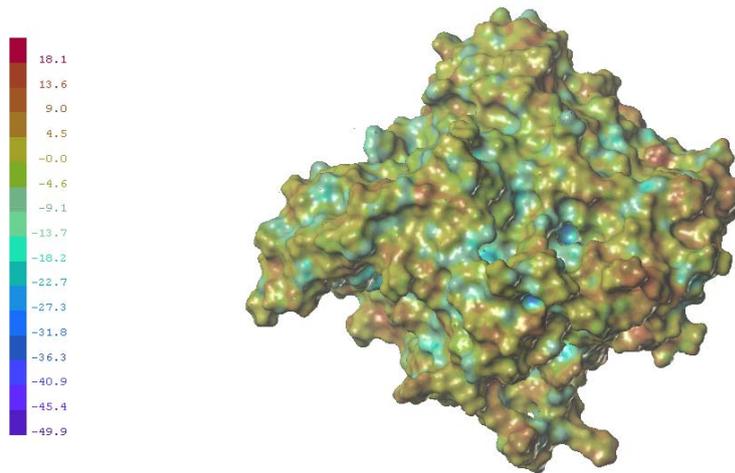
GRAFICA No.1 Potencial Lipofílico



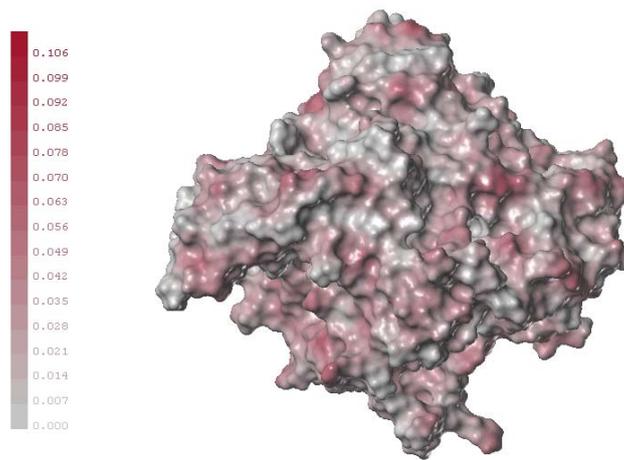
GRAFICA No.2 Potencial Eléctrico



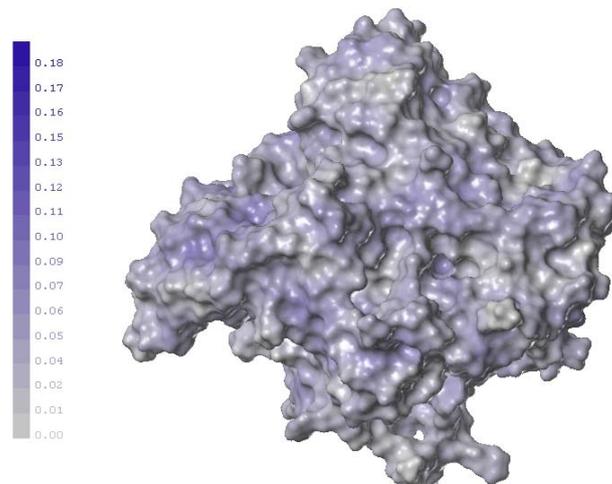
GRAFICA No.3 Cargas de Poisson Boltzman



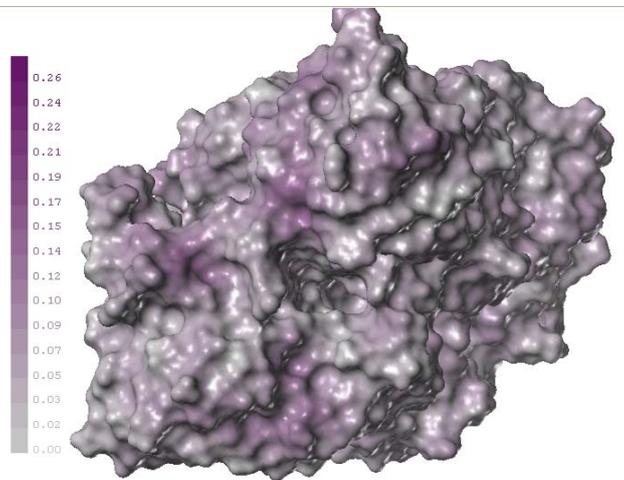
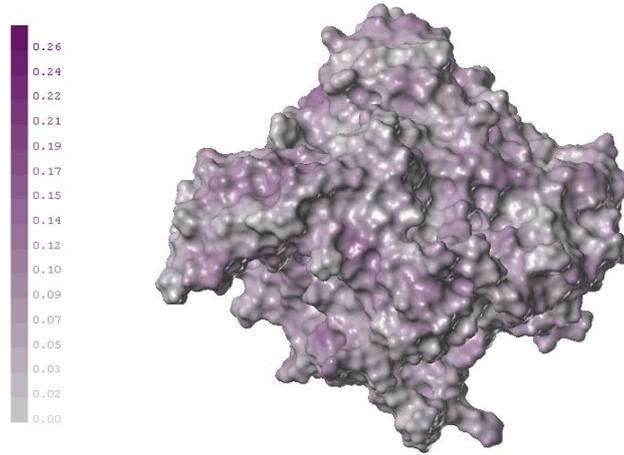
GRAFICA No.4 Densidad de Dadores de Protones



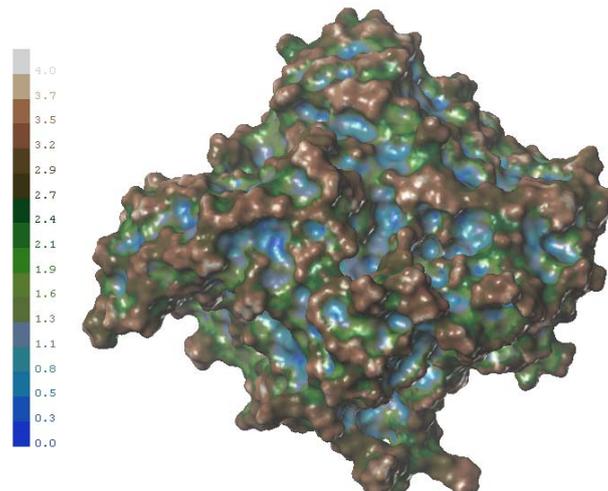
GRAFICA No.5 Densidad de Aceptores de Protones



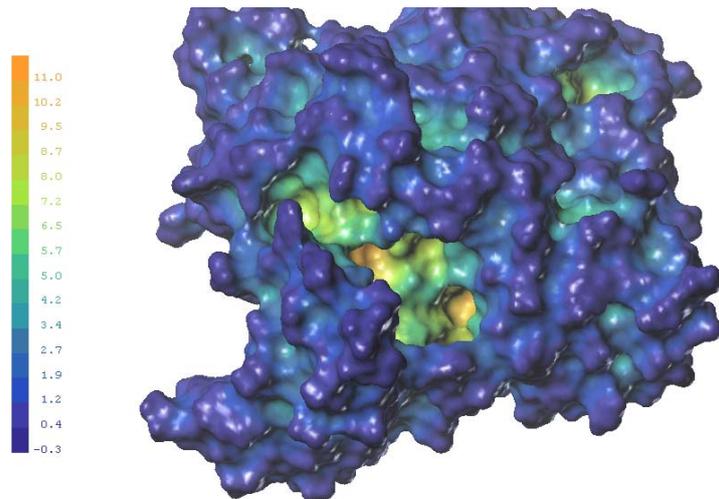
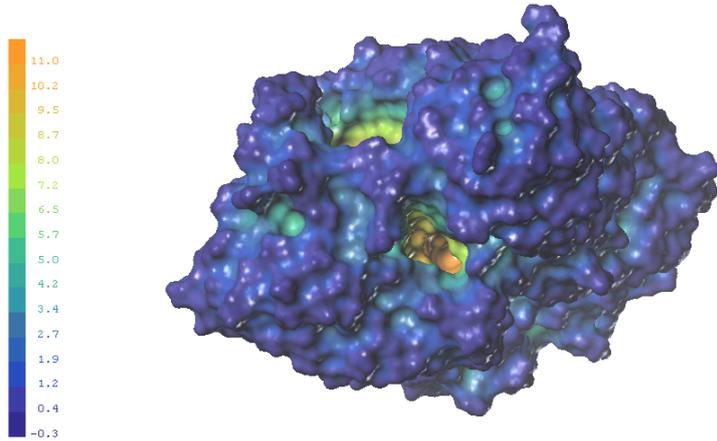
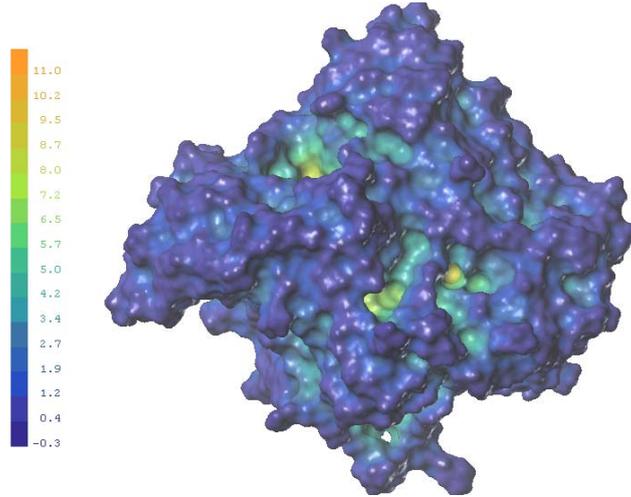
GRAFICA No.6 *Relación de la Densidad de Aceptores y Donadores de Protones*



GRAFICA No.7 *Curvatura Local*



GRAFICA No.8 *Análisis de Profundidad de cavidades.*



GRAFICA No.9 Puentes de Hidrogeno

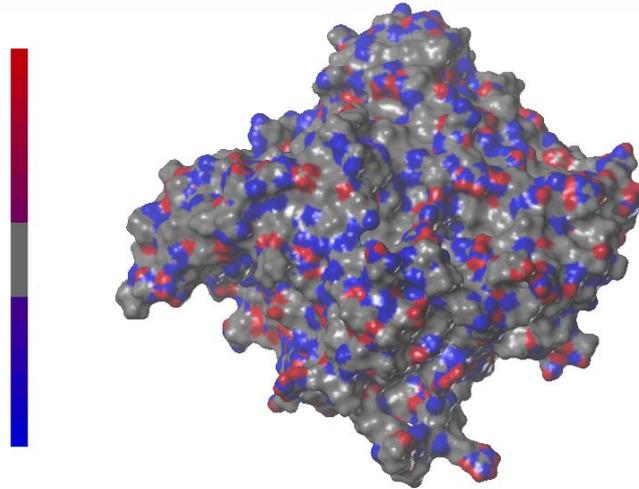


TABLA 14 DETERMINACIÓN DEL SITIO ACTIVO: Calyxamina A

Corrida No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rango	1_1	1_1	1_1	1_1	1_1	1_1	1_1	1_1	1_1
Energía de Enlace	6130000	4460000	-6.6	-6.51	-5.01	-6.45	-4.57	-6.61	-7.59
Constante de Inhibición KI (uM)	NA	NA	14.62	17.05	211.02	18.65	450.58	14.34	2.74
Energía Intermolecular	-4.81	-6.99	-6.89	-6.8	-5.31	-6.75	-4.86	-6.91	-7.89
Energía Interna	6130000	4460000	-0.21	-0.21	-0.21	-0.21	-0.19	-0.21	-0.12
Energía Torcional	0.27	0.27	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Energía Extendida e No enlace	-0.31	0	-0.21	-0.21	: -0.21	-0.21	-0.19	-0.21	: -0.12
Media de la Raiz Cuadrada (RMS)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RMS de Referencia	181.75	195.29	206.73	206.93	195.33	206.89	230.67	206.76	206.6
Eficiencia de Ligando	437857. 1	318571. 3	-0.31	17.05	-0.36	-0.46	-0.33	-0.47	-0.54

TABLA 15 RESULTADOS OBTENIDOS DE EVALUACIÓN: Calyxamina A- Acetilcolinesterasa
Corrida 11, Rango 1_1,

RANGO 1_1	
Energía de enlace	-7.59
Constante de inhibición KI	2.74 μ M
Energía intermolecular	-7.89
Energía Interna	-0.12
Energía Torsional	0.3
Energía Extendida de no enlace	-0.12
Grupo de Raíz cuadrada media	0.0
Ref. Raíz cuadrada media	206.6
Eficiencia de ligando	-0.54

TABLA 16 Resultados Obtenidos De Evaluación: Calyxamina B - Acetilcolinesterasa

Corrida No.	B unica	B unica
Rango	1_1	2_1
Energía de Enlace	-6.43	-6.41
Constante de Inhibición KI	19.4 μ M	20.14 μ M
Energía Intermolecular	-7.32	-7.3
Energía Interna	-0.11	-0.15
Energía Torcional	0.89	0.89
Energía Extendidad e No enlace	-0.11	-0.15
Media de la Raíz Cuadrada (RMS)	0	0
RMS de Referencia	117.43	123.51
Eficiencia de Ligando	-0.46	-0.46

TABLA 17 Docking Acetilcolina-Acetilcolinesterasa**CORRIDA 1**

Rango	Rank 1_1	Rank 4_1
Energía de Enlace Kcal/mol	-3.36	-3.24
Constante de Inhibición KI uM	3.44	4.19
Energía Intermolecular Kcal/mol	-4.55	-4.44
Energía Torsional Kcal/mol	1.19	1.19
Energía Interna Kcal/mol	-0.38	-0.26
Energía Extendida de No-enlace Kcal/mol	-0.38	-0.26
Raíz cuadrada media del Cluster (RMS)	0	0
Raíz cuadrada media de referencia (Ref RMS)	203.67	178.75
Indice de eficiencia del ligando	-0.34	-0.32

TABLA 18 Docking Acetilcolina-Acetilcolinesterasa**CORRIDA 2**

Rango	1_1
Energía de Enlace	-3.47
Constante de Inhibición KI	2.84mM
Energía Intermolecular	-4.67
Energía Interna	0.32
Energía Torcional	1.19
Energía Extendida e No enlace	-0.32
Media de la Raiz Cuadrada (RMS)	0
RMS de Referencia	123.22
Eficiencia de Ligando	-0.35

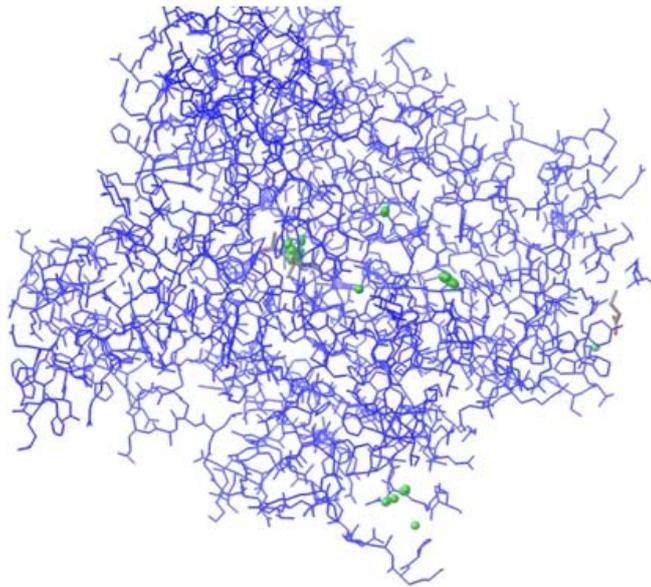
TABLA 19 Docking Calyxamina y la Acetilcolinesterasa.

Propiedad	Calyxamina	Acetilcolina
Energía de Enlace Kcal/mol	-7.59	-3.47
Constante de Inhibición KI uM	2.4	2.8
Energía Intermolecular Kcal/mol	-7.89	-4.67
Energía Torsional Kcal/mol	0.3	0.32
Energía Interna Kcal/mol	-0.12	1.19
Energía Extendida de No-enlace Kcal/mol	-0.12	-0.32
Raíz cuadrada media del Cluster (RMS)	0	0
Raíz cuadrada media de referencia (Ref RMS)	206.6	123.22
Indice de eficiencia del ligando	-0.54	-0.35

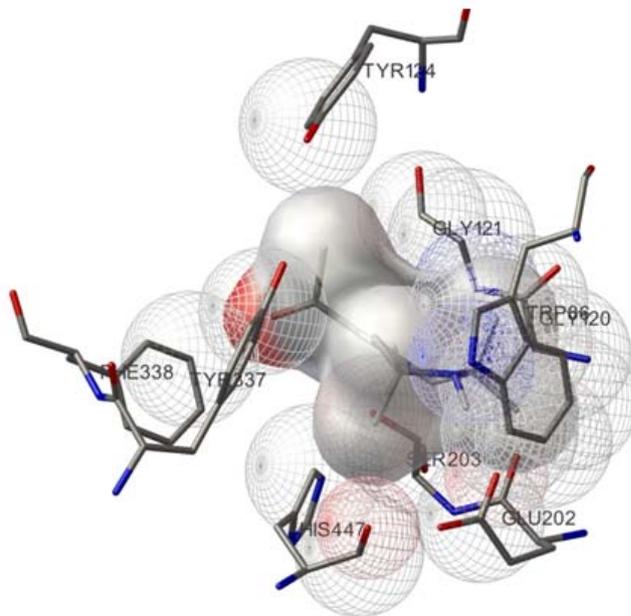
GRAFICA No.10 Determinación del Sitio Activo de Calyxaminas en Acetilcolinesterasa:

Docking Calyxamina A –Acetilcolinesterasa

Corrida1, Todos los rangos

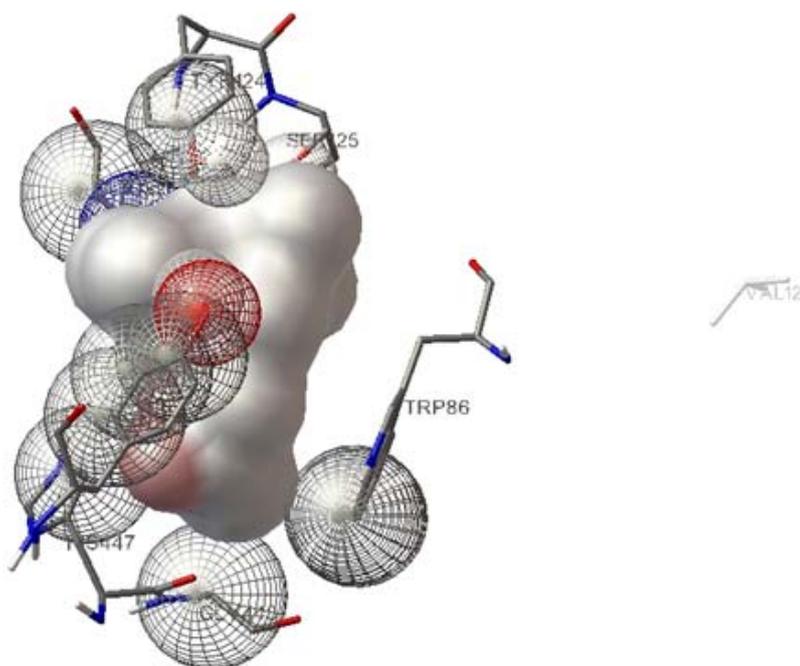


GRAFICA No.11 Corrida 9, Rango 1_1 , Calyxamina A- Acetilcolinesterasa Análisis de las interacciones cercanas.



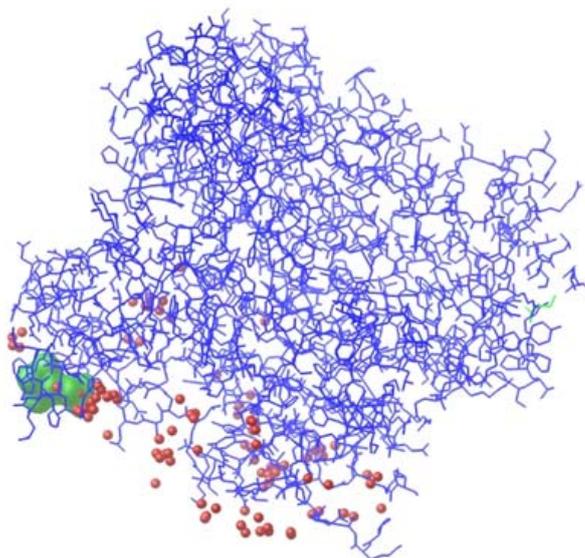
GRAFICA No.12 Corrida 3, Rango 1_1 Calyxamina A– Acetilcolinesterasa.

Acercamiento: Puede observarse que la intervección de TRP86 es igualmente iviedente



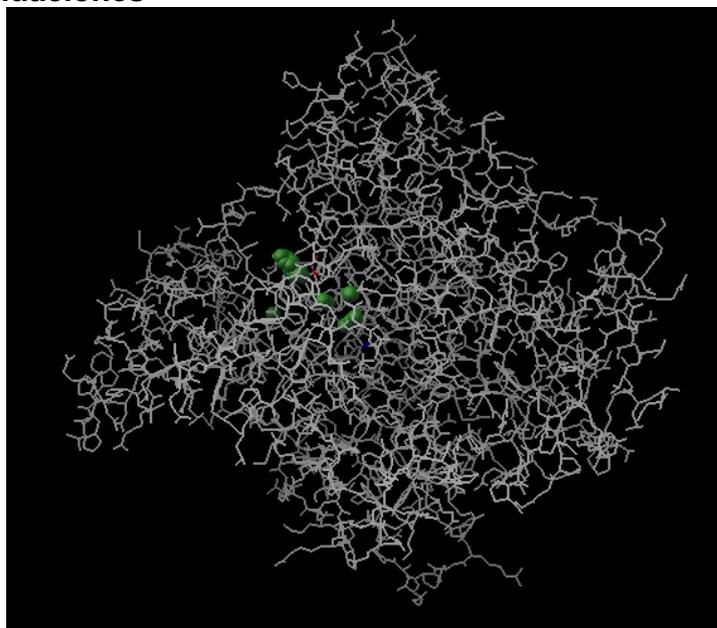
GRAFICA No.13 Peores Evaluaciones:

Corrida 1, Todos los Rangos, Calyxamina-Acetilcolinesterasa. Las energías de enlace obtenidas en estas evaluaciones fueron las más altas, lo cual se interpreta como uniones ligando-enzima muy inestable, en la gráfica siguiente puede observarse que todos los dockings quedaron en la periferia de la enzima.

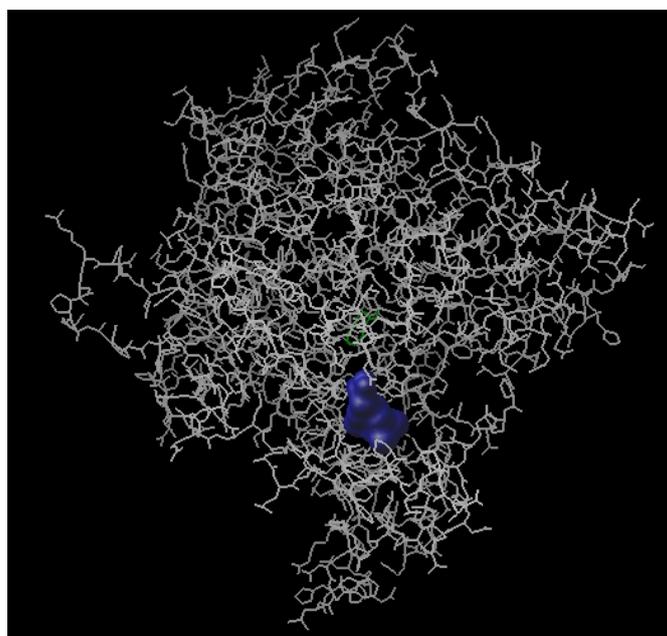


GRAFICA No.14 Docking para Calyxamina B

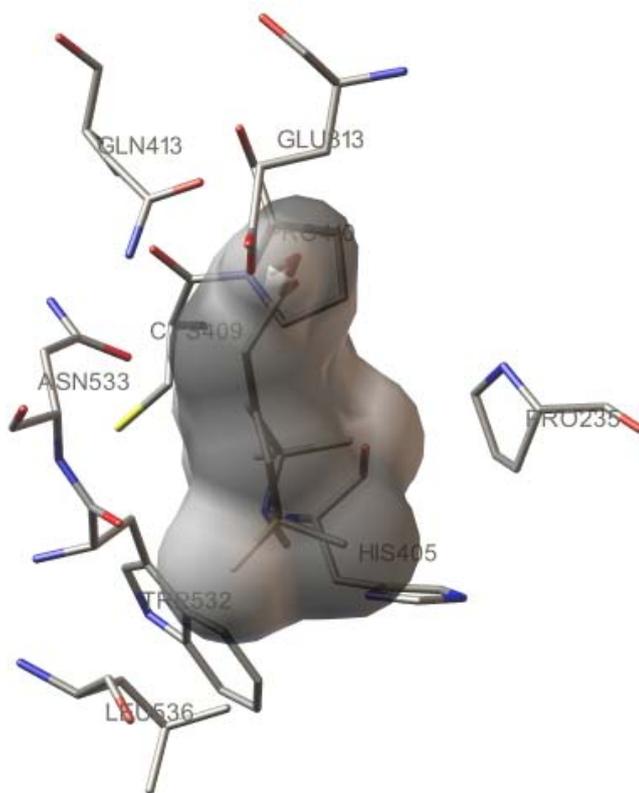
General, Todas las evaluaciones



GRAFICA No.15 Segundo Sitio Activo encontrado para Calyxamina A, el primer lugar en Ranking para este docking.

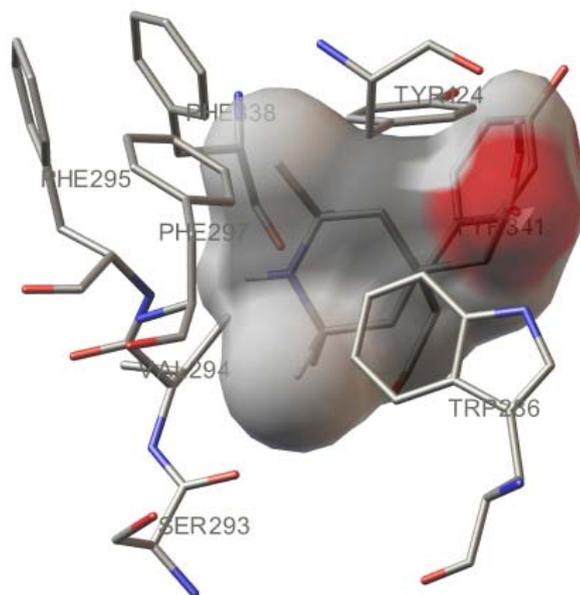


GRAFICA No.16 Interacciones para Calyxamina B Rango 1_1

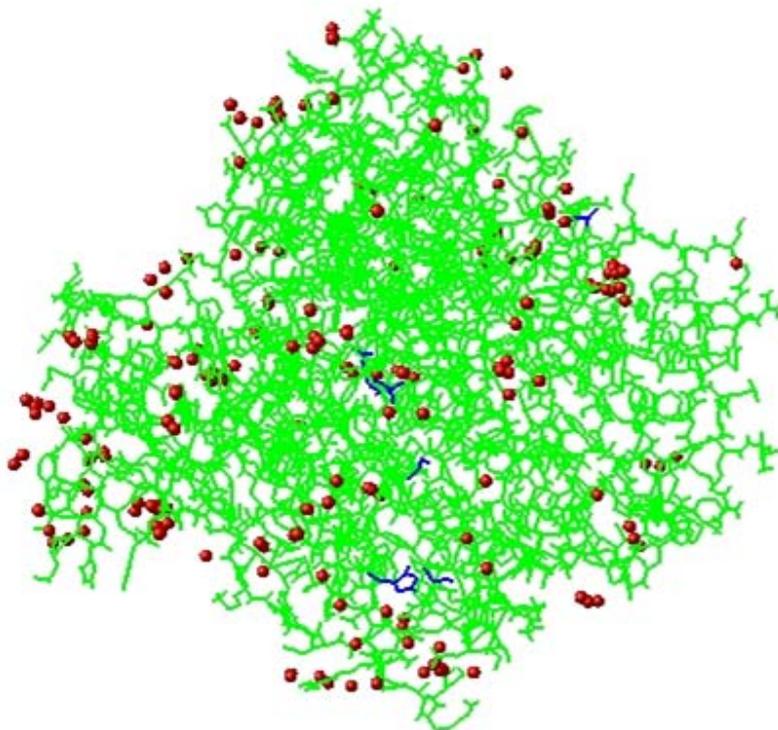


GRAFICA No.17 Interacciones para Calyxamina B Rango 2_1

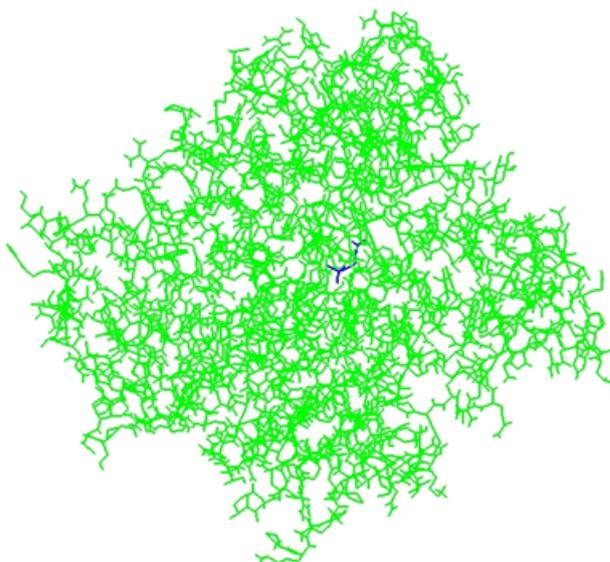
En el sitio Activo. TRP86 no aparece visible, se encuentra atrás de la Calyxamina.



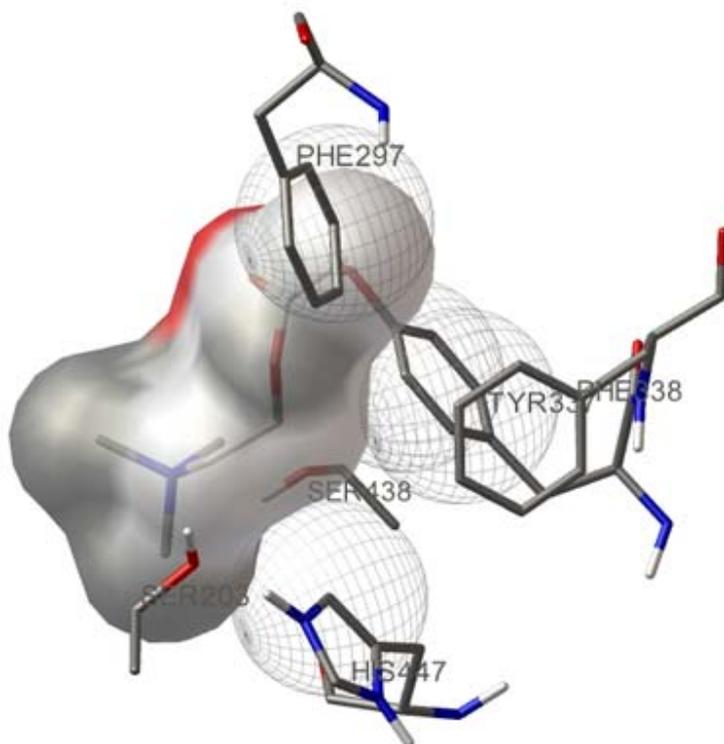
GRAFICA No.18 Todas las evaluaciones, Docking 1 Acetilcolina-Acetilcolinesterasa



GRAFICA No.19 Mejor Evaluación Docking 1, Rango 1_1, Acetilcolina-Acetilcolinesterasa

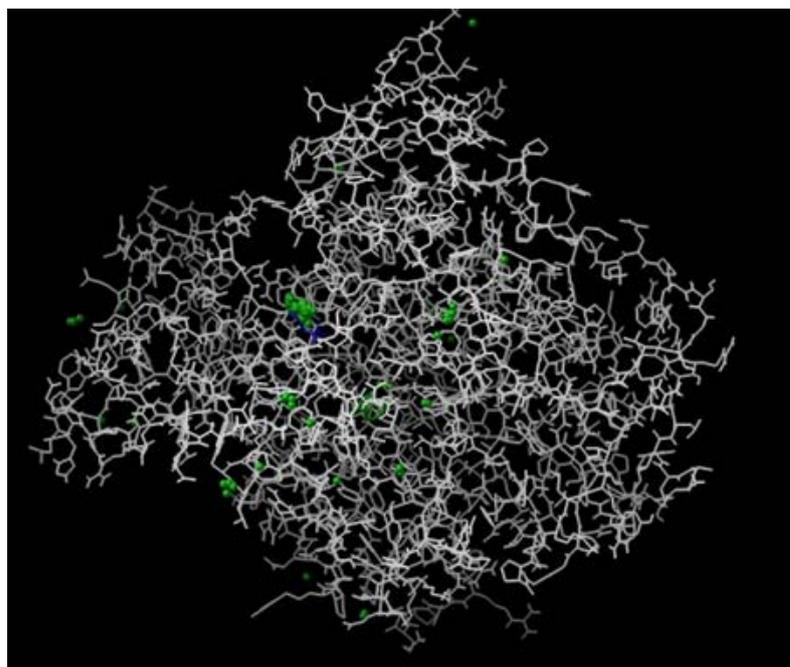


GRAFICA No.20 Acercamiento Docking 1, Rango 1_1 Acetilcolina-Acetilcolinesterasa

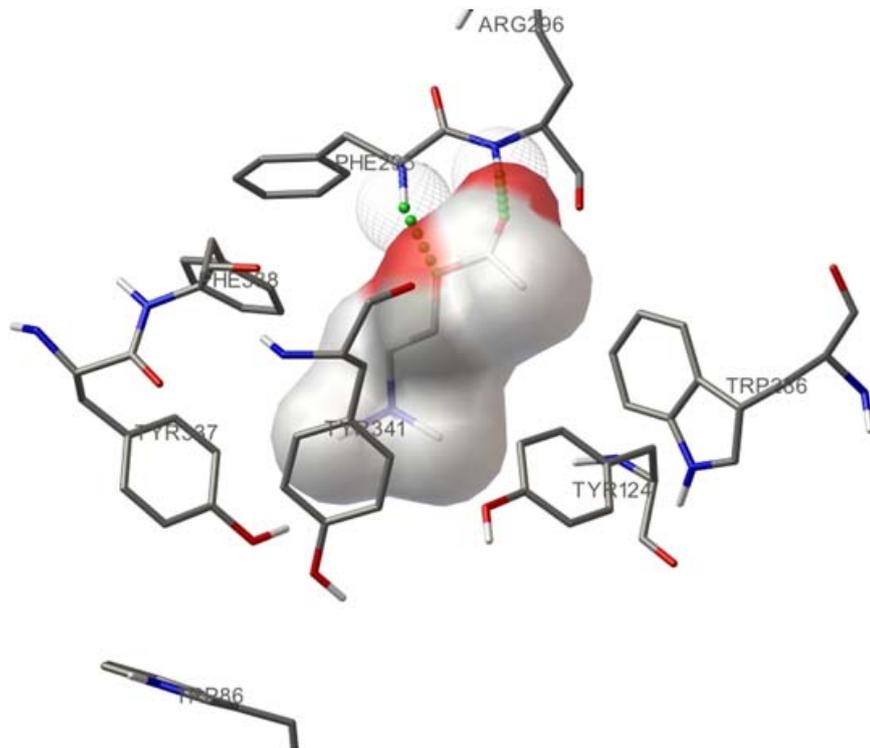


GRAFICA No.21 Docking 2, Actilcolina-Acetilcolinesterasa

Todas la Evaluaciones Dociing 2 Acetilcolina-Acetilcolinesterasa: La mejor evaluación de todas puede observarse de color azul al centro de la enzima.



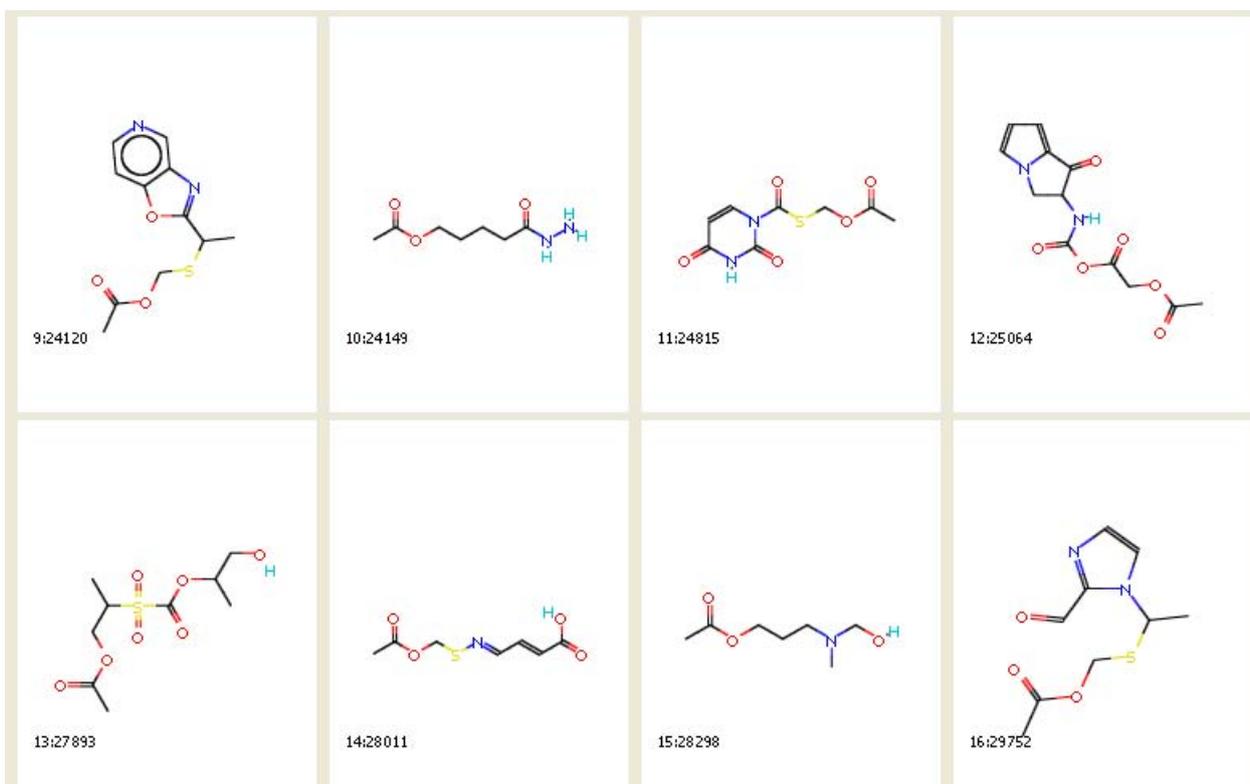
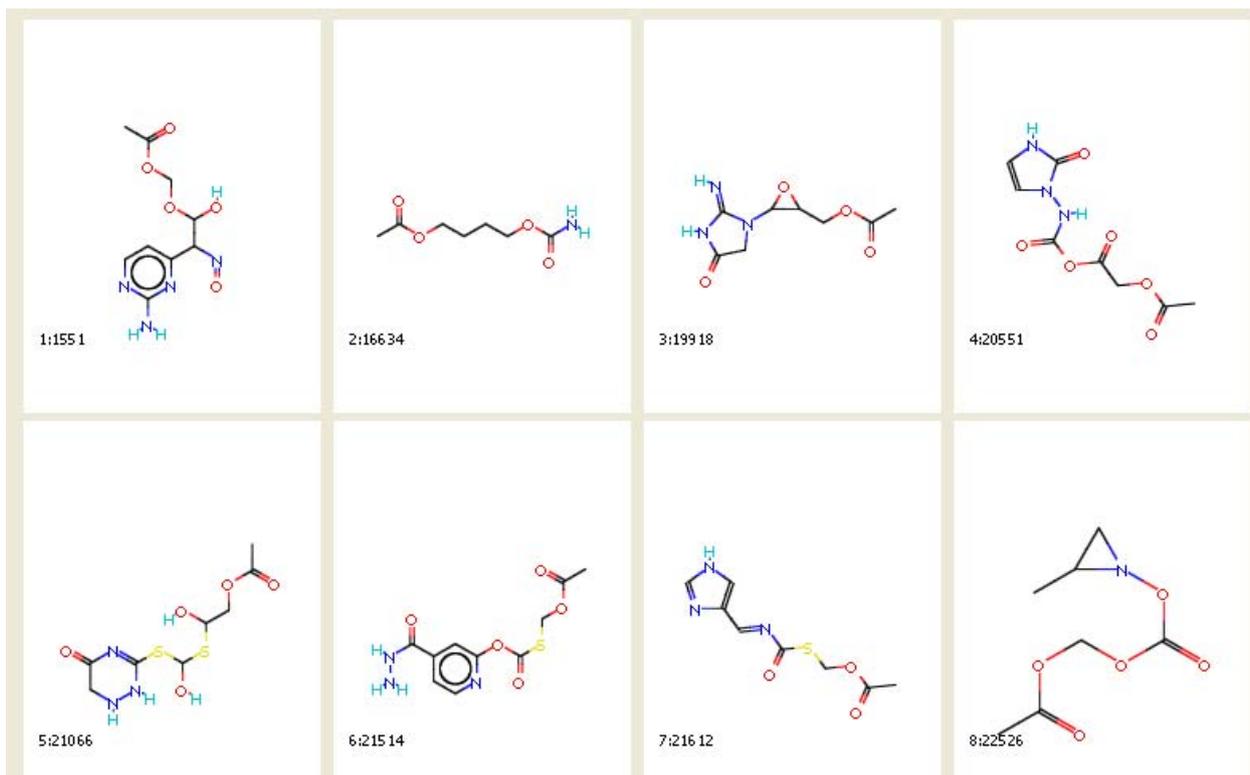
GRAFICA No.22 Acercamiento Docking 2, Rango 1_1 Acetilcolina-Acetilcolinesterasa. Puede observarse nuevamente la cercanía de TRP 86

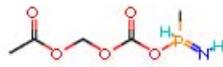


Diseño de Derivados

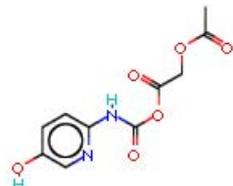
Se han obtenido los siguientes resultados para el diseño de derivados de Calyxaminas A y B. Para tal efecto se ha tomado en cuenta también el docking de Acetilcolina, la cual tiene el mismo sitio activo que las Calyxaminas.

De manera que para el diseño del nuevo fármaco se ha utilizado como base el grupo COOH de la acetilcolina, y la estructura química principal del derivado ha sido escogida en base a Calyxaminas como plantillas, debido a que ha sido comprobado in vitro, la que la composición farmacofórica de Calyxaminas es buena para enlazarse a la Acetilcolinesterasa, resultados que en esta investigación han sido confirmados mediante el análisis teórico de los docking previamente mostrados en esta sección.





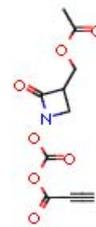
17:33618



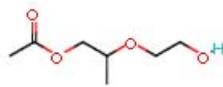
18:34160



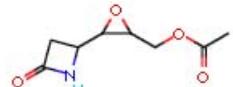
19:34410



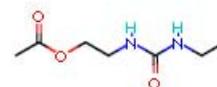
20:34610



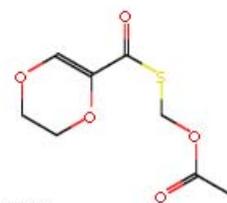
21:35250



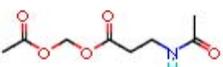
22:36268



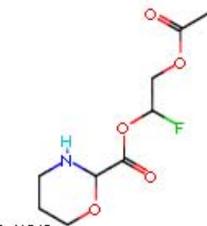
23:37082



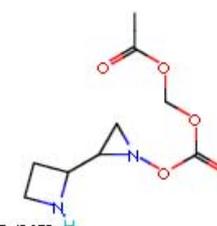
24:3810



25:38293



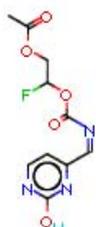
26:41212



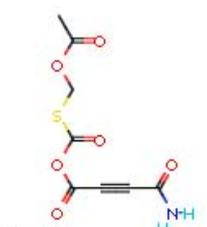
27:42872



28:45967



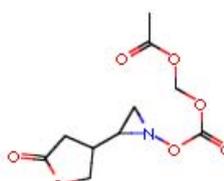
29:47419



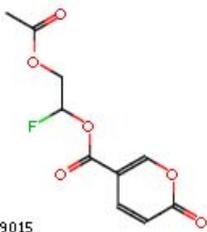
30:47854



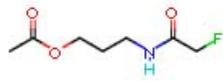
31:47872



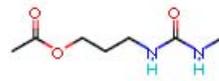
32:48159



33:49015



34:49138



35:49149



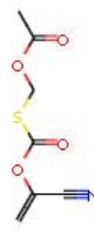
36:49156



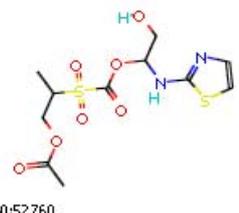
37:50919



38:51261



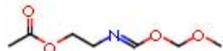
39:52557



40:52760



41:53256



42:53671



43:53717



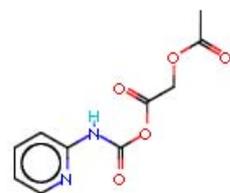
44:53923



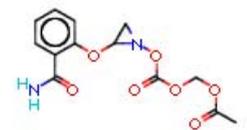
45:54724



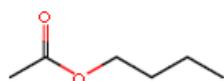
46:54876



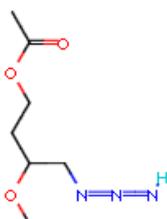
47:55151



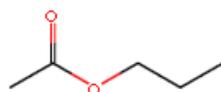
48:55218



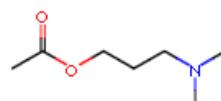
49:55676



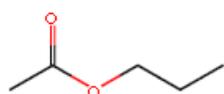
50:55679



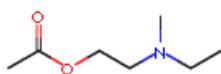
51:55680



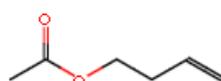
52:55682



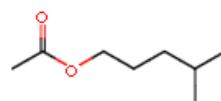
53:55685



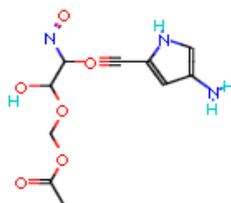
54:55686



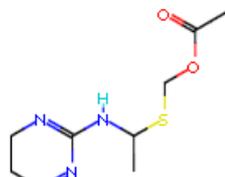
55:55693



56:55694



57:6751



58:7052

TABLA 20 valores y constantes farmacofóricas de la primera serie de diseños.

Derivado (Código)	STERIC	HYDROPHOBIC	DONOR AND ACCEPTOR	ACCEPTOR	ELECTROSTATIC	DONOR	STERIC AND ELECTROSTATIC	CLOGP
1551	7.3582	3.0376	6.2096	8.0355	1.6367	2.5049	5.4544	-2.0886
16634	6.5582	4.1409	3.7033	4.2951	1.3064	2.119	4.8179	-0.158
19918	6.9237	3.4936	4.9215	6.6229	1.7118	1.5131	5.1864	-0.9518
20551	6.6983	5.2096	5.5159	7.2571	1.839	2.0229	5.0809	-0.1369
21066	7.3515	7.0728	5.344	6.5558	1.6423	2.6587	5.4516	-2.4119
21514	7.1462	5.9454	4.6648	6.2652	1.606	1.4609	5.3022	-0.9224
21612	6.2487	4.1084	3.9707	5.2212	1.6469	1.4614	4.7154	-0.361
22526	6.3111	3.4016	3.0418	4.3017	1.3064	0	4.6499	0.3439
24120	7.1492	3.7187	3.2465	4.5913	1.4333	0	5.2545	0.939
24149	6.779	3.6362	3.3991	4.3337	1.5061	1.471	5.0245	-1.078
24815	6.4725	4.8191	4.5763	6.1593	1.8841	1.4051	4.9494	-0.1253
25064	7.4797	4.5291	5.076	6.8966	1.9732	1.4086	5.6451	0.0971
27893	7.6859	4.1472	5.3902	7.5214	1.4392	0.8769	5.6221	0.0231
28011	5.8327	4.2613	3.9553	5.4021	1.3346	1.0263	4.3349	0.732
28298	6.8193	2.8737	3.2839	4.4788	1.3287	0.8685	5.0017	0.4962
29752	6.9626	4.6668	3.8228	5.4063	1.6223	0	5.1837	0.0932
33618	5.8942	3.6971	3.0271	4.2809	1.2837	0	4.361	-0.1316
34160	6.9528	3.8589	5.2076	6.935	1.7548	1.7526	5.2201	0.2584
34410	7.0592	4.1954	4.7136	6.0576	1.6904	1.9676	5.27	-0.1496
34610	6.8159	5.5627	4.3572	6.1621	1.7132	0	5.115	-0.4795
35250	6.6024	4.0681	3.9796	5.4845	1.1771	0.8927	4.8147	-0.0992
36268	6.516	4.5467	4.3295	5.7416	1.666	1.5037	4.8994	-1.7475
37082	6.6814	5.1798	3.9581	4.3425	1.3396	2.4976	4.9107	0.4128
3810	6.3341	5.8267	2.3687	3.3499	1.4032	0	4.6936	0.04
38293	6.7784	3.7266	4.1159	5.4608	1.523	1.4249	5.0292	-0.6214
41212	7.3721	3.5415	4.5934	6.1921	1.5388	1.3888	5.4353	-0.0832

42872	7.3126	4.6805	3.4771	4.278	1.3924	1.7145	5.355	-0.5653
45967	6.8041	3.674	4.3204	5.7806	1.5592	1.3995	5.0575	-0.4454
47419	7.0388	4.267	4.5478	6.2658	1.4636	1.0258	5.1879	0.1451
47854	5.9393	4.9844	5.0372	6.4872	1.5766	2.0813	4.4859	-1.102
47872	5.5842	4.5909	4.3399	5.6457	1.3497	1.7024	4.1729	0.048
48159	7.5529	4.5374	3.7261	5.2695	1.6961	0	5.6036	-1.7821
49015	6.6805	3.0199	3.7217	5.2632	1.7654	0	5.0429	0.1306
49138	6.4582	3.8407	3.3905	4.319	1.4301	1.4726	4.7853	-0.056
49149	6.723	4.7266	3.9258	4.3278	1.442	2.4591	4.9677	0.195
49156	6.8703	5.2676	4.5632	5.3403	1.7812	2.5619	5.1743	-1.2593
50919	6.8949	4.1961	6.4397	8.8828	1.8112	1.4202	5.201	-0.2347
51261	6.1921	6.2622	4.3511	6.1534	1.5982	0	4.661	-0.1268
52557	5.5802	4.0592	3.4768	4.9169	1.5179	0	4.2276	0.652
52760	8.4153	5.645	6.2732	8.4319	1.6133	1.9505	6.1653	0.1869
53256	8.3439	5.973	5.9865	7.4328	1.8656	2.8661	6.188	-2.7573
53671	6.3155	3.3629	3.4707	4.9083	1.3751	0	4.6727	0.0755
53717	5.6845	2.8539	3.0421	4.3022	1.345	0	4.2386	0.4548
53923	6.6941	3.2968	3.8453	5.4381	1.7646	0	5.0517	-0.5772
54724	6.7101	3.8076	3.7245	5.2672	1.5827	0	5.0018	-0.2179
54876	5.882	3.3582	3.3147	4.6877	1.2834	0	4.3527	0.4544
55151	6.8162	4.2864	4.9967	6.7744	1.7579	1.4214	5.1304	-0.0286
55218	8.0167	5.0315	4.1196	5.0129	1.7278	2.0992	5.9261	0.8183
55676	5.801	3.5163	2.1524	3.044	1.016	0	4.2259	1.769
55679	7.125	3.9472	3.1655	4.4767	2.3127	0	5.5436	0.925
55680	5.2578	2.9738	2.1524	3.044	1.012	0	3.8531	1.24
55682	6.6762	2.8444	2.2047	3.118	1.1708	0	4.8638	0.799
55685	5.2578	2.9738	2.1524	3.044	1.012	0	3.8531	1.24
55686	6.7043	3.3853	2.2147	3.132	1.0533	0	4.8562	1.0282
55693	5.4043	3.3174	2.1524	3.044	1.0448	0	3.9617	1.285
55694	6.8483	4.4648	2.1524	3.044	1.0265	0	4.9501	2.697
6751	7.4198	3.6834	5.4192	6.7852	1.5384	2.5196	5.4675	-3.8127
7052	7.371	3.6364	3.4422	4.4459	1.5487	1.4019	5.4373	-0.1781

Segunda Serie de Derivados

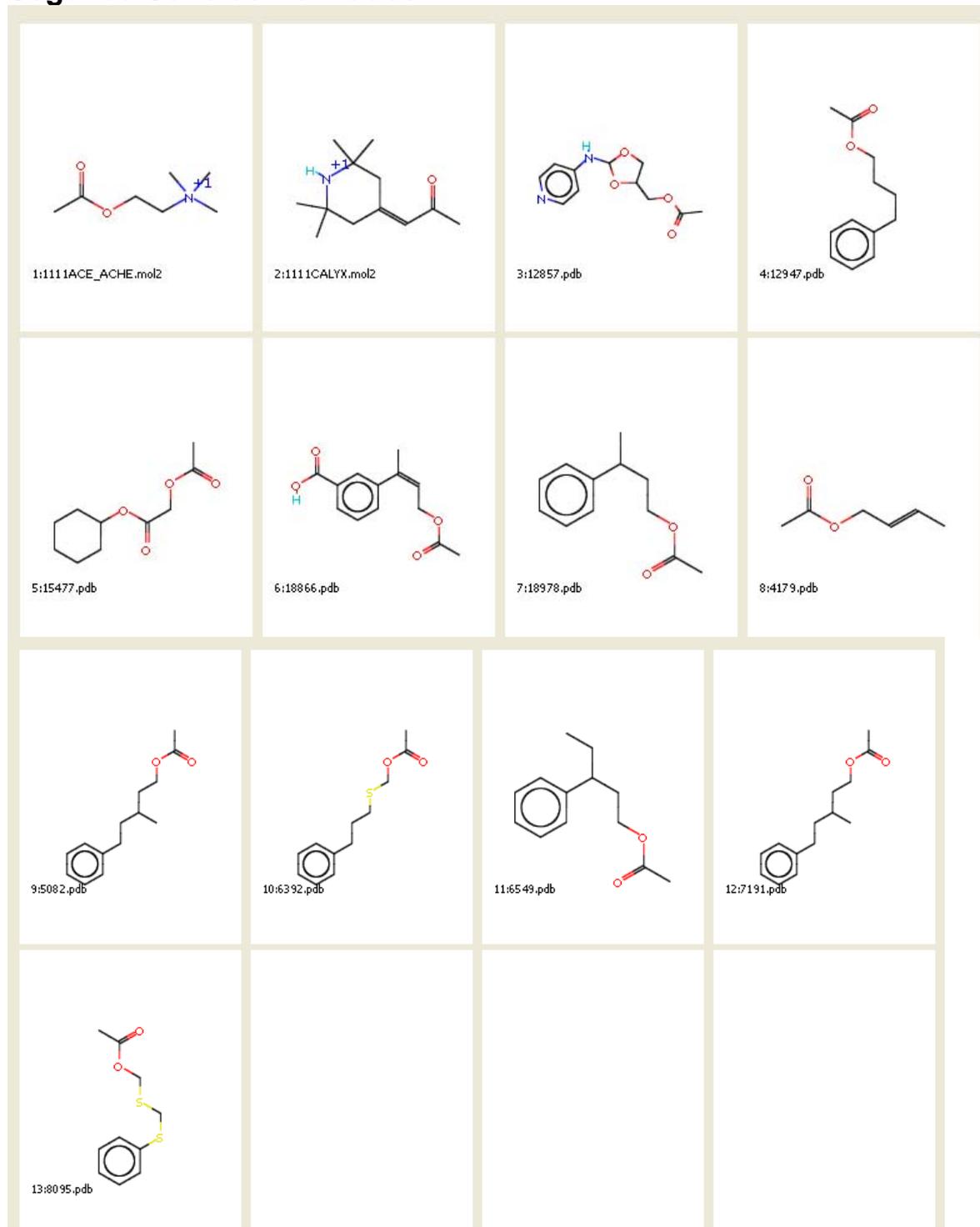


TABLA 21 Valores y constantes farmacofóricas de la segunda serie de diseños.

Punteos (Scores) Físicoquímicos

Molécula	Punteo Total	Crash	Polar	Punteo D	Punteo PMF	Punteo G	Punteo Químico	Punteo C	Punteo Global
18978.pdb	5.6767	-0.5653	1.0317	-158.17	-12.971	-169.2	-21.9284	1	1
5082.pdb	5.3996	-2.0628	1.1555	-146.25	-66.109	-209.01	-26.5611	3	3
12857.pdb	5.2719	-1.1394	3.1547	-151.95	-106.61	-140.99	-27.9321	2	2
Donepezilo	4.8097	-3.722	1.197	-164.79	-109.89	-265.22	-45.1705	4	4
6392.pdb	4.7162	-0.4712	1.1558	-159.71	-31.554	-165.05	-23.51	1	1
8095.pdb	4.667	-0.7485	1.3869	-151.57	-41.158	-158.53	-23.2558	1	1
18866.pdb	4.5443	-1.9186	1.6515	-166.78	-18.676	-178.63	-24.4218	1	1
6549.pdb	4.2023	-1.5697	1.0651	-147.1	-22.589	-177.8	-22.3417	1	1
15477.pdb	3.8476	-0.9784	1.1586	-126.23	-41.18	-136.59	-14.9106	1	1
7191.pdb	3.8133	-1.8005	0.994	-139.23	-52.835	-187.71	-25.0983	1	1
CALYX.mol2	3.437	-0.2735	1.9889	-491.78	-37.25	-110.38	-28.2603	1	1
12947.pdb	3.238	-1.2052	1.194	-157.35	-8.6066	-156.2	-21.4591	1	1
4179.pdb	2.8927	-0.4919	1.0548	-116.59	2.0068	-93.716	-12.6184	1	1
ACE_ACHE	2.6538	-0.2814	1.1357	-1074.4	-38.154	-95.901	-14.703	2	2

TABLA 22 Propiedades Farmacofóricas

Especie	CLOGP	CLOGP ERROR	CMR	CMR ERROR
ACE_ACHE	-7.099	30	2.651	0
CALYX	-3.249	59	4.2466	0
12857	-0.3364	0	5.5031	0
12947	2.052	0	5.2167	0
15477	0.965	0	4.5721	0
18866	1.561	0	5.9199	0
18978	1.922	0	5.2167	0
4179	0.35	0	2.6801	0
5082	2.98	0	6.1443	0
6392	1.8588	0	6.023	0
6549	2.451	0	5.6805	0
7191	2.98	0	6.1443	0
8095	1.4608	0	5.9017	0

CMR Columna de Refractividad Molar

CMR Error: Medida de dificultad encontrada al calcular MR para esta molécula.

CLOGP: Coeficiente del Logaritmo de Partición

CLOGP ERROR: Medida de la dificultad encontrada al calcular CLOGP.

TABLA 23 *Propiedades Farmacofóricas Segunda Serie de Derivados:*
Continuación

Especie	COMSIA STERIC	COMSIA ELECTROSTATIC	COMSIA HYDROPHOBIC	COMSIA DONOR	COMSIA ACCEPTOR	COMSIA STERIC AND ELECTROSTATIC	COMSIA DONOR AND ACCEPTOR
ACE_ACHE	4.1093	37.746	1.2825	0	3.4012	37.8577	2.405
CALYX	5.5469	33.8638	5.8642	2.3242	3.3827	34.0902	3.3351
12857	7.7452	11.7863	3.2098	1.6081	7.0531	12.9965	5.2402
12947	7.4764	11.854	6.2792	0	2.6694	12.9794	1.8875
15477	7.821	11.6506	4.0591	0	4.3413	12.8966	3.0697
18866	7.6021	11.8807	5.4432	1.1574	5.0014	13.0402	3.7211
18978	7.6066	11.8624	5.9734	0	2.6694	13.0249	1.8875
4179	4.7805	11.8698	3.5312	0	3.4012	12.3417	2.405
5082	8.5647	11.8319	6.9042	0	2.6694	13.2917	1.8875
6392	7.6148	11.7711	6.4563	0	2.98	12.9442	2.1071
6549	8.0175	11.8372	6.5334	0	2.6694	13.1248	1.8875
7191	8.4855	11.8349	6.9308	0	3.4012	13.269	2.405
8095	6.4192	11.755	6.9603	0	3.975	12.6009	2.8107

TABLA 24 *Tabla de Propiedades Fisicoquímicas, Segunda Serie de Derivados.*
Continuación

Especie	TOTAL_DIPOLE	Energía	Peso Molar
ACE_ACHE	15058.8	616.7528	130.08
CALYX	20141.3	2361.4127	175.14
12857	5000.05	127.1687	233.2
12947	4998.1	118.2679	187.21
15477	4997.93	132.5547	195.19
18866	4997.16	113.6486	229.21
18978	4998.18	121.8871	187.21
4179	4998.06	107.1408	109.1
5082	4998.16	128.2695	215.27
6392	4998.66	109.2833	219.28
6549	4998.21	129.6086	201.24
7191	4998.21	132.9112	215.27
8095	4998.97	106.7695	223.29

TABLA 25 Tabla de Comparación de Propiedades Farmacofóricas

Potencial Estérico: En esta gráfica se observa el mapa topológico de interacciones farmacofóricas positivas y negativas para el potencial estérico de los cuatro mejores diseños encontrados en base a las Calyxaminas. En esquema de bolas y barras color naranja se observa el sitio activo de la Acetilcolinesterasa; En esquema de bolas y barras coloreado según el tipo de átomo se encuentra la molécula diseñada (Candidato). Los mapas farmacofóricos de interacciones estéricas positivas se observan de color verde, las interacciones estéricas no favorables se observan de color amarillo. Debajo de cada gráfica al lado izquierdo y resaltado en negrilla se encuentra el código numérico asignado al compuesto; al lado derecho y sin resaltar se encuentra el puntaje asignado al campo farmacofórico para ese compuesto.

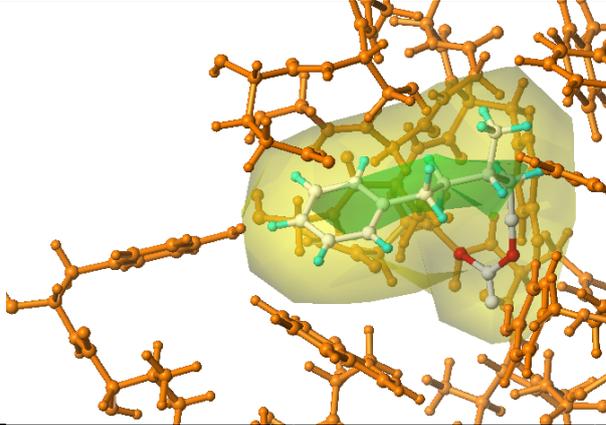
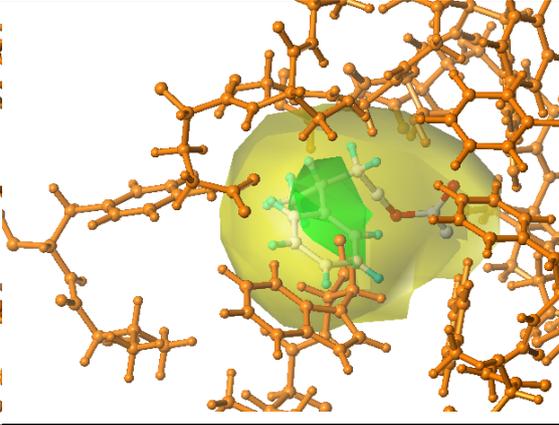
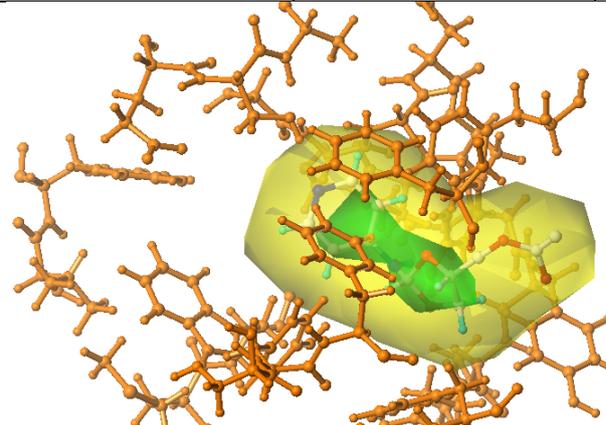
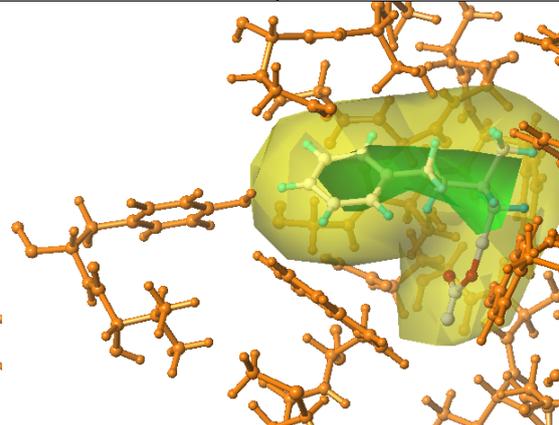
			
5082	8.5647	18978	7.6066
			
12857	7.7452	7191	8.4855

TABLA 26 *Potencial Electrostático:*

En esta gráfica se observa el mapa topológico de interacciones farmacofóricas positivas y negativas para el potencial electrostático de los cuatro mejores diseños encontrados en base a las Calyxaminas. En esquema de bolas y barras color naranja se observa el sitio activo de la Acetilcolinesterasa; En esquema de bolas y barras coloreado según el tipo de átomo se encuentra la molécula diseñada (Candidato). Los mapas farmacofóricos de interacciones electrostáticas positivas se observan de color azul, las interacciones electrostáticas no favorables se observan de color rojo. Debajo de cada gráfica al lado izquierdo y resaltado en negrilla se encuentra el código numérico asignado al compuesto; al lado derecho y sin resaltar se encuentra el puntaje asignado al campo farmacofórico para ese compuesto.

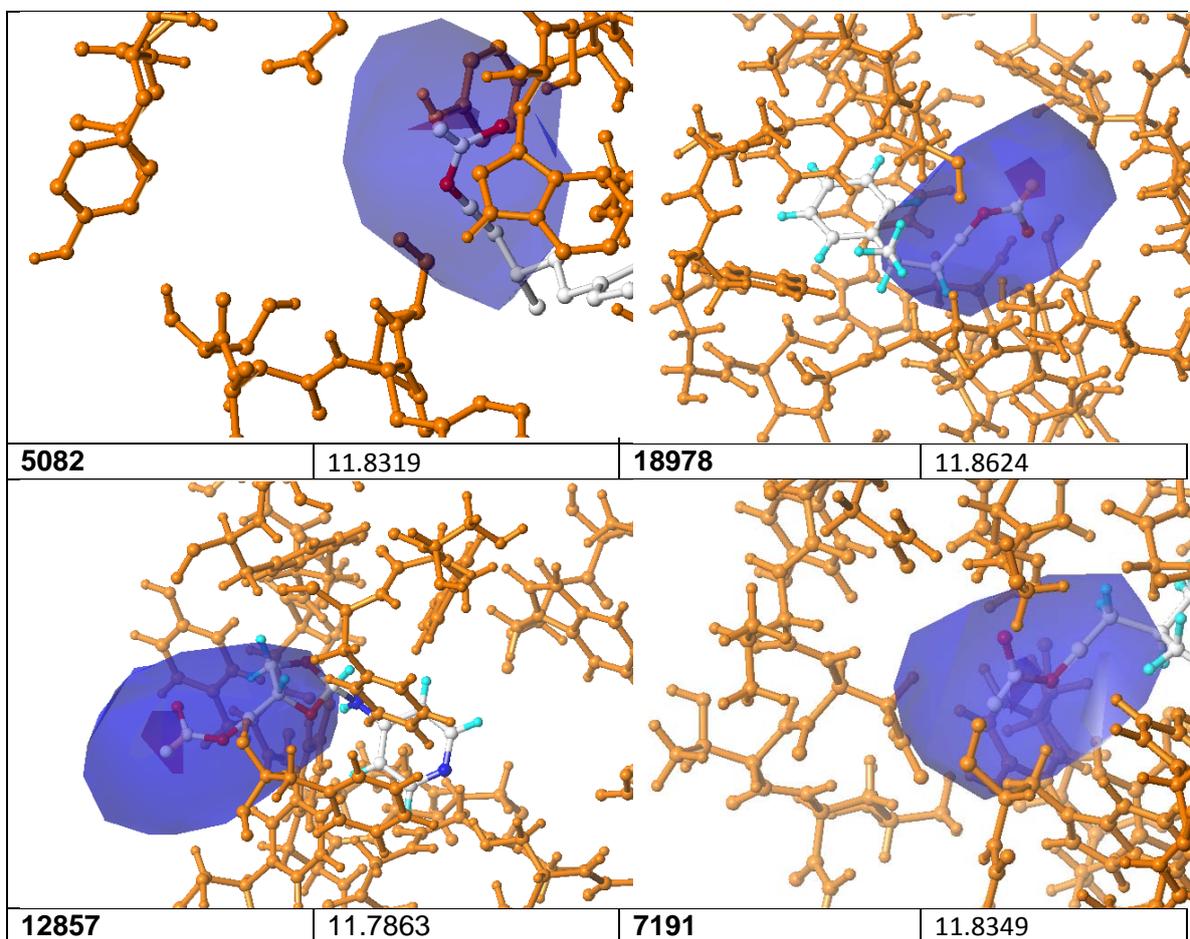


TABLA 27 *Potencial Hidrofóbico*

En esta gráfica se observa el mapa topológico de interacciones farmacofóricas positivas y negativas para el potencial hidrofóbico de los cuatro mejores diseños encontrados en base a las Calyxaminas. En esquema de bolas y barras color naranja se observan los aminoácidos hidrófobos en el sitio activo de la Acetilcolinesterasa; En esquema de bolas y barras de color azul se observan los aminoácidos hidrófilos en el sitio activo de la Acetilcolinesterasa; En esquema de bolas y barras coloreadas según el tipo de átomo se encuentra la molécula diseñada (Candidato). Los mapas farmacofóricos de interacciones electrostáticas positivas se observan de color azul, las interacciones electrostáticas no favorables se observan de color rojo. Debajo de cada gráfica al lado izquierdo y resaltado en negrilla se encuentra el código numérico asignado al compuesto; al lado derecho y sin resaltar se encuentra el puntaje asignado al campo farmacofórico para ese compuesto

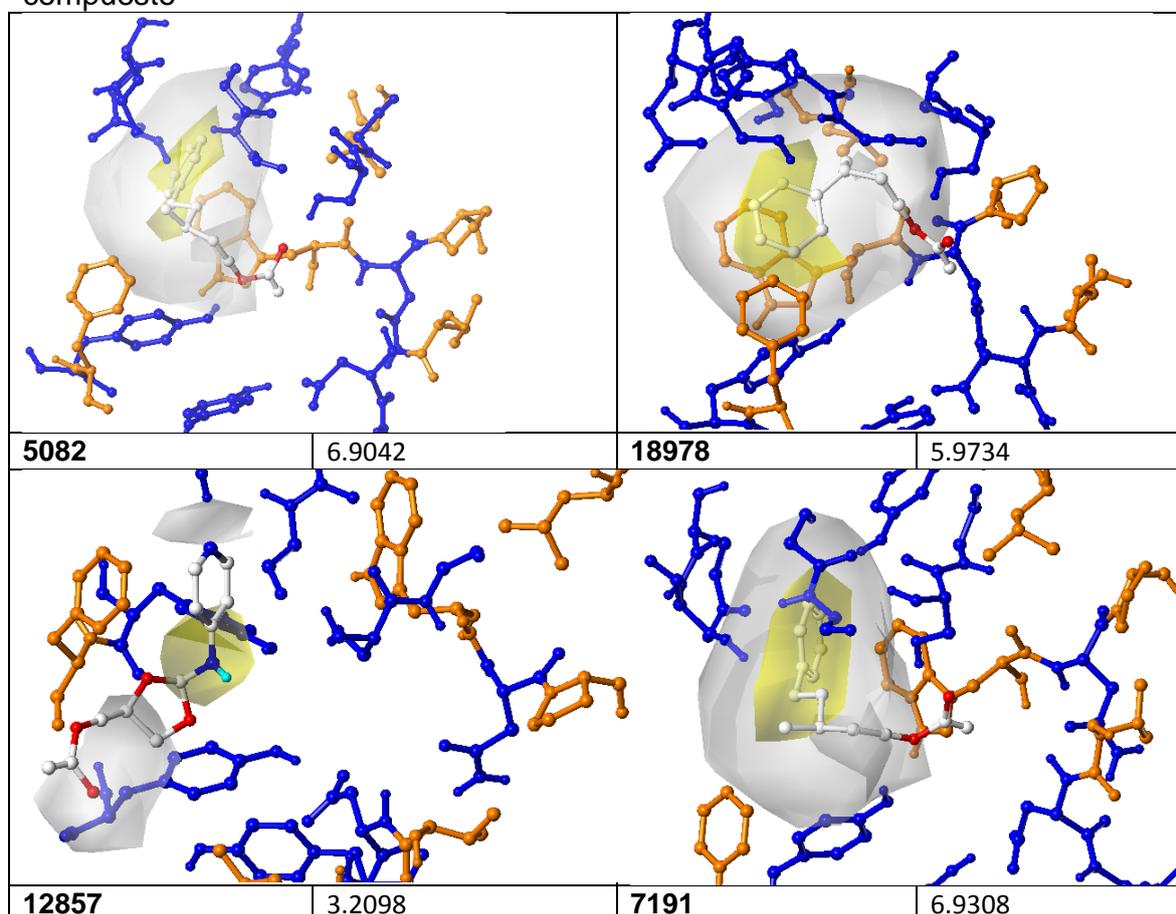


TABLA 28 Donador

En esta gráfica se observa el mapa topológico de interacciones farmacofóricas positivas y negativas para el potencial donador de los cuatro mejores diseños encontrados en base a las Calyxaminas. En esquema de bolas y barras color naranja se observan los aminoácidos hidrófobos en el sitio activo de la Acetilcolinesterasa; En esquema de bolas y barras de color azul se observan los aminoácidos hidrófilos en el sitio activo de la Acetilcolinesterasa; En esquema de bolas y barras coloreadas según el tipo de átomo se encuentra la molécula diseñada (Candidato). Los mapas farmacofóricos de interacciones donadoras de protones positivas se observan de color azul, las interacciones donadoras de protones no favorables se observan de color rojo. Debajo de cada gráfica al lado izquierdo y resaltado en negrilla se encuentra el código numérico asignado al compuesto; al lado derecho y sin resaltar se encuentra el punteo asignado al campo farmacofórico para ese compuesto. (Obsérvese que 3 de 4 compuestos no poseen átomos donadores de protones)

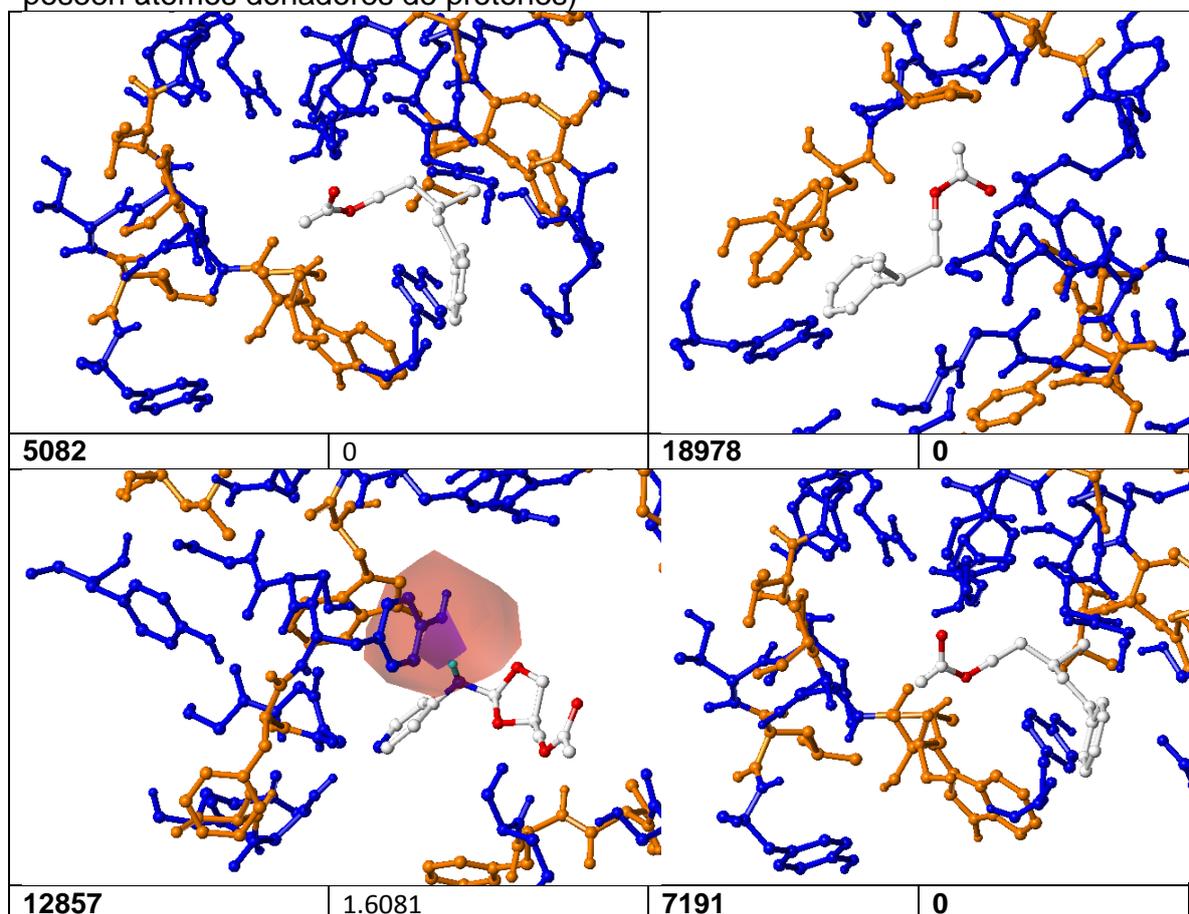


TABLA 29 Aceptor

En esta gráfica se observa el mapa topológico de interacciones farmacofóricas positivas y negativas para el potencial Aceptor de protones de los cuatro mejores diseños encontrados en base a las Calyxaminas. En esquema de bolas y barras color naranja se observan los aminoácidos hidrófobos en el sitio activo de la Acetilcolinesterasa; En esquema de bolas y barras de color azul se observan los aminoácidos hidrófilos en el sitio activo de la Acetilcolinesterasa; En esquema de bolas y barras coloreadas según el tipo de átomo se encuentra la molécula diseñada (Candidato). Los mapas farmacofóricos de interacciones aceptoras de protones positivas se observan de color verde, las interacciones aceptoras de protones no favorables se observan de color naranja. Debajo de cada gráfica al lado izquierdo y resaltado en negrilla se encuentra el código numérico asignado al compuesto; al lado izquierdo y sin resaltar se encuentra el punteo asignado al campo farmacofórico para ese compuesto. (Obsérvese que 3 de 4 compuestos no poseen átomos donadores de protones)

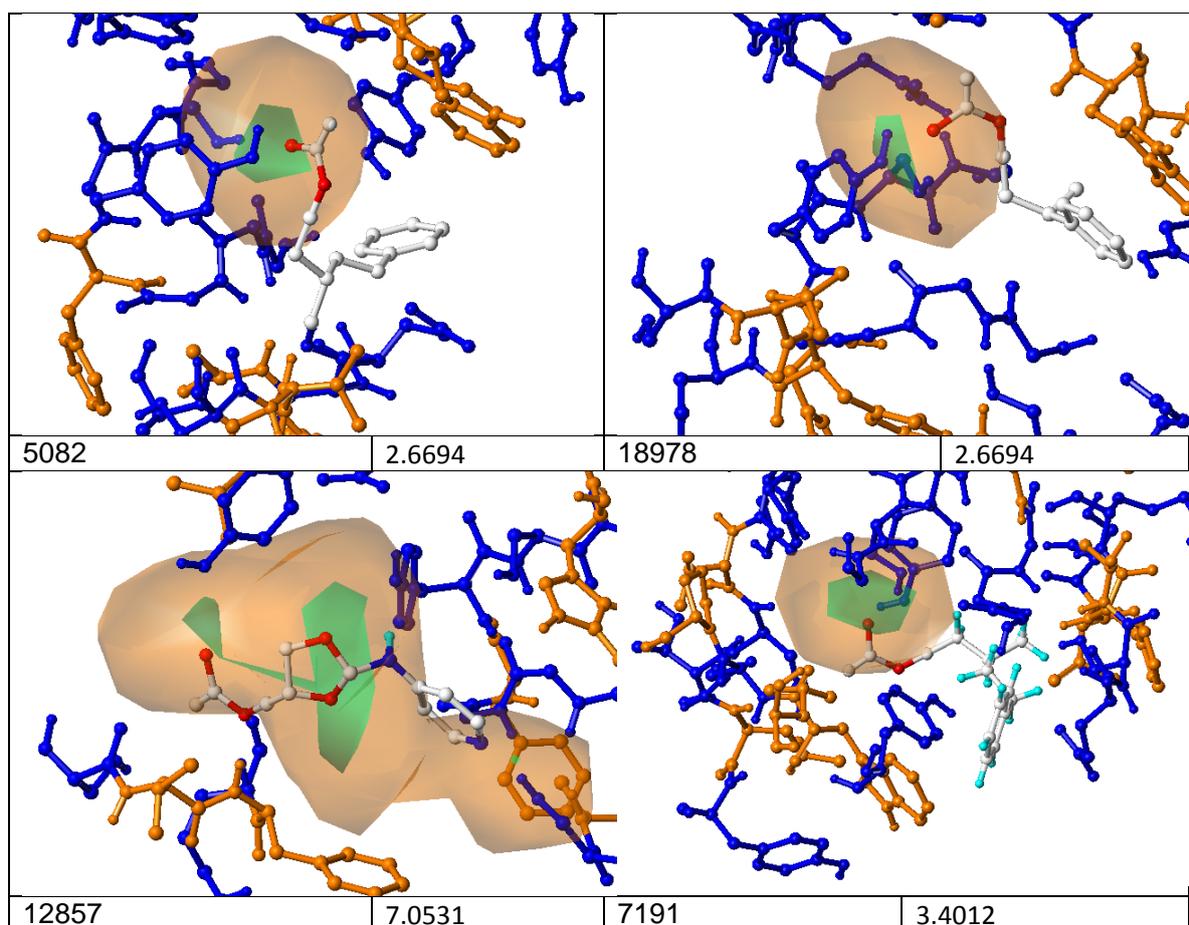


TABLA 30 Evaluación del Candidato Final Seleccionado

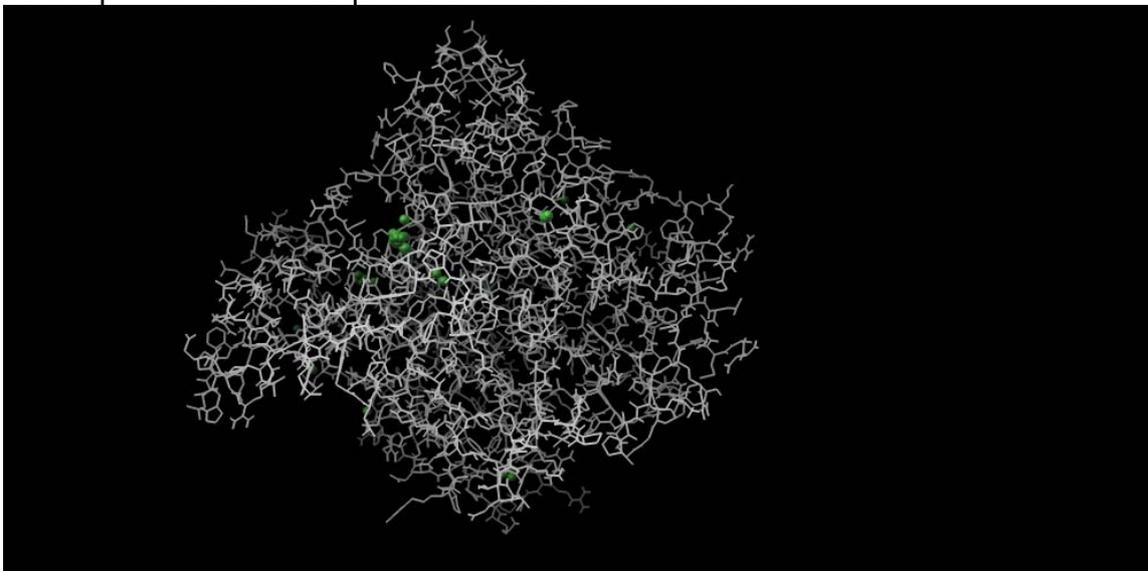
Molécula No.	5082
Rango	1_1
Energía de Enlace	-4.62
Constante de Inhibición KI	407.97uM
Energía Intermolecular	-6.71
Energía Interna	-0.07
Energía Torcional	2.09
Energía Extendida e No enlace	-0.07
Media de la Raíz Cuadrada (RMS)	0.0
RMS de Referencia	17.95
Eficiencia de Ligando	-0.29

TABLA 31 Tabla de Comparaciones entre 5082 y las moléculas de referencia

Corrida No.	A única	B única	Acetilcolina	5082
Rango	1_1	2_1	1_1	1_1
Energía de Enlace	-7.59	-6.41	-3.47	-4.62
Constante de Inhibición KI	2.74uM	20.14uM	2.84mM	407.97uM
Energía Intermolecular	-7.89	-7.3	-4.67	-6.71
Energía Interna	-0.12	-0.15	0.32	-0.07
Energía Torcional	0.3	0.89	1.19	2.09
Energía Extendida e No enlace	: -0.12	-0.15	-0.32	-0.07
Media de la Raíz Cuadrada (RMS)	0	0	0	0.0
RMS de Referencia	206.6	123.51	123.22	17.95
Eficiencia de Ligando	-0.54	-0.46	-0.35	-0.29

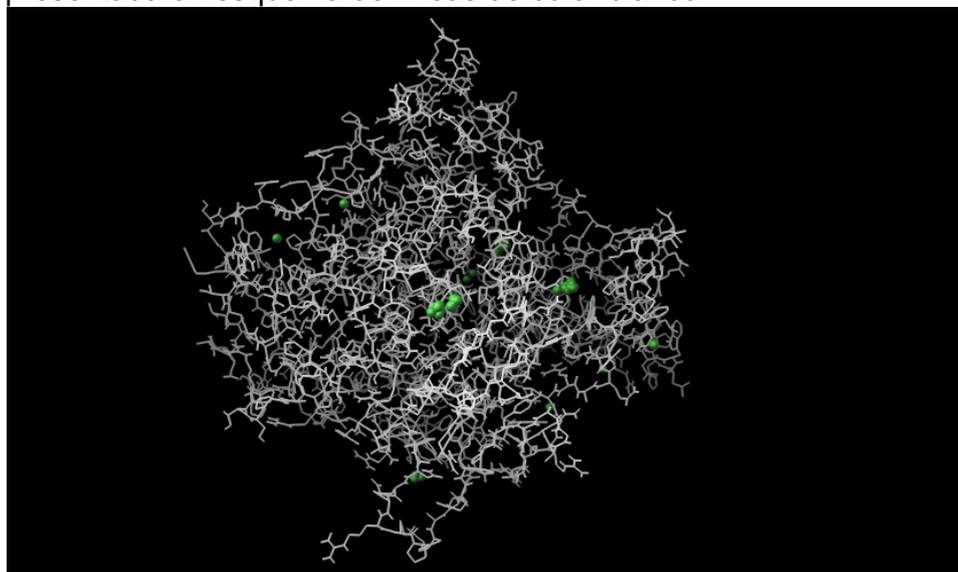
GRAFICA No.23 *Sitios activos para 5082 en Acetilcolinesterasa,*

Todas las interacciones, frontal. Se pueden observar todas las interacciones representadas cada una como una esfera de color verde, la acetilcolinesterasa esta representada en esquema de líneas de color blanco.



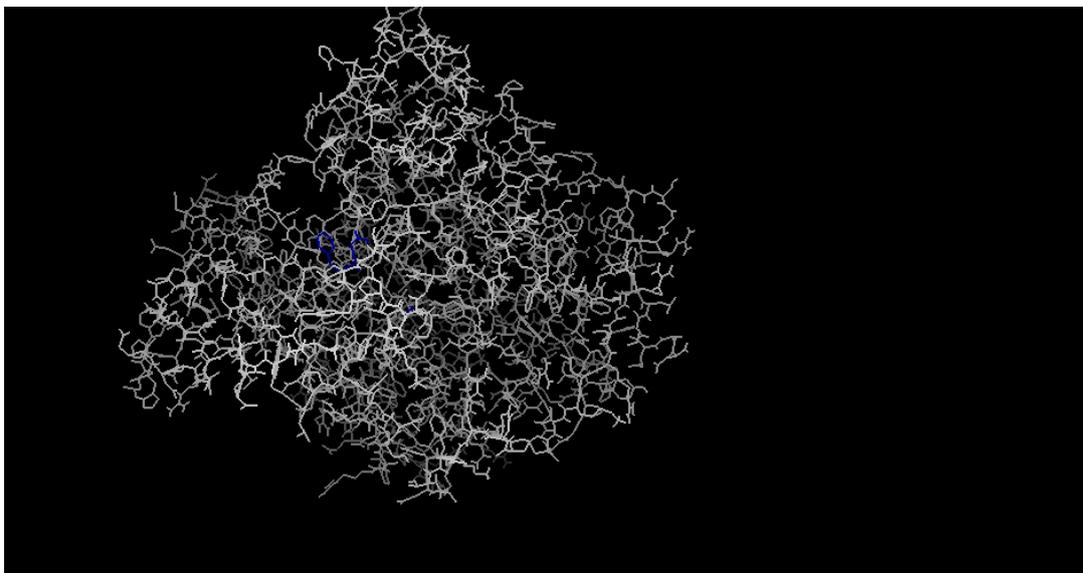
GRAFICA No.24 *Sitios activos para 5082 en Acetilcolinesterasa*

Todas las interacciones, parte trasera. Se pueden observar todas las interacciones representadas cada una como una esfera de color verde, la acetilcolinesterasa está representada en esquema de líneas de color blanco.



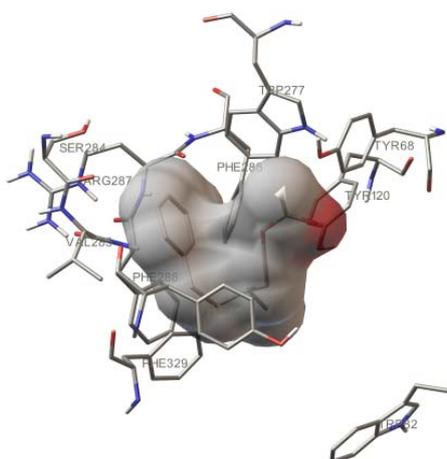
GRAFICA No.25 Sitio Activo principal 5082 en Acetilcolinesterasa

Todas las interacciones. 5082 se encuentra representada como una molécula en esquema de líneas de color azul, la acetilcolinesterasa está representada en esquema de líneas de color blanco. Este docking ha sido realizado con Autodock 4.01.



GRAFICA No.26 Sitio Activo principal 5082 en Acetilcolinesterasa

Interacciones cercanas. Se pueden observar todas las interacciones de aminoácidos cercanos enzima-5082, la acetilcolinesterasa está representada en esquema de líneas de color blanco. Este docking ha sido realizado con Autodock 4.01.



8. DISCUSION DE RESULTADOS

La enzima acetilcolinesterasa electa después de realizar el análisis comparativo secuencial y tridimensional entre especies, fue la enzima 3LII.pdb desarrollada por el grupo de investigación H. Dvir, T. Rosenberry, M. Harel, I. Silman, J. Sussman la cual ha sido publicada en 2010 por la revista *Chemico-Biological Interactions* (187: 10-22). Dicha enzima es una acetilcolinesterasa humana recombinante que obtuvo un 86.4 % de identidad en comparación global total respecto a la enzima canónica, el porcentaje más alto encontrado entre todas las enzimas comparadas entre todas las especies.

Otras especies fueron evaluadas, entre ellas: Torpedo californica, Muss musculus, Drosophila melanogaster. Siendo de alta importancia hacer notar que la segunda especie encontrada con mayor semejanza en su acetilcolinesterasa a la acetilcolinesterasa humana fue Muss musculus con un 77.52 % de igualdad según la enzima 2WU3 publicada por Hornberg, A., Artursson, E., et. Al. En 2009 por la revista *Chemico-Biological Interactions* de la editorial Elsevier.

La secuenciación canónica final fue obtenida de Uniprot, base de datos internacional que está asociada al proyecto de genoma humano y cuyas secuencias han sido obtenidas por análisis proteico.

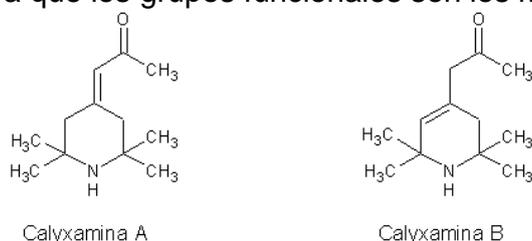
Estos hallazgos muestran la posibilidad de poder realizar estudios toxicológicos en ratón, dada su alta identidad en la enzima Acetilcolinesterasa y dada la facilidades que presenta relativamente trabajar con esta especie.

Modelado Molecular de Calyxaminas A y B

Para poder realizar el *docking* en busca del sitio activo de Calyxaminas en la acetilcolinesterasa fue necesario crear un archivo virtual de las Calyxaminas A y B y hacer un modelado molecular de estas en orden de obtener un modelo virtual exacto con que trabajar para poder reducir el % de error teórico, con este objetivo, se utilizó el programa Gamess de Firefly, en su versión Linux, el cual rindió coordenadas cartesianas para los átomos de Calyxaminas A y B con 10 decimales de exactitud utilizando el método STO-G3

Diferencias Farmacofóricas entre Calyxaminas A y B

En un contexto farmacofórico, las Calyxaminas son Moléculas pequeñas (<50 átomos), las propiedades farmacofóricas principales de ambas Calyxaminas son casi idénticas, debido a que los grupos funcionales son los mismos.



La diferencia entre estos isómeros es la posición de su doble enlace. Debido a que este doble enlace se encuentra en posición conjugada para la Calyxamina A, esto hace una diferencia de acidez para los hidrógenos alfa del grupo carbonilo, mientras que en la Calyxamina B, su importancia únicamente estriba en la modificación de la acidez de uno de los hidrógenos alfa presentes en el anillo piperidínico. Estos hidrógenos no han sido relevantes durante la toma de decisiones al diseñar nuevos fármacos a partir de ambas Calyxaminas, debido a que se ha encontrado que el grupo farmacofórico de mayor interés es el ácido carboxílico de Calyxaminas, el cual guarda una amplia similitud al grupo éster presente en la acetilcolina. Pero en lo que respecta al uso de Calyxaminas como plantilla de diseño, se ha encontrado que Calyxaminas crean poderosos puentes de hidrógeno a través del grupo amino del anillo piperidínico y del grupo ácido carboxílico que estas poseen, sin hacer mayor observación en los hidrógenos alfa antes mencionados.

Por estos motivos se ha tomado como una igualdad la Calyxamina A respecto a la B, puesto que se considera que no importa a partir de cual isómero se parta para el diseño de sus derivados, los resultados serán para ambos casos el mismo.

TABLA 32: *Análisis de Propiedades Farmacofóricas de Calyxaminas:* Relaciones de Hidrógenos Dadores y Aceptores.

Sustancia	Donador	Aceptor	Relación Donador/Aceptor
Acetilcolina	0	0.1629	0.1152
Calyxamina A	0.0931	0.167	0.1504
Calyxamina B	0.0842	0.1918	0.1597

En la Calyxamina B se puede observar una pequeña variación en la potencialidad del Hidrógenos Donadores, debido a que la posición del doble enlace hace menos ácido el hidrógeno alfa de esta Calyxamina, a su vez esto provoca un leve incremento en la capacidad aceptora de protones, sin embargo es necesario tomar en cuenta que estas constantes son calculadas en base a la densidad electrónica presente en la molécula, por ello el campo electrónico en relación al potencial total puede medirse como una constante.

TABLA 33: Análisis de Propiedades Farmacofóricas de Calyxaminas:
Otras constantes Farmacofóricas

Sustancia	Clogp	Estérico	Potencial Electrostático
Acetilcolina	-7.099	0.2009	1.8971
Calyxamina A	-0.141	0.4481	0.0475
Calyxamina B	-0.441	0.4405	0.085

En esta tabla puede compararse más fácilmente la potencialidad de partición en octanol/agua medida como ClogP teórico para las tres moléculas básicas, según este programa, La Calyxamina B será más hidrófoba que la Calyxamina A pero no por mucho, estos puntos decimales de diferencia (0.3 aproximadamente), no son significativos.

Tomando las otras constantes, en el potencial, estérico se puede observar fácilmente que ambas moléculas poseen una volumetría muy semejante, el potencial electrostático parece ser la mayor relevancia encontrada, esto se debe a la capacidad de conjugación que existe en los dobles enlaces presentes en la Calyxamina A mientras que en la Calyxamina B no se encuentra tal posibilidad. Esta potencialidad en la distribución de cargas explica tal diferencia.

Constantes Fisicoquímicas Obtenidas para Calyxamina A (Gamess/Windows)

	E	H	G	CV	CP	S
	KCAL/MOL	KCAL/MOL	KCAL/MOL	CAL/MOL-K	CAL/MOL-K	CAL/MOL-K
ELEC.	0	0	0	0	0	0
TRANS.	0.889	1.481	-10.964	2.981	4.968	41.741
ROT.	0.889	0.889	-8.609	2.981	2.981	31.855
VIB.	222.611	222.611	210.189	46.298	46.298	41.665
TOTAL	224.389	224.981	190.616	52.26	54.247	115.26

Constantes Fisicoquímicas Obtenidas para Calyxamina B (Gauss/Windows)

	E	H	G	CV	CP	S
	KCAL/MOL	KCAL/MOL	KCAL/MOL	CAL/MOL-K	CAL/MOL-K	CAL/MOL-K
ELEC.	0	0	0	0	0	0
TRANS.	0.889	1.481	-10.964	2.981	4.968	41.741
ROT.	0.889	0.889	-8.66	2.981	2.981	32.027
VIB.	221.625	221.625	209.354	44.963	44.963	41.156
TOTAL	223.402	223.995	189.73	50.925	52.912	114.924

La entalpia normal de formación de enlace para ambas Calyxaminas debe ser virtualmente la misma desde que la única diferencia se encuentra en un enlace carbono - carbono en posición alfa para la Calyxamina A.

La energía libre de Gibbs para ambos cálculos también se puede considerar idéntica (189.73 vs. 190.16) al igual que los valores de capacidades caloríficas y de entropía, por lo que se puede sugerir que termodinámicamente ambas moléculas son equivalentes, y que la conjugación del doble enlace con el enlace carboxílico en Calyxamina A, no ha afectado estos parámetros, de lo cual se puede deducir que el potencial químico de ambas especies es virtualmente el mismo, y la energía interna de ambas especies será equivalente.

De cualquier manera se ha obtenido el modelado molecular de ambas Calyxaminas esperando encontrar diferencias en las energías internas pequeñas, así como en las propiedades farmacofóricas y fisicoquímicas de ambas.

Análisis de Propiedades Bioquímicas de Acetilcolinesterasa

Se han analizado las propiedades bioquímicas esenciales de la Acetilcolinesterasa utilizando mapas gráficos virtuales computacionales para describir topológicamente dichas propiedades. Las Propiedades analizadas fueron:

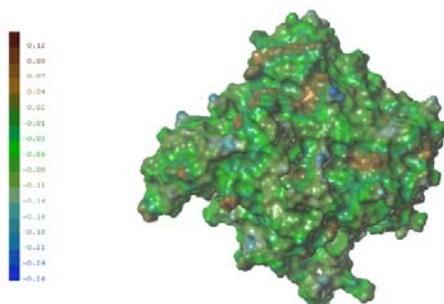
- Potencial Lipofílico
- Potencial Electrofílico
- Cargas de Poisson-Boltzman
- Densidad de Protones Aceptores
- Densidad de Protones Dadores
- Densidad Total de Protones Dadores y Aceptores
- Curvatura Local
- Profundidad de Cavidades
- Puentes de Hidrogeno.

El análisis de estas propiedades reveló que el sitio activo para la Acetilcolina en la Acetilcolinesterasa está bien definido mediante una cavidad que está orientada electrofílicamente. Y dicho sitio activo posee características bioquímicas únicas que catalizan la hidrólisis de la acetilcolina.

Las gráficas, como se demostrará a continuación, muestran que el sitio activo de la Acetilcolina es reconocido por un potencial electrofílico bien definido, no existe un solo sitio activo, pero sí existe un sitio activo que parece ser principal, puesto que se puede observar que los potenciales bioquímicos se concentran en esta región, sin embargo, en la periferia de la Acetilcolina existen otras regiones que también tienen un alto potencial catalítico, pero no poseen un gradiente de atracción bioquímica tan fuerte como el sitio activo principal.

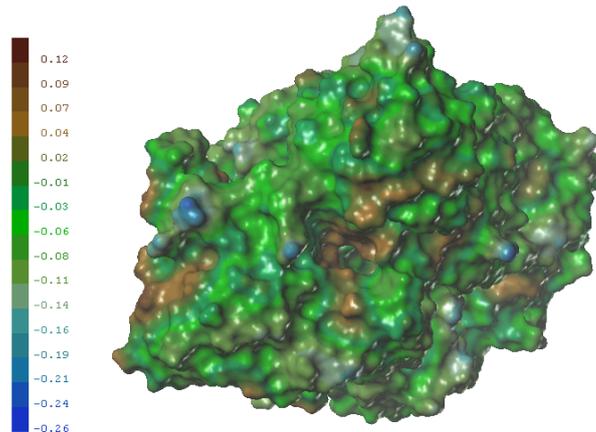
Para soportar esta conclusión, la primera gráfica en analizar fue la gráfica de potencial Lipofílico:

Potencial Lipofílico



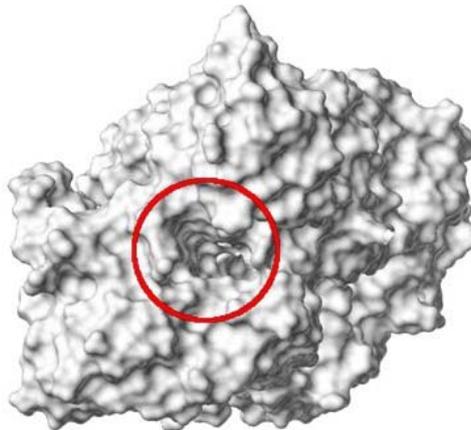
Esta muestra una dispersión de los sitios más lipófilos (café) y los más hidrófobos (azules), este es uno de los factores más atractivos para el ligando, en este caso, la acetilcolina, que se verá atraída por su capacidad de hidrolizarse hacia los sitios más hidrófilos.

Al explorar la superficie de la Acetilcolinesterasa se encontró que a pesar de que existen varios puntos dispersos tanto hidrófilos como hidrófobos, existe una región que está un poco más marcada, coincidentemente esta región posee una topografía más accidentada con forma de garganta



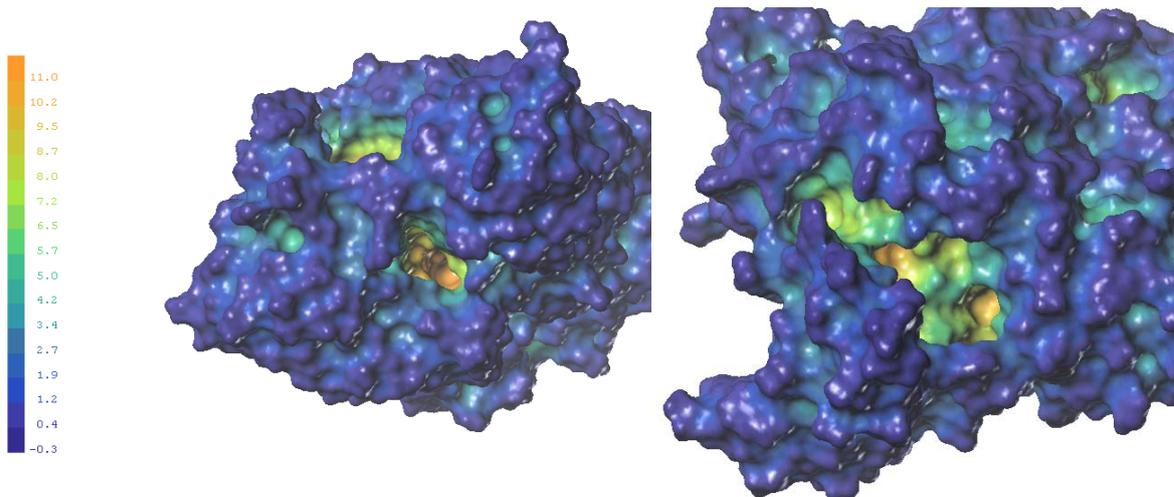
Dicha forma se puede observar mejor en el siguiente esquema en blanco y negro de las superficies de la Acetilcolinesterasa:

GRAFICA No.27 Esquema de la Acetilcolinesterasa.



Puede observarse dentro del círculo rojo el área del sitio activo principal.

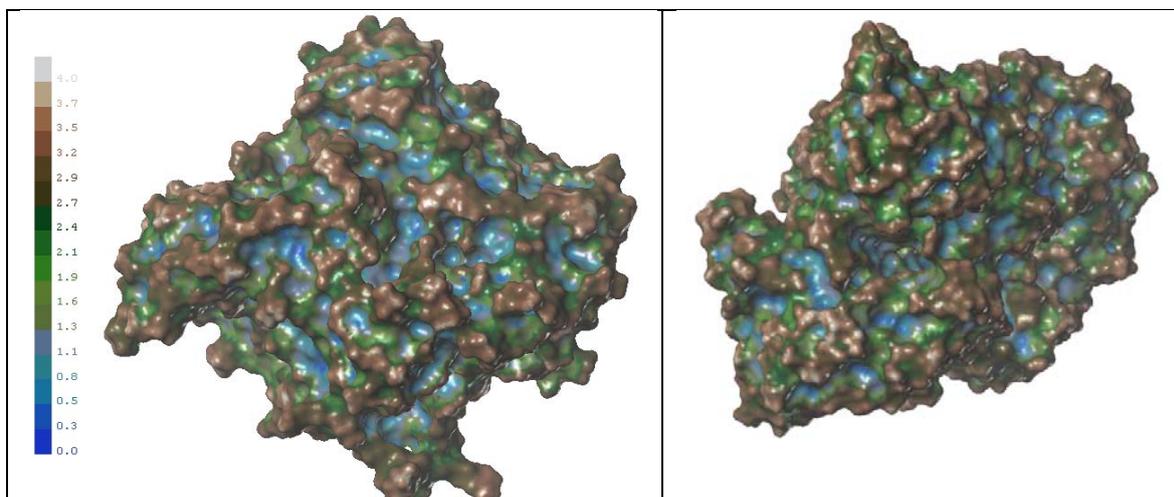
Estas entradas a potenciales sitios activos también son visibles a través de un análisis de cavidades, en donde los colores azules representan las regiones más externas y los colores amarillos y rojos las regiones más profundas en la enzima.



En estas gráficas se pueden ver ambas cavidades principales, la primera (lado izquierdo) refleja el mismo esquema estudiado en la figura en blanco y negro. En la segunda imagen (lado derecho) se observa la segunda cavidad más importante, esta segunda cavidad es la misma que se ve en la figura del lado izquierdo pero en el área superior de la enzima, apuntando ortogonalmente sobre el eje Y, mientras que el sitio activo principal está apuntando hacia el eje Z en dirección del espectador.

El mapa topológico de la Acetilcolinesterasa también ha sido descrito mediante el cálculo de su **Curvatura Local**. La curvatura Local de una superficie es descrita mediante la matriz Hessiana tomando en cuenta la curvatura canónica que es dada por dos eigen valores de la matriz, esto resulta en dos tipos de curvas, cóncavas y convexas, al graficar esta superficie, se ha coloreado de color azul las regiones convexas para semejarlas a lagos, de color café las regiones cóncavas para semejarlas a colinas y de esta forma hacer fácil la interpretación de la superficie.

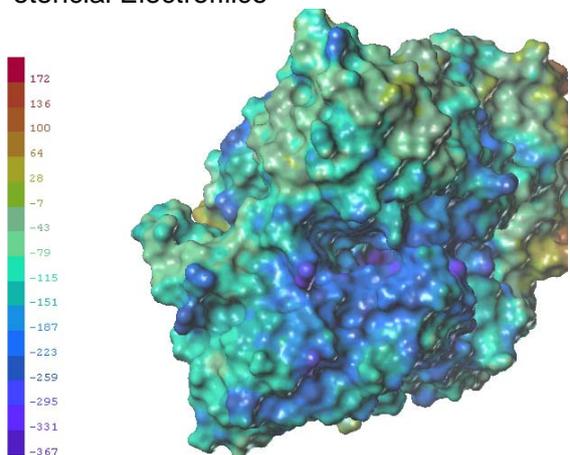
Análisis de la curvatura local de la Acetilcolinesterasa.



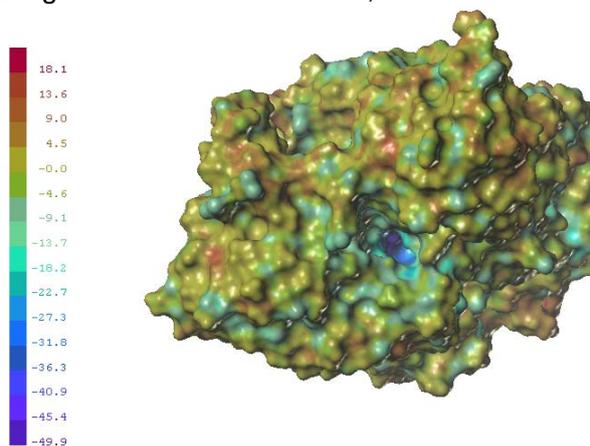
De tal manera puede observarse que la superficie de la Acetilcolinesterasa es sumamente accidentada. En este caso en particular el análisis de la curvatura local no aporta mayores beneficios debido a que el sitio activo principal de la acetilcolina se encuentra dentro de la misma.

Las imágenes de la topología del potencial eléctrico y cargas de Poisson-Boltzman fundamentan mejor esta idea.

Potencial Electrofílico



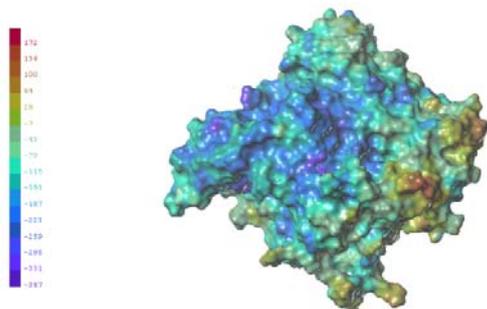
Cargas de Poisson-Boltzman,



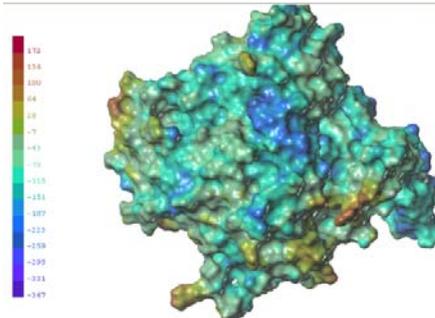
Como puede observarse, las áreas más electronegativas según el potencial electrofílico, se encuentra formando una abertura, la cual puede facilitar la orientación del grupo éster presente en la acetilcolina para ser absorbido por la

acetilcolinesterasa. En el mapa topológico de las cargas de Poisson Boltzman se puede observar que la acetilcolina encontrará una región puntual al final de esta garganta que es el sitio activo donde ocurre la hidrólisis. El resto de la acetilcolinesterasa está cubierto por una dispersión de cargas muy diferente poco ordenada.

Acetilcolinesterasa vista desde el frente.



Acetilcolinesterasa vista desde atrás



La región que se ha denominado el frente incluye un área electro negativa que realmente orienta hacia el sitio activo principal. Mientras que la región posterior posee también una nueva área que orienta hacia otro potencial sitio activo.

Estas gráficas se complementan con los hallazgos encontrados durante el docking realizado con Calyxaminas y con Acetilcolina en la Acetilcolinesterasa, ambos docking dieron como resultado, el mismo sitio activo principal tanto para la Calyxamina, como para la Acetilcolina.

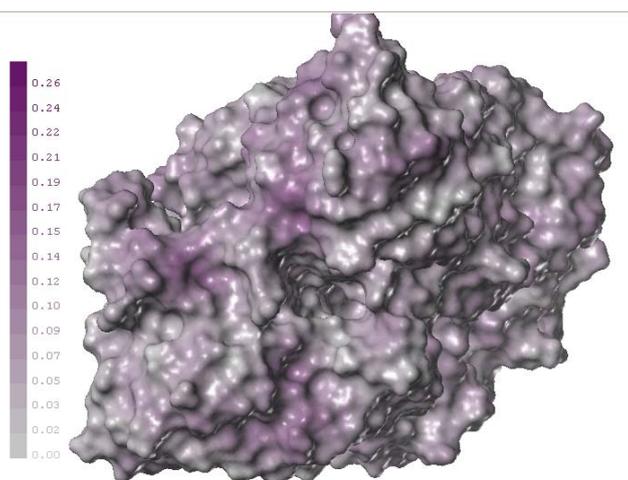
Sitios de Reacción encontrados por Docking entre Calyxaminas y Acetilcolinesterasa	Sitios de Reacción encontrados por Docking entre Acetilcolina y Acetilcolinesterasa

Como puede observarse en las gráficas, en el caso de los sitios de reacción encontrados por docking en el caso de Calyxaminas, no se encuentran en la periferia sino en el centro de la enzima, los sitios encontrados, son coincidentes

con los mapas topológicos de cargas potenciales de Poisson y Boltzman y con las de potencial electrofílico y lipofílico.

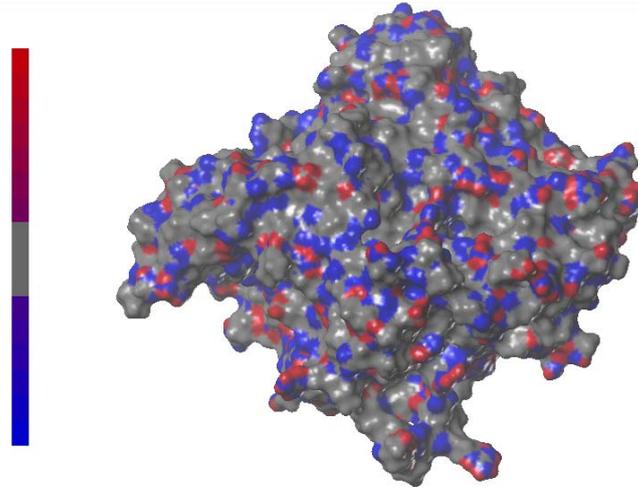
Para el caso de los sitios de reacción encontrados para la acetilcolina en la acetilcolinesterasa, pueden observarse varios sitios distribuidos alrededor de toda la enzima, sin embargo, los sitios principales que son aquellos con la mayor liberación de energía de enlace, son exactamente los mismos sitios que en el caso de Calyxamina, y obviamente estos a su vez, son los mismos que los encontrados en el análisis bioquímico previamente descrito.

Las densidades de hidrógeno dador y aceptor para la Acetilcolinesterasa han resultado dispersas a través de toda la proteína con un rango de acción muy pequeño en toda su periferia, teniendo un promedio de 0.03 en la constante de densidad de hidrógenos dadores/aceptores, lo cual es un potencial muy bajo, por lo cual se puede concluir que estos dos factores, dadores de hidrógeno, aceptores de hidrógeno y su relación, no es un índice determinante en este caso, no parece evidente en el sitio activo



Densidad total de aceptores y dadores de hidrógeno.

El análisis topológico de puentes de hidrógeno no ha revelado áreas de potencial interés puesto que los potenciales aceptores y donadores de puentes de hidrógeno están dispersos tal y como se puede observar en la respectiva gráfica.



Sin embargo es posible observar una mayor cantidad de donadores de protones (color azul) que de aceptores, por lo cual se puede inferir que esta enzima tendrá preferencia por sustanciasceptoras de protones o atractoras de estos, como en el caso de la acetilcolina y la Calyxamina.

Determinación del Sitio Activo a través de Docking

Para el análisis enzima ligando, se necesitó desarrollar una serie de *grids* para analizar por completo la enzima acetilcolinesterasa.

En la primera serie de docking se estudió el sitio de reacción teórico para la Calyxamina en la Acetilcolinesterasa. El resultado fueron al menos tres sitios activos importantes pero de estos solamente uno es el principal, esto se determinó en base al número de docking exitosos sobre una base de 100 docking resultantes de cada corrida, realizando 10 corridas exhaustivas, cada una con una tasa de más de 2.7 millones de evaluaciones. De tal manera se llegó a la conclusión que de los 100 mejores docking enzima ligando para cada corrida, en 10 corridas, habían 3 lugares puntuales en la enzima acetilcolinesterasa, que eran predilectos no solo por el número de veces que la en ligando se enlazaba a esta posición, sino también por la gran estabilidad que representaba esta unión en términos de energía libre de enlace y en términos de energía interna del conformero. Otros varios parámetros fueron evaluados conjuntamente, los cuales se pueden apreciar en las tablas de los docking:

Docking Calyxamina A**	Dirigido	Ciego
Energía de enlace	-7.59	-4.71
Constante de inhibición KI	2.74 μ M	350.07 μ M
Energía intermolecular	-7.89	-5.31
Energía Interna	-0.12	-0.39
Energía Torsional	0.3	0.6
Energía Extendida de no enlace	-0.12	-0.39
Grupo de Raíz cuadrada media	0.0	0
Ref. Raíz cuadrada media	206.6	15.85
Eficiencia de ligando	-0.54	-0.34

**Todas las energías están expresadas en esta tabla en unidades de Kcal/mol

En esta tabla se puede apreciar dos evaluaciones de Calyxamina A realizadas sobre la acetilcolinesterasa, un docking Ciego, y un Docking Dirigido. En el docking ciego, se diseñó una malla virtual para cubrir la totalidad de la enzima para evaluar millones de docking contra esta malla, el proceso es muy inexacto, pero da una idea general de donde se encuentran los potenciales sitios activos, de hecho, el sitio activo principal que también fue ubicado en el docking ciego, resultó en este docking en la posición No.13 de 100 con una energía de enlace enzima ligando de -4.71Kcal/mol.

En el docking dirigido se realiza la malla virtual únicamente en el sitio de la enzima que se está interesado en evaluar, con el objeto de obtener mediciones muy exactas, y también de obtener las conformaciones más estables en las que el ligando encaja en la misma enzima. Como puede observarse, los resultados variaron considerablemente en cuanto a la magnitud de los valores de energía.

Los docking dirigidos se realizaron a toda la enzima para el sustrato Calyxamina A, de manera que la Acetilcolinesterasa fue dividida en 10 fragmentos iguales para obtener un análisis ultra fino de cada Armstrong de la superficie de la Acetilcolinesterasa al ser evaluada con todas las conformaciones posibles del ligando. Por lo cual, el estudio teórico se considera concluyente en un contexto lógicamente teórico, en el sentido de que los sitios activos encontrados para la Calyxamina A en la Acetilcolinesterasa, son según este modelo matemático, los más probables.

Posteriormente se siguió un procedimiento similar para evaluar la Calyxamina B, donde es posible observar que los resultados obtenidos para esta Calyxamina son semejantes a su isómero A.

A su vez, el mismo procedimiento fue ejecutado para evaluar la Acetilcolina, el cual es el sustrato natural para la Acetilcolinesterasa.

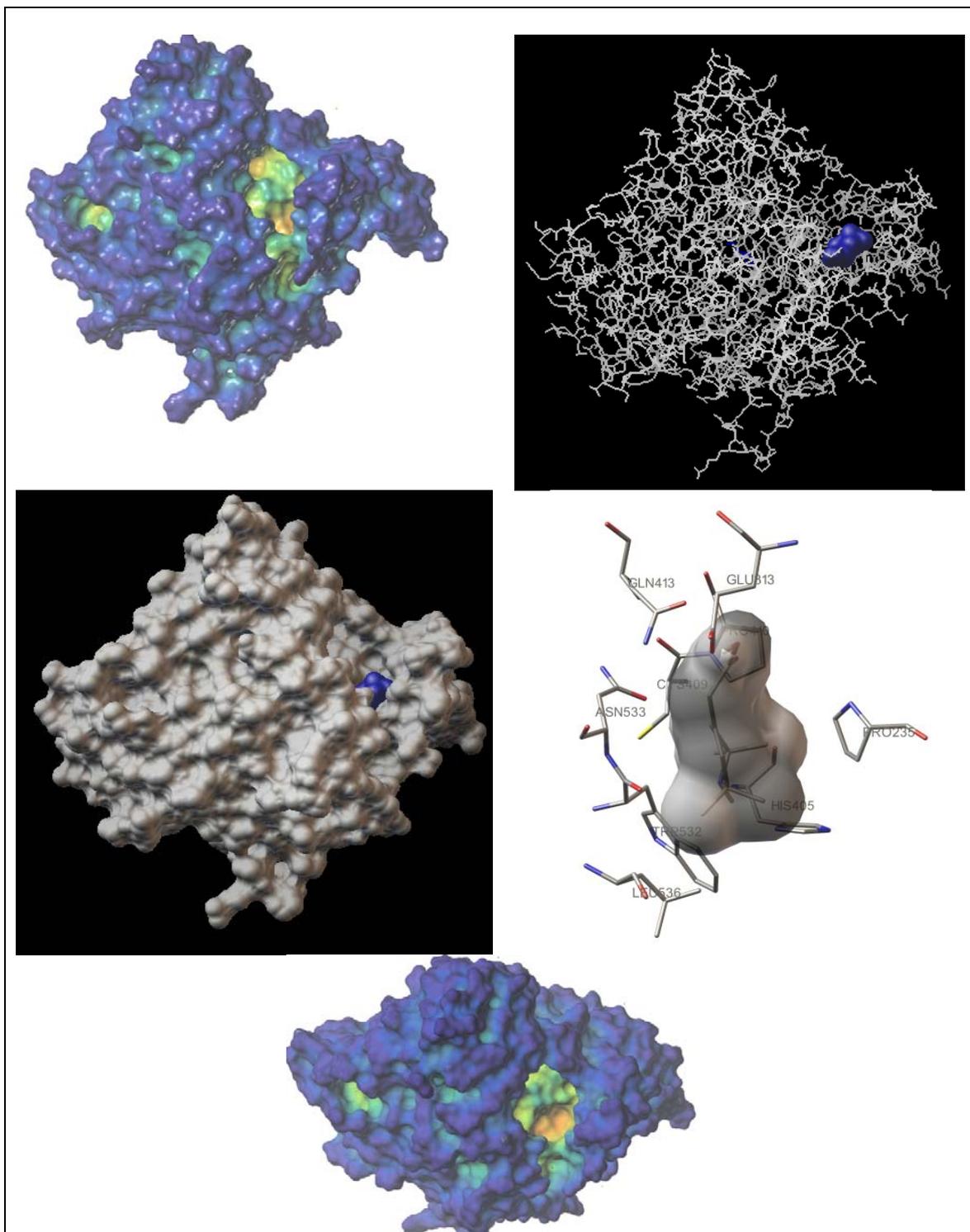
Teniendo los resultados de los docking para Calyxaminas A, B y Acetilcolina, fue posible comparar los sitios de reacción de los tres sustratos y de la misma manera comparar las energías de enlace e internas para determinar las conformaciones más importantes de enlace. Este análisis se detalla a continuación.

TABLA 34: Comparación de los valores obtenidos en el docking para Calyxamina B con otros valores de Calyxamina A y de la Acetilcolina.

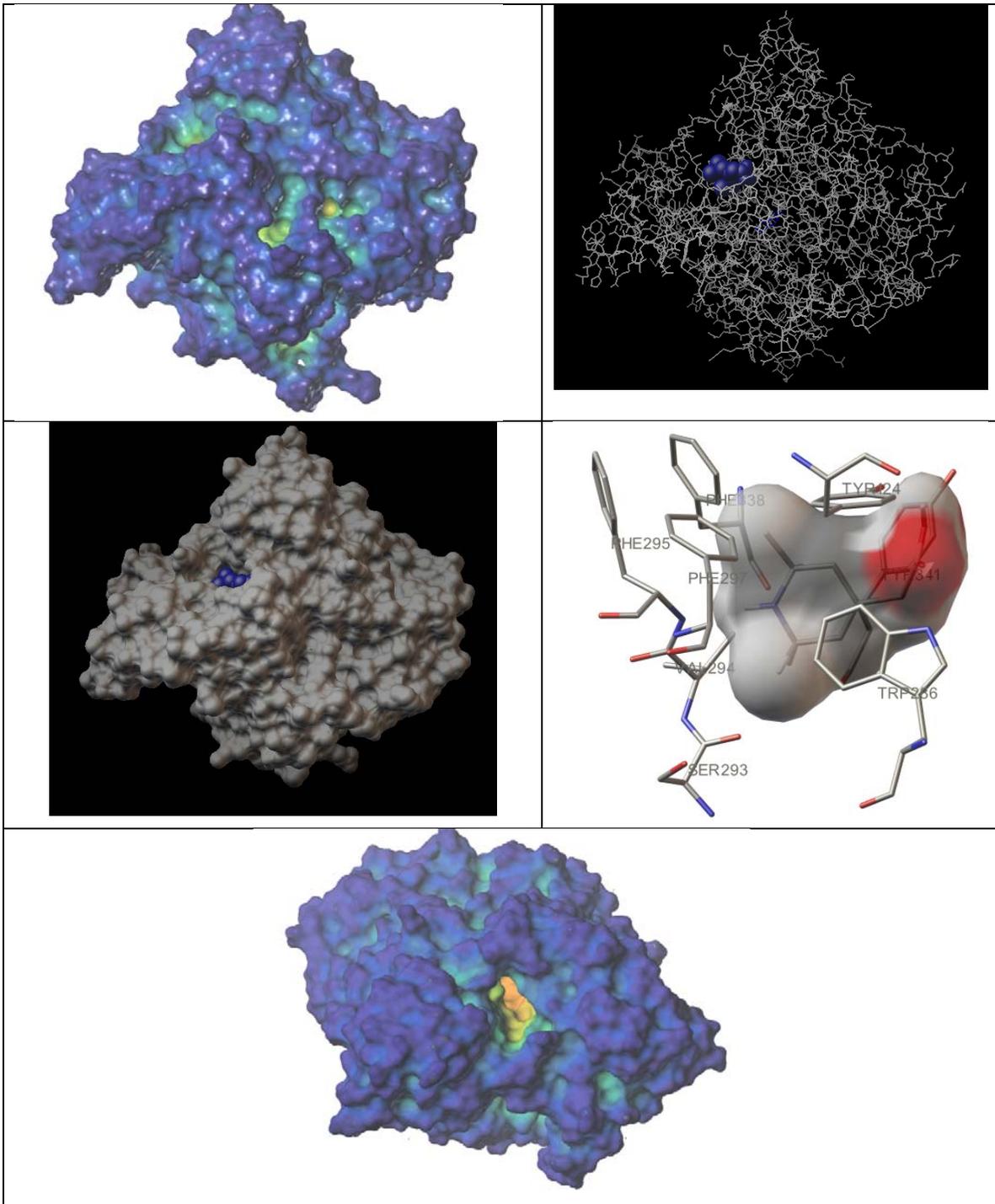
Docking -Tipo (Ciego/Dirigido)	Calyxamina B Dirigido	Calyxamina B Dirigido	Calyxamina A Dirigido	Calyxamina A Ciego	Acetilcolina - Dirigido
Rango	1_1	2_1	1_1	9_1	1_1
Energía de Enlace	-6.43	-6.41	-7.59	-4.71	-3.47
Constante de Inhibición KI	19.4uM	20.14uM	2.74	350.07uM	2.84mM
Energía Intermolecular	-7.32	-7.3	-7.89	-5.31	-4.67
Energía Interna	-0.11	-0.15	-0.12	-0.39	0.32
Energía Torcional	0.89	0.89	0.3	0.6	1.19
Energía Extendida de No enlace	-0.11	-0.15	: -0.12	-0.39	-0.32
Media de la Raíz Cuadrada (RMS)	0	0	0	0	0
RMS de Referencia	117.43	123.51	206.6	15.85	123.22
Eficiencia de Ligando	-0.46	-0.46	-0.54	-0.34	-0.35

En la TABLA anterior pueden observarse los valores comparados de los resultados obtenidos para el docking de Calyxamina B contra la Acetilcolinesterasa, de manera que en la primera columna de datos llamada **Calyxamina B Dirigido** se tienen los valores de primer rango seleccionados por el programa Autodock ver 4.01 como los mejores evaluados por el programa, lo interesante es que en este caso tales valores de rango 1_1 encajan pero no en el sitio activo principal sino en otro de los sitios activos secundarios cuya gráfica se detalla a continuación

GRAFICA No.28 Análisis Docking Calyxamina B:
Segundo sitio de reaccion en la Acetilcolinesterasa



GRAFICA No.29 Análisis Docking Calyxamina B: Primer sitio de reaccion en la Acetilcolinesterasa



En las gráficas de Análisis Docking Calyxamina B, pueden observarse en la esquina superior izquierda el análisis de profundidades en un esquema general, en la esquina superior derecha puede observarse la posición del ligando respecto a la enzima, el ligando se encuentra representado por su volumetría y la enzima por esquemas de líneas. En la gráfica del medio izquierda pueden observarse una aproximación de la enzima neutralizada con Calyxamina B, en el medio e izquierda se puede observar el análisis detallado de las interacciones cercanas enzima – ligando, y en la parte inferior se puede observar en esquema de análisis de cavidades, un acercamiento del sitio activo descrito.

Para la **Gráfica** Análisis Docking Calyxamina B: Segundo sitio de reacción en la Acetilcolinesterasa, ese segundo sitio activo ha resultado ser el más favorable energéticamente, según la energía de enlace enzima ligando calculada por Autodock, sin embargo, al observar estos valores de la tabla, y comparar entre la mejor posición de este docking y la segunda mejor posición evaluada, puede observarse que son prácticamente iguales

Docking -Tipo (Ciego/Dirigido)	Calyxamina B Dirigido	Calyxamina B Dirigido
Rango	1_1	2_1
Energía de Enlace	-6.43	-6.41
Constante de Inhibición KI	19.4uM	20.14uM
Energía Intermolecular	-7.32	-7.3
Energía Interna	-0.11	-0.15
Energía Torcional	0.89	0.89
Energía Extendida de No enlace	-0.11	-0.15
Medía de la Raíz Cuadrada (RMS)	0	0
RMS de Referencia	117.43	123.51
Eficiencia de Ligando	-0.46	-0.46

De hecho, el programa Autodock posee un porcentaje de error de +/- 2.000 Kcal/mol, por lo que, en cuanto a la energía de enlace se puede decir que en ambos casos es la misma, de hecho el resto de valores son prácticamente iguales. Por lo que se puede concluir que ambos sitios activos son equivalentes para la Calyxamina B, lo cual no sucede por la Calyxamina A, para la cual, los mejores valores obtenidos son un poco más favorables.

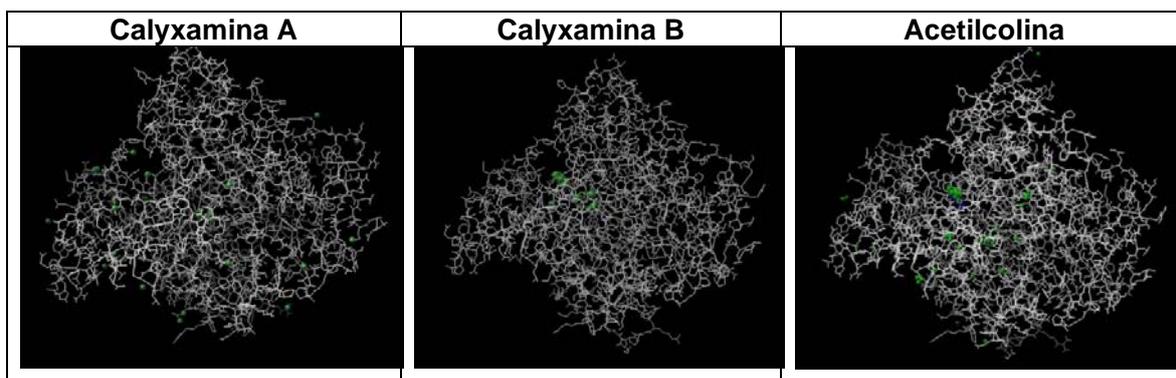
Docking -Tipo (Ciego/Dirigido)	Calyxamina A Dirigido	Calyxamina A Ciego
Rango	1_1	9_1
Energía de Enlace	-7.59	-4.71
Constante de Inhibición KI	2.74	350.07uM
Energía Intermolecular	-7.89	-5.31
Energía Interna	-0.12	-0.39
Energía Torcional	0.3	0.6
Energía Extendida de No enlace	: -0.12	-0.39
Media de la Raíz Cuadrada (RMS)	0	0
RMS de Referencia	206.6	15.85
Eficiencia de Ligando	-0.54	-0.34

De tal forma, al comparar ambas Calyxaminas con el valor de energía de enlace alcanzado por la Acetilcolina se puede observar que tanto Calyxamina A como B poseen mejores valores de energía enzima – ligando que la Acetilcolina, lo cual implica una unión bastante más irreversible que la de la acetilcolina, y por ende una obstrucción permanente de la enzima, lo cual es un efecto indeseable en el fármaco. Ya que otros fármacos, como el Donepezilo, se conocen bien por sus efectos secundarios producto de tales uniones irreversibles, de manera que el valor de energía de enlace buscado para el nuevo fármaco deberá ser uno con valores promedio más cercanos a la Acetilcolina que a las Calyxaminas.

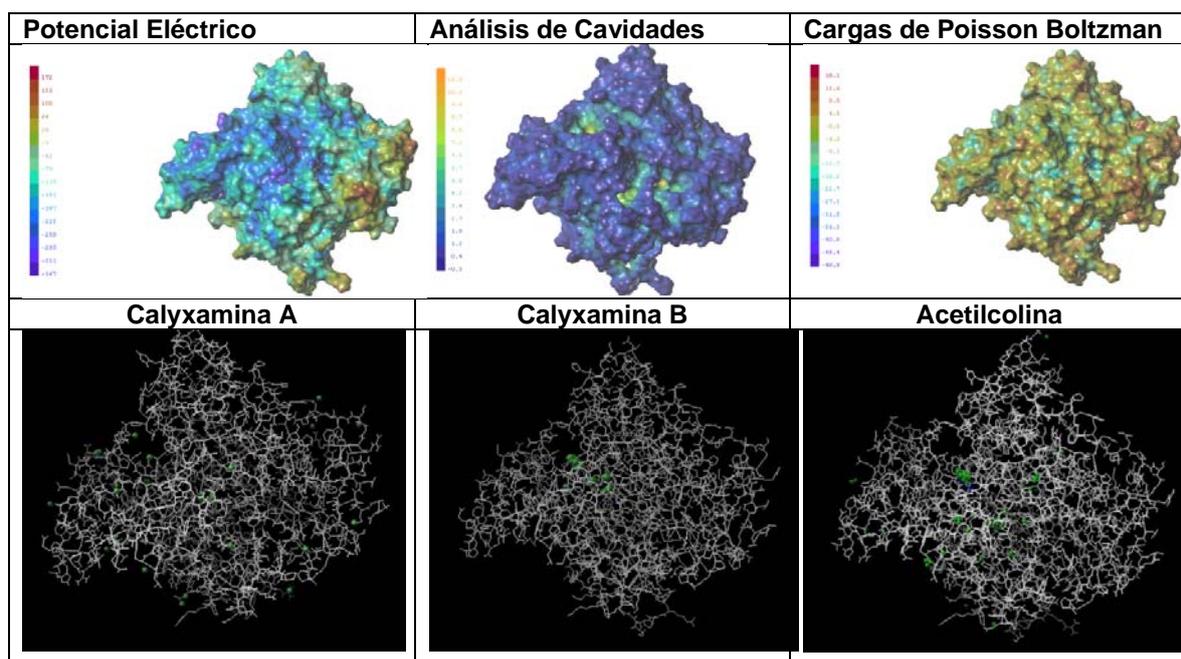
Por otra parte la anterior evaluación realizada sobre la propiedades farmacofóricas de las Calyxaminas dejan en duda que estas tras una administración al paciente lleguen a efectuar realmente su objetivo, debido a la potencial capacidad de hidrolizarse en la sangre que estas poseen, por lo cual, se sabe con estos valores y con estos análisis que los derivados óptimos de Calyxaminas serán aquellos que posean una capacidad de hidrólisis menor, y por tanto más apolares y además que sean de menor afinidad en su unión con la enzima que las Calyxaminas.

Análisis general de las posiciones de enlace encontradas por Autodock para Calyxaminas y para Acetilcolina en la Acetilcolinesterasa:

Existe una relación entre las posiciones evaluadas para las tres enzimas, se muestra a continuación una gráfica que contiene la generalidad de todas las evaluaciones hechas para estas tres moléculas.



A simple vista, existe una mayor similitud entre las posiciones encontradas para la Calyxamina B y para la Acetilcolina, pero en realidad las posiciones encontradas en Calyxamina A también son muy semejantes, la aparente dispersión que se presenta en la gráfica es solamente un recuento de muchas malas evaluaciones que no aparecen en las otras dos gráficas, esto se puede demostrar fácilmente al evaluar las energías de enlace de cada docking en la Calyxamina A. En resumen, los puntos de enlace entre Calyxaminas, Acetilcolina y Acetilcolinesterasa son los mismos. Estos se complementan con las gráficas ya estudiadas de los mapas topológicos bioquímicos de la Acetilcolinesterasa.



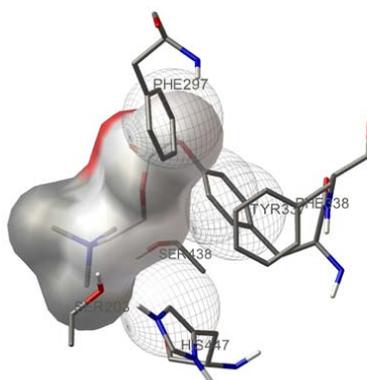
De manera global puede observarse que el análisis de cavidades muestra aquellas regiones más profundas en la enzima, la cual posee en esas mismas regiones, un potencial eléctrico que es más atractivo para el grupo químico R-COOR, las características comunes entre Calyxaminas y Acetilcolina son pocas, básicamente todas poseen este grupo R-COOR y un grupo amino, que en el caso de las Calyxaminas se encuentra en un anillo no aromático, en el caso de la acetilcolina es un grupo alquilo. Para Calyxaminas el hecho de potenciar la fuerza de la ionización de del grupo COO a través de un enlace conjugado hace a la Calyxamina A tan solo un poco más favorable en su unión a la Acetilcolinesterasa que la Calyxamina B, y ambas Calyxaminas lo son a su vez prácticamente el doble de afines que la Acetilcolina a la Acetilcolinesterasa, por lo que indudablemente la ionización del grupo COOR en su forma COOH es más atractiva para las regiones altamente cargadas como lo muestran las gráficas de potencial eléctrico y de cargas de Poisson-Boltzman. De manera que, los compuestos derivados de Calyxaminas es deseable que contengan estas características.

Diseño De Derivados

Análisis Químico - Bioquímico De La Interacción Acetilcolina - Acetilcolinesterasa Docking 1 Rango 1_1:

La acetilcolina, en la interacción con el sitio activo de la misma en la acetilcolinesterasa se identifica con los aminoácidos PHE297, SER203, SER438, TYR337, PHE338.

Docking 1, Rango 1_1



La forma química de interacción es la siguiente:

La Acetilcolina que se compone básicamente de un grupo trimetilamino y un grupo éster, se ubica de forma que el grupo amino interacciona con el grupo OH de SER203

De igual forma, la HIS447 hace una aproximación a través de sus hidrógenos piridínicos formando una atracción muy fuerte hacia el mismo grupo amino de la Acetilcolina.

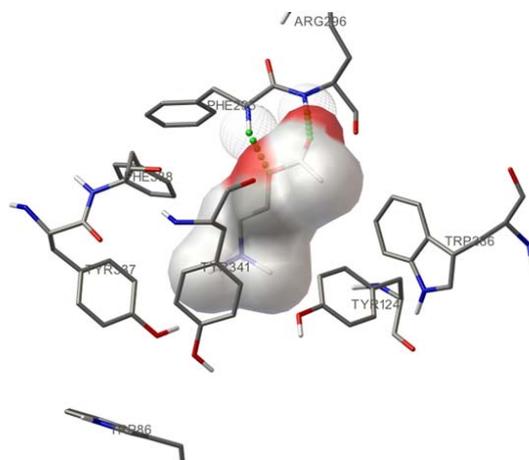
La SER438 también sugiere acercar su grupo OH hacia la misma cola amino de la Acetilcolina.

Por otra parte, el grupo éster tiene más interacción con el anillo aromático de la Fenilalanina que es apolar. Sin embargo el grupo OH de la TYR337 se acerca hacia el carbono carboxilo C=O de la Acetilcolina, al provocar esta interacción, el mismo anillo aromático de la TYR337 entra a interactuar con el anillo aromático de la PHE338 creando una estabilización por fuerzas de Van der Waals entre anillos aromáticos.

Análisis Bioquímico de la interacción Acetilcolina-Acetilcolinesterasa, Docking2, Rango 1_1

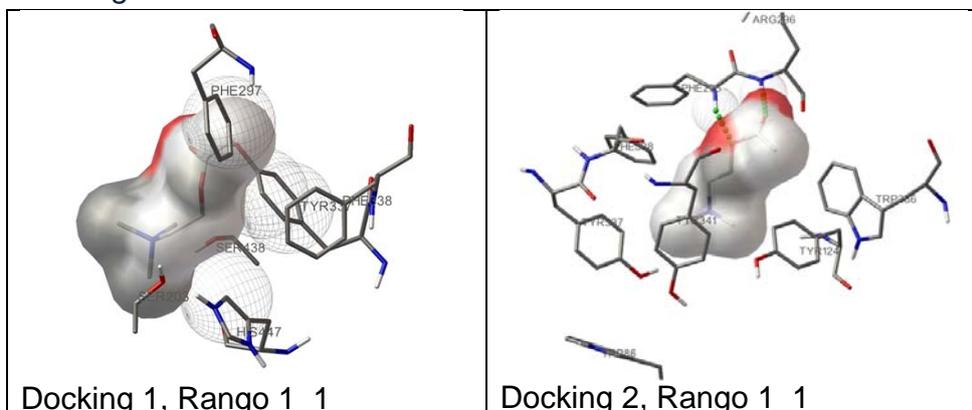
A continuación se describirá la química de interacción obtenida para el segundo docking de Acetilcolina realizado sobre Acetilcolinesterasa, en el cual se encontraron algunas diferencias respecto al primer docking. Dichas diferencias ayudan a arrojar luz sobre el método real de interacción entre la Acetilcolina y la Acetilcolinesterasa.

Docking 2, Rango 1_1



A su vez cada una de las interacciones que evalúa el programa Autodock siempre podrá ser diferente de la otra, debido a que este aleatoriamente hace uniones en diferentes conformaciones de Calyxamina y en diferentes ángulos sobre el mismo punto, y va seleccionando aquel que tenga la mejor energía de enlace como prioritario, por lo cual es lógico que existan diferencias entre docking de la misma sustancia y el mismo ligando.

GRAFICA No.30 Comparación entre las interacciones encontradas en ambos docking de Acetilcolina-Acetilcolinesterasa

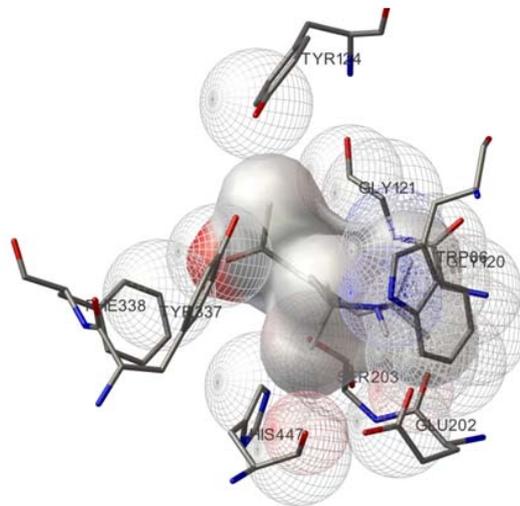


Como puede observarse en la gráfica, el sitio de acción es virtualmente el mismo, encontrándose algunos aminoácidos comunes, los cuales se pueden tomar como importantes. Como la PHE338 y la TYR337. En este docking 2 también aparece en posición cercana el TRP286. Un sistema muy semejante es el encontrado en el caso de la interacción con Calyxaminas

En el docking 2 se puede ver una clara predisposición a la hidrólisis que ha de sufrir la acetilcolina, mientras que la fenilalanina ubicada en una mejor conformación a la acetilcolina mediante la atracción de puentes de hidrógeno, puede observarse como grupos OH de al menos 3 Tirosinas se acercan para estabilizar al grupo amino que se encuentra en la cola. No cabe duda que estas tirosinas cumplen parte de la función dadora de protones para llevar a cabo la hidrólisis, el nuevo grupo OH será incorporado en el grupo acetato como producto de la hidrólisis, mientras que la colina conservará el oxígeno original proveniente de la acetilcolina.

Interacción Calyxamina A- Acetilcolinesterasa

La Calyxamina posee un grupo amino en anillo que interacciona directamente con TRP86, este triptófano interacciona lateralmente con su anillo pirrol para acercar su grupo amino al de la Calyxamina, a su vez una HIS447 se acerca mucho a la Calyxamina pues sus grupos COOH y NH₂ interaccionan también con esta terminación amino de la Calyxamina



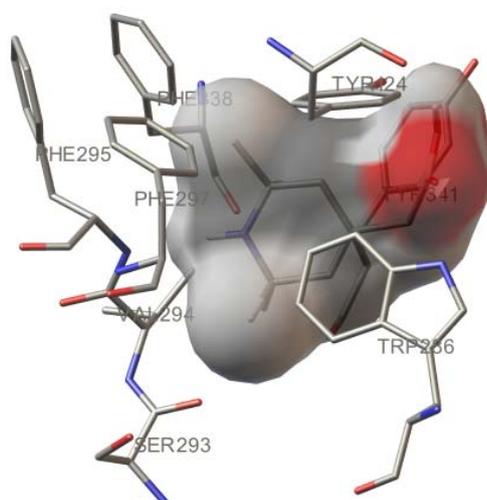
Otro grupo de aminoácidos interaccionan entre ellos mismos acomodados aparentemente por causa de la interacción entre la HIS447 y la Calyxamina, ellos son la GLU202 y la SER203 que acomodan estéricamente a HIS 447 provocando una mayor estabilidad en todo el sistema.

La GLY151 tiene también una interacción cercana al grupo COOH de la Calyxamina. Esta se acerca su grupo carboxilo al carbono C=O de la Calyxamina, es necesario recordar que la GLY posee ambos hidrógenos semi-polarizados.

Para el oxígeno del grupo C=O DE Calyxamina, su interacción más directa se presenta con PHE338 la cual ubica su anillo aromático directamente sobre el oxígeno sugiriendo una interacción dipolo - dipolo magnético.

Los grupos NH₂ de PHE338 y TYR124 ambos se acercan también atraídos por causa del grupo C=O de Calyxamina.

Interacción Calyxamina B -Acetilcolinesterasa



Las interacciones en la Calyxamina B están dadas principalmente por una serie de Fenilalaninas (295, 297, 338), cuyos anillos se acercan al anillo alifático de la Calyxamina, el triptófano 236 cumple una función importante al estabilizar la posición de la Calyxamina mediante fuerzas de Van Der Waals, y la TYR231 y la TYR124, cumplen una función dadora de protones sobre el grupo RCOOR, probablemente para su hidrólisis. Otros grupos funcionales como la VAL 294 y la SER 293 se consideran que no poseen una interacción relevante debido a que se encuentran a mayor distancia. Puede observarse que en el caso de la PHE 338 esta está entrando en contacto muy cercano con su grupo amino COOR el cual se acerca al hidrógeno del grupo amino de la Calyxamina, esta interacción es importante debido al potencial puente de hidrógeno que están formando.

Lo más relevante de este conjunto es la similitud en papeles que cumplen los grupos TRP, PHE, y TYR en semejante a lo actuado para con la acetilcolina.

Puede observarse que la diferencia entre los grupos amino de la acetilcolina y de Calyxamina es que en la primera se trata de un N tetra-sustituido y en el caso de la Calyxamina el grupo N se encuentra envuelto en un sistema alifático, ambos impedidos estéricamente pero hay una mayor distancia en el impedimento estérico que ejerce el anillo en la Calyxamina, que el impedimento estérico que ejercen los tres grupos metilo en la acetilcolina. Además el grupo N de la Calyxamina posee aún un hidrógeno muy polar que podrá dirigir en una dirección su interacción iónica hacia otro grupo de la enzima.

Puntos de afinidad Calyxamina - Acetilcolinesterasa

Partiendo del anillo piridínico por la esquina del grupo amino hacia TRP86, hacia los lados de los grupo metilo la Calyxamina se puede hacer más afín o menos afín con los grupos HIS 447 y GLU202 a la derecha e izquierda respectivamente.

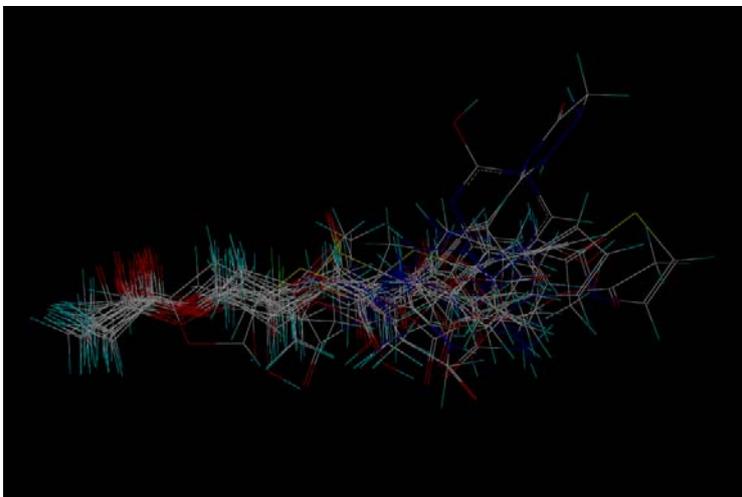
Del lado del grupo C=O de Calyxamina, esta puede crecer hacia los aminoácidos TYR124 o PHE338.

Las AFINIDADES MAS EVIDENTES son NH de Calyxamina a NH de TRP86 y c=O de Calyxamina a OH de TYR124. Es necesario hacer notar que la Calyxamina de por sí ya duplica la afinidad de la Acetilcolina a la ACHE (7.5 vs 3.5 Kcal/mol) por lo que el derivado de Calyxamina debe ser un poco menos afín que la Calyxamina para que no produzca una adhesión irreversible a la enzima, el cual es el efecto que crean los pesticidas.

Por lo anterior el primer grupo a cambiar puede ser el anillo pirrol de Calyxamina. Pues es claro que en el caso de la Acetilcolinesterasa, esta enzima está diseñada para hidrolizar grupos funcionales ROOR.

Análisis general de las estructuras obtenidas:

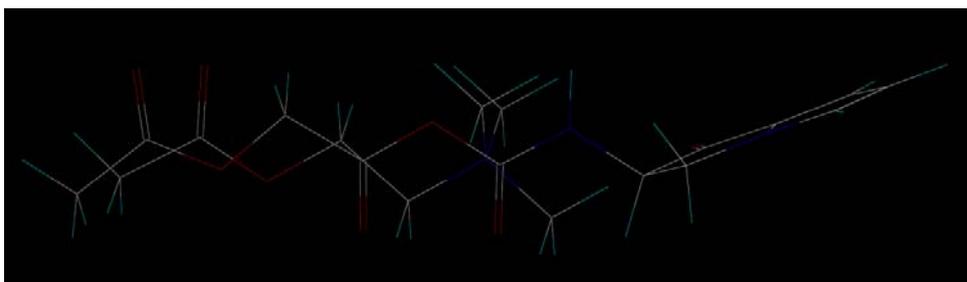
GRAFICA No.31 Factores estructurales comunes.



En la gráfica anterior pueden observarse los factores estructurales comunes entre las moléculas de derivados obtenidas a partir de la acetilcolina y de las Calyxaminas. El factor común en todas estas es la secuencia estructural CH₂-COOCH₂-R, donde R se convierte en cualquier grupo funcional o cualquier secuencia estructural que es evaluada posteriormente en sus constantes farmacofóricas y fisicoquímicas.

La longitud de la estructura se encuentra en función de los factores restrictivos estéricos, por lo que, en este caso, se ha escogido uno de los aminoácidos más lejanos con el propósito de hacer acrecer la estructura a lo largo de la cavidad del sitio activo, para de esta forma obtener mejores variables farmacofóricas entre las cuales escoger alguna combinación estructural que llene los requisitos necesarios como un buen candidato.

GRAFICA No.32 *Analizando el diseño de moléculas en base a grupos farmacofóricos.*

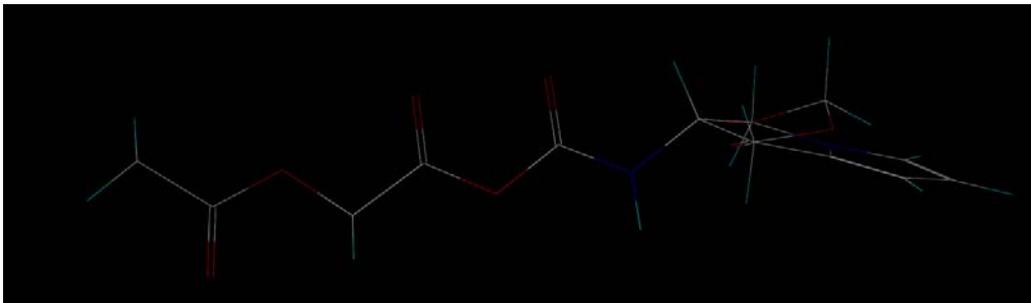


Se encontró que debido a que el sitio activo se encuentra rodeado de una gran cantidad de grupos donadores de protones como fenilalaninas, los mejores compuestos que se adaptaban a esta característica de la enzima eran aquellos que portaban en su interior hetero-átomos electronegativos que buscaran formar puentes de hidrógeno, es por esto que la mayoría de estructuras obtenidas, sobre todo en la primera secuencia de derivados, contiene un diseño N-P-N-P; donde N son grupos de carga o neutra o enlace covalente, mientras que P son grupos de mayor capacidad polar, como oxígeno, nitrógeno.

Cada grupo polar que se agrega en el diseño de una molécula hace variar de forma importante la regla de Lipinsky, ya que modifica la cantidad de hidrógenos dadores y aceptores. Además se modifica considerablemente el CLogP haciéndolo más hidrófila la molécula. Es deseable que CLogP se encuentre cercano a +5.000 según la regla de Lipinsky, para garantizar que la molécula no sea hidrolizada en su trayecto a través del sistema sanguíneo antes de llegar al sitio de interés farmacofórico.

De esta forma se encontraron problemas para desarrollar un modelo que poseyera suficientes grupos polares para tener una adecuada energía de enlace al sitio activo, pero al mismo tiempo poseer un CLogP lo suficientemente hidrófobo para que la molécula no sea metabolizada rápidamente sin tener efecto.

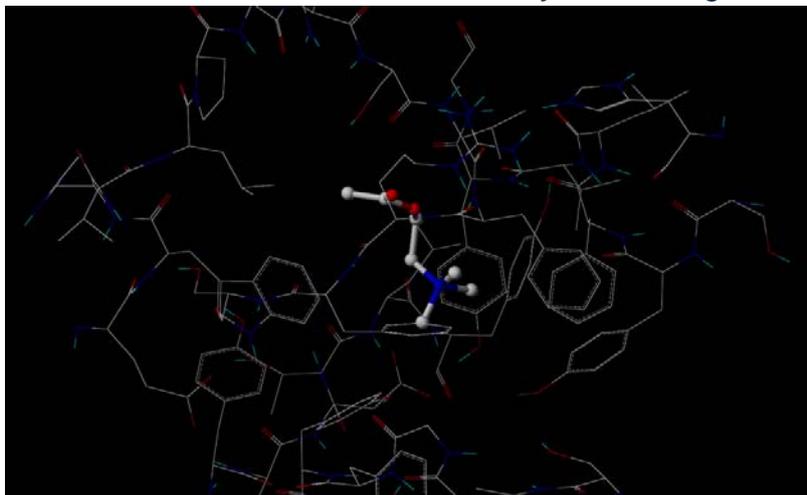
GRAFICA No.33 *Diseño fino de derivados.*



En esta gráfica pueden observarse dos moléculas diferentes que se encuentran entre la serie de primeros 58 derivados obtenidos. Ambas moléculas están perfectamente alineadas y en la imagen se puede observar que para este caso la única región que se hace variar es la región final donde una de ellas termina con un anillo 1,3-dioxolano, mientras que la otra molécula termina en un anillo tipo pirrolizina.

Para completar el diseño se ha tenido en cuenta el ambiente inmediato del sitio activo principal, ya que se ha encontrado que existe un factor común entre todos los sitios de reacción en la acetilcolinesterasa. Como se observa en el análisis de compuestos seleccionados, los ligandos reevaluados fueron exitosos para enlazarse en los otros sitios activos.

GRAFICA No.34 *Sitio activo de Acetilcolinesterasa utilizado para crear un proto-modelo y diseñar en función de este los derivados y los docking.*



Análisis de los Valores de Punteos

Molécula	Punteo Total	Crash	Polar	Punteo D	Punteo PMF	Punteo G	Punteo Químico	Punteo C	Punteo Global
18978.pdb	5.6767	-0.5653	1.0317	-158.17	-12.971	-169.2	-21.9284	1	1
5082.pdb	5.3996	-2.0628	1.1555	-146.25	-66.109	-209.01	-26.5611	3	3
12857.pdb	5.2719	-1.1394	3.1547	-151.95	-106.61	-140.99	-27.9321	2	2
Donepezilo	4.8097	-3.722	1.197	-164.79	-109.89	-265.22	-45.1705	4	4
6392.pdb	4.7162	-0.4712	1.1558	-159.71	-31.554	-165.05	-23.51	1	1
8095.pdb	4.667	-0.7485	1.3869	-151.57	-41.158	-158.53	-23.2558	1	1
18866.pdb	4.5443	-1.9186	1.6515	-166.78	-18.676	-178.63	-24.4218	1	1
6549.pdb	4.2023	-1.5697	1.0651	-147.1	-22.589	-177.8	-22.3417	1	1
15477.pdb	3.8476	-0.9784	1.1586	-126.23	-41.18	-136.59	-14.9106	1	1
7191.pdb	3.8133	-1.8005	0.994	-139.23	-52.835	-187.71	-25.0983	1	1
CALYX.mol2	3.437	-0.2735	1.9889	-491.78	-37.25	-110.38	-28.2603	1	1
12947.pdb	3.238	-1.2052	1.194	-157.35	-8.6066	-156.2	-21.4591	1	1
4179.pdb	2.8927	-0.4919	1.0548	-116.59	2.0068	-93.716	-12.6184	1	1
ACE_ACHE.mol2	2.6538	-0.2814	1.1357	-1074.4	-38.154	-95.901	-14.703	2	2

Para tabla anterior para las columnas: Punteo Total, *Crash* y *Polar*, puede interpretarse como, a más alto valor, mejor candidato puede considerarse dentro de esta serie de docking. Esta serie de docking tomó en consideración tanto los valores de mejor enlace como de otra serie de factores.

Para las columnas Punteo D, Punteo PMF, Punteo G, Punteo Químico, Punteo C, Punteo Global, a mayor número negativo, mejor evaluación y la Columna C es un Consenso que en su mayoría de veces es el mismo que el Punteo Global.

La tabla de punteos de evaluación muestra cómo, según el total de las evaluaciones, y que serán descritas individualmente a continuación, el mejor compuesto encontrado es 18978, muy cercano a 5082, en 4to lugar se puede observar el Donepezilo, que ha sido puesto en esta tabla como valor de referencia para el lector.

Estos valores de punteo han sido dados por el programa computacional de docking, y representan únicamente las evaluaciones químicas y físicas pertinentes a estos docking, es necesario contraponer los valores de esta tabla con los valores obtenidos por el método QSAR para la misma serie de compuestos, con el objetivo de elucidar según los parámetros incluidos en la regla de Lipinsky, como CLogP, Hidrofobicidad, Dadores y donadores de Hidrógenos, y obtener en consenso entre las series e datos farmacofóricas, las físicas y las químicas un compuesto ideal.

Es necesario observar que, la columna de consenso y la columna de Punteo global evalúan mejor a Donepezilo ya 5082 quienes han acumulado más puntos en el conteo global, pero esto no significa que cuantitativamente sean los mejores compuestos. Es por esto la columna de Punteo Total y la de Punteo Global difieren en el candidato Líder. Es decir, La columna de Punteo Global otorga un punto +1 a cada compuesto que ha sido sobresaliente en uno de los 4 parámetros, tal es el caso de Donepezilo que ha sido sobresaliente en los 4. Pero la columna de Punteo Total, guarda una relación más exacta en la suma de propiedades de los parámetros. Ninguna de las dos columnas puede ser determinante por si sola, es necesario contemplar los parámetros menores para entender la sumatoria y hacer una selección apropiada.

De manera que se puede observar que los 3 mejores compuestos según los parámetros físico químicos encontrados son: 18978, 5082 y 12857. A continuación se describen los demás parámetros evaluados para obtener estas conclusiones.

Crash (o Valor de choque), este valor indica que tanto está mal posicionado el ligando dentro del sitio activo, si el espacio del sitio activo se ve violado por el volumen estérico del ligando, el programa penalizará restando puntos a esta puntuación pudiendo marcarse con valores negativos aquellos ligandos que se encuentran traslapados en su espacio estérico al sitio activo.

De esta forma por ejemplo, es posible observar que 18978 posee un valor de traslape de -0.5653, el cual es mejor que el obtenido para el Donepezilo, el cual posee un valor de -3.722. Dentro de esta serie de compuestos muy pocos obtuvieron una mejor evaluación, como es el caso de 4179, pero este compuesto posee una estructura química demasiado simple para ser tomado en cuenta.

Polar: Es una medición basada en la contribución que hacen en la interacción los hidrógenos que no forman puentes de hidrógeno. Puede observarse que 18978 posee un valor un poco bajo, al contrario de la Calyxamina. En la Calyxamina se puede observar fácilmente que posee varios hidrógenos que no siendo polares o formadores de puentes de hidrógeno, pueden tener una contribución, ya que se encuentran como vecinos de grupos fuertemente atractores, como el N o el grupo C=O.

12857 posee la mejor evaluación polar de todas las moléculas de esta serie, sin duda por su gran cantidad de grupos atractores. 5082 tiene un valor que puede considerarse promedio.

Punteo D: Este punteo, que está relacionado a la Constante dieléctrica de la relación enzima-ligando, deja ver que hay para todos los compuestos de la lista una muy baja permeabilidad eléctrica, como referencia se encuentra la Acetilcolina, el cual es el compuesto que hidroliza específicamente esta enzima y la acetilcolina posee una D de -1074.4, la más baja reportada en la lista, y por una

relación de 7 veces más baja que todos los demás compuestos. De entre los cuales, nuevamente 18978 posee uno de los más bajos valores con -158.17 y 5082 y 12857 poseen valores bastante cercanos a este.

Punteo PMF: Esta es una constante de evaluación de la energía libre de Helmholtz de las interacciones enzima ligando. La importancia de este parámetro es que contiene implícita una relación entre entropía, entalpía y efectos de solvatación.

Puede observarse que las mejores interacciones enzima – ligando entre éstos parámetros fisicoquímicos la obtuvo el compuesto 5082, en la columna de consenso, la evaluación PMF ha hecho una diferencia importante al elucidar que este componente posee mejores variables fisicoquímicas en su relación enzima-ligando, y ha sido determinante, únicamente el Donepezilo le ha superado.

Punteo G: Es una relación de la energía aportada por los puentes de hidrógeno, la energía de enlace enzima-ligando y la energía interna de los ligandos. Por lo que este parámetro es sumamente importante para determinar si será favorable la unión del candidato electo a la enzima.

De esta cuenta Donepezilo y 5082 son las moléculas que liberan mayor cantidad de energía, seguidos de 18958. Siendo por tanto más favorable energéticamente la unión de 5082 entre las moléculas diseñadas en esta serie.

Punteo Químico: Para los intereses de esta investigación es necesario comprender que este punteo toma en cuenta la eficiencia del contacto Lipofílico del ligando, la entropía rotacional, un termino de intercepción y además evalúa si en caso se encontraran presentes metales, interacciones metal ligando, adicionalmente toma en cuenta las interacciones de puentes de hidrógeno.

5082 y 12857 son las moléculas con mejores interacciones de potencial químico, siendo ampliamente superadas por el Donepezilo en una relación de 2:1. De estas 5082 ha sido el mejor derivado, sin embargo las Calyxaminas poseen la mejor evaluación de interacción química. En esta tabla.

Por lo que después de considerar estos factores, es posible decir que en cuanto a constantes de inhibición y polaridad, 12857 posee mejores características, tomando en consideración su constante polar 3.1547.

Acerca de los valores químicos y físicos de estas moléculas, la energía de enlace G que es uno de los valores más importantes, favorece a 5082, seguido de 12857, en la evaluación lipofílica y puentes de hidrógeno 12857 es tan solo un tanto mejor que 5082 (Obsérvese que con estos valores es posible descartar el valor 18978), las energías libres de Helmholtz muestran una clara diferencia entre 12857 y el resto de moléculas, siendo la siguiente mejor evaluada 5082, y las constantes dieléctricas de las tres moléculas han resultado muy semejantes.

Las energías libres de enlace, evaluadas en G, hacen una leve diferencia por lo cual se cataloga a 5082 como la mejor molécula candidato de este grupo, teniendo un valor, en su calidad química y física 12857, no así 18978, la cual se puede descartar según esta evaluación.

Por lo que es necesario contraponer estos resultados con los resultados de las evaluaciones de las propiedades farmacofóricas para esta serie de moléculas.

Análisis de Propiedades Farmacofóricas

Propiedades Farmacofóricas

Especie	CLOGP	CLOGP ERROR	CMR	CMR ERROR
ACE_ACHE	-7.099	30	2.651	0
CALYX	-3.249	59	4.2466	0
12857	-0.3364	0	5.5031	0
12947	2.052	0	5.2167	0
15477	0.965	0	4.5721	0
18866	1.561	0	5.9199	0
18978	1.922	0	5.2167	0
4179	0.35	0	2.6801	0
5082	2.98	0	6.1443	0
6392	1.8588	0	6.023	0
6549	2.451	0	5.6805	0
7191	2.98	0	6.1443	0
8095	1.4608	0	5.9017	0

CMR Columna de Refractividad Molar

CMR Error: Medida de dificultad encontrada al calcular MR para esta molécula.

CLOGP: Coeficiente del Logaritmo de Partición

CLOGP ERROR: Medida de la dificultad encontrada al calcular CLOGP.

Probablemente una de las constantes más determinantes para el diseño de fármacos es CPLOGP debido a que da una idea muy firme sobre la probabilidad del fármaco de ser hidrolizado – metabolizado en el organismo. Con esto en cuenta, y siguiendo la regla de Lipinsky, la cual establece que un CPLOGP ideal se encuentra cerca el valor +5.00 en virtud de que tal valor indica que el compuesto es suficientemente lipofílico para que pueda alcanzar el sitio activo de interés después de haber sido absorbido por el sistema digestivo.

Puede observarse en la tabla de valores para la segunda serie de compuestos que la mayoría de estos posee bajos CPLOGP, unos pocos alcanzan un valor mayor de 2.000 entre ellos 5082, 7191 y 6549, de los cuales los primeros 2 son muy cercanos a 3.000. Puede observarse también que otras moléculas que fueron bien ponderadas en sus factores físico-químicos, en esta evaluación no han sido suficientemente exitosas, como 18978 con un CPLOGP de 1.922 y 12857 con un CPLOG de -0.3364. El caso particular de 12857 ilustra cómo, una molécula que posee suficientes grupos polares, heteroátomos en sí, como N y O, se convierte en poco apta para ser tomada en cuenta como un candidato farmacofórico, y esto se debe precisamente al hecho de que, los mismos grupos N y O que le ayudan a mejorar la energía de enlace enzima – ligando a través de enlaces más polares, tienen por consecuencia que esta misma polaridad la convierte la mayoría de veces, en una molécula más susceptible de ser hidrolizada, por ende modifica drásticamente su valor de partición en Octanol/Agua (CLOGP), y se hace evidente el delicado equilibrio que existe en la relación estructural y actividad biológica, que se expresa por una relación QSAR-ADME que debe comprenderse para obtener un diseño óptimo de un candidato líder.

De esta manera, puede descartarse la molécula 12857 derivada de Calyxaminas, mientras que la molécula 18978 parece tener dudosas propiedades fisicoquímicas y dudosas propiedades farmacofóricas; 5082 hasta el momento es una de las moléculas mejor ponderadas en todos los aspectos, mientras que otras como 7191 parecen poseer buenas características farmacofóricas pero pobres características físico-químicas.

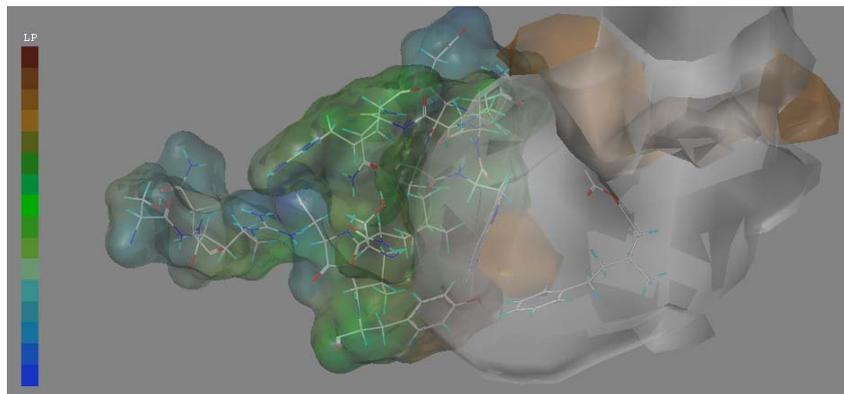
Espece	CoMSIA ESTERICO	CoMSIA ELECTROSTATICO	CoMSIA HIDROPHOBICO	CoMSIA DONADOR	CoMSIA ACCEPTOR	CoMSIA ESTERICO Y ELECTROSTATIC	CoMSIA DONADOR Y ACCEPTOR
ACE_ACHE	4.1093	37.746	1.2825	0	3.4012	37.8577	2.405
CALYX	5.5469	33.8638	5.8642	2.3242	3.3827	34.0902	3.3351
12857	7.7452	11.7863	3.2098	1.6081	7.0531	12.9965	5.2402
12947	7.4764	11.854	6.2792	0	2.6694	12.9794	1.8875
15477	7.821	11.6506	4.0591	0	4.3413	12.8966	3.0697
18866	7.6021	11.8807	5.4432	1.1574	5.0014	13.0402	3.7211
18978	7.6066	11.8624	5.9734	0	2.6694	13.0249	1.8875
4179	4.7805	11.8698	3.5312	0	3.4012	12.3417	2.405
5082	8.5647	11.8319	6.9042	0	2.6694	13.2917	1.8875
6392	7.6148	11.7711	6.4563	0	2.98	12.9442	2.1071
6549	8.0175	11.8372	6.5334	0	2.6694	13.1248	1.8875
7191	8.4855	11.8349	6.9308	0	3.4012	13.269	2.405
8095	6.4192	11.755	6.9603	0	3.975	12.6009	2.8107

Los valores CoMSIA establecen una constante comparativa entre el resto de los miembros evaluados según sea la característica que se está trabajando, de esta manera los números más altos implican una potencia más fuerte que los números más bajos para todas las columnas CoMSIA.

Cada una de estas columnas representa un análisis QSAR en función de las propiedades Topológicas del compuesto, por lo que cada uno de estos puede ser analizado individualmente según su propio mapa topológico de cada característica farmacofórica evaluada.

De esta manera, la columna estérica muestra a 5082 con un potencial hidrofóbico de 6.9042, al desplegar el campo QSAR para este compuesto es posible obtener detalles de lo que el índice significa, en una forma gráfica.

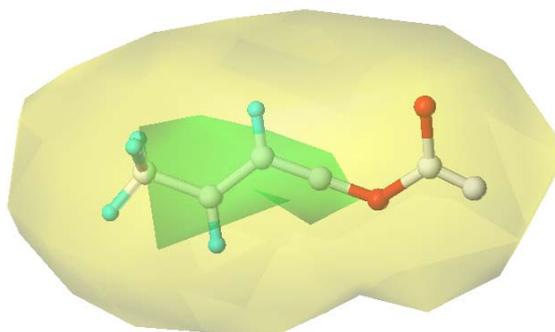
GRAFICA No.36 *Potencial hidrofóbico*



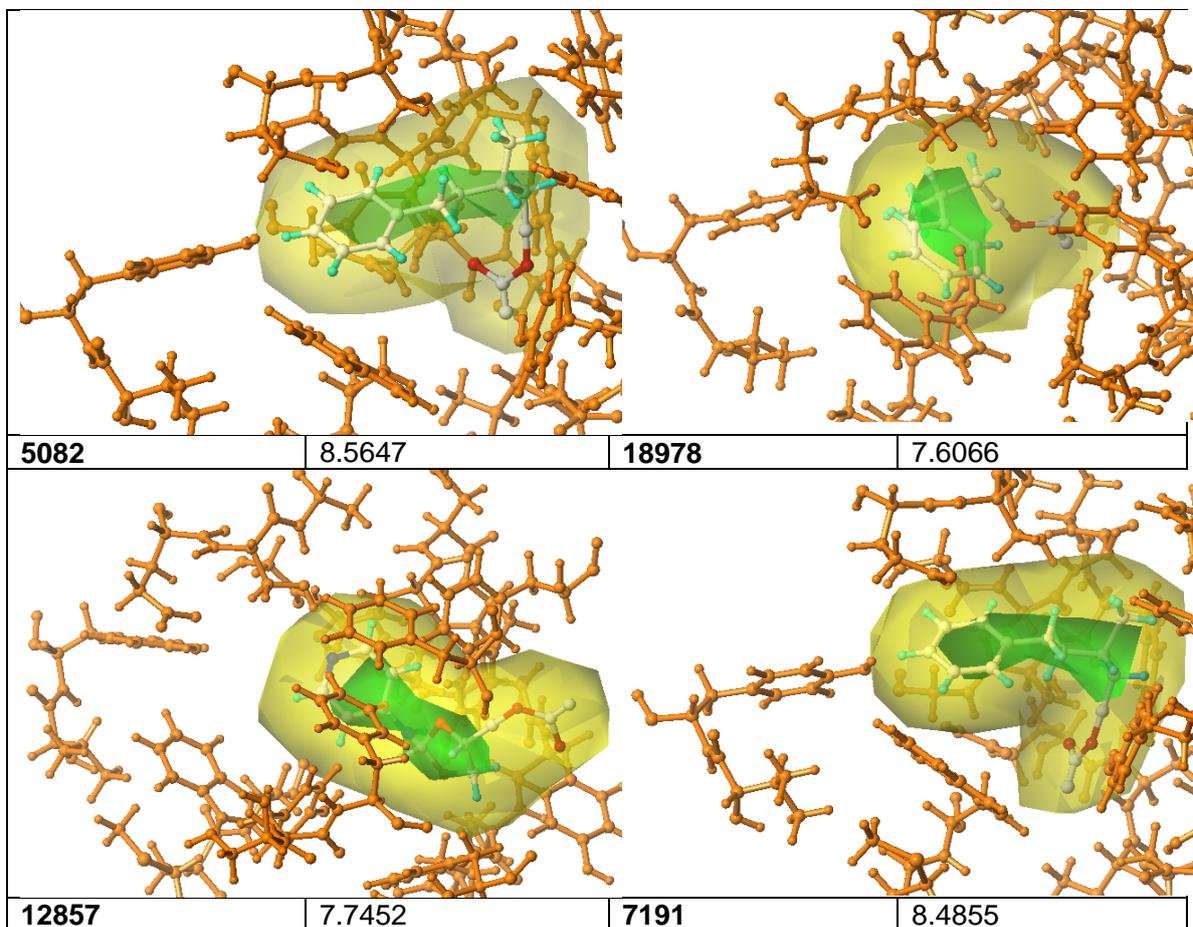
Potencial hidrofóbico calculado mediante QSAR para 5082. 5082 se muestra en interacción con una parte del sitio activo de la Acetilcolinesterasa, la cual está representada en un campo verde y azul, mientras que el campo de 5082 es de color blanco y naranja. Las interacciones naranja son interacciones negativas, mientras que los campos de color blanco son interacciones positivas.

GRAFICA No.37 *CoMSIA estérico de 4179:*

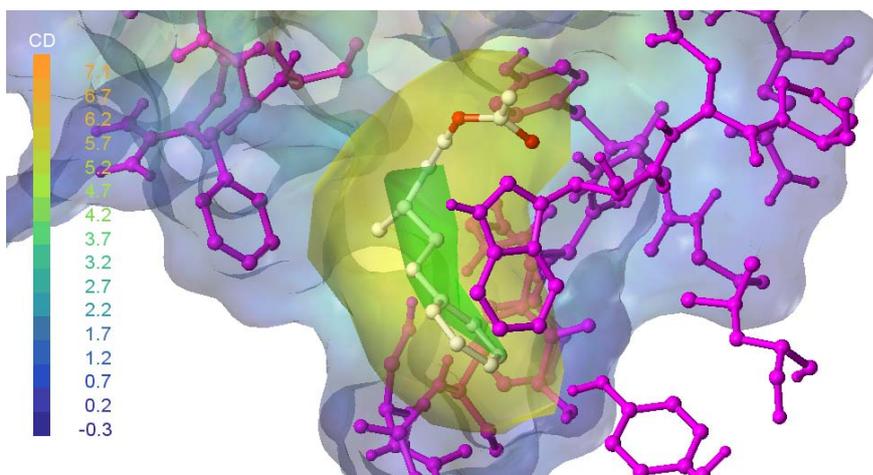
El color amarillo significa interacciones NO favorables, las verde significan, interacciones favorables.



Potencial Estérico

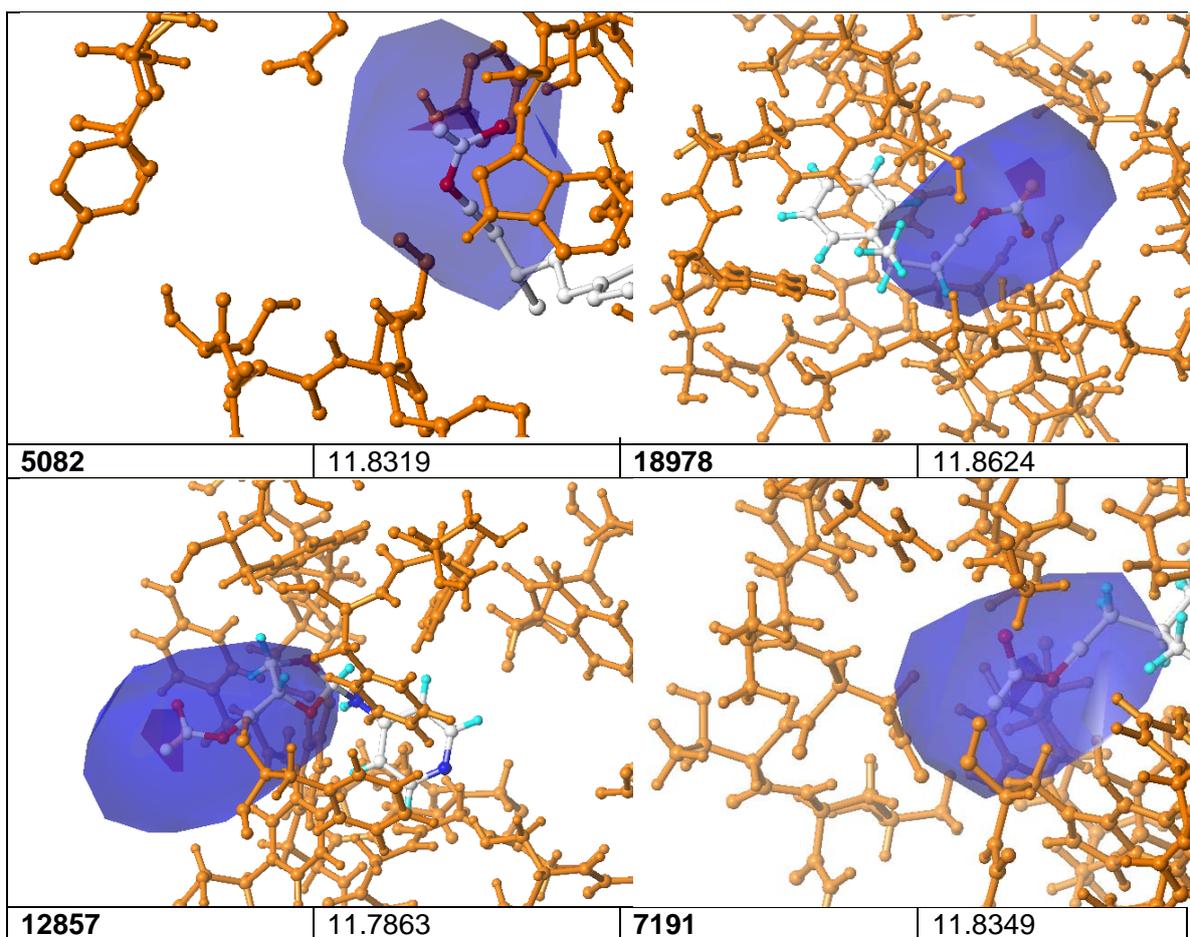


El análisis topológico sobre estos cuatro compuestos muestra mucha semejanza en el nivel de impedimento estérico que sufren los cuatros compuestos, esto es principalmente producto de que este sitio activo se encuentra ubicado en el interior de la enzima dentro de un canal estrecho, sin embargo, las mejores moléculas evaluadas aquí han sido 5082 y 7191, ambas tienen una estructura muy semejante basada en un anillo y una cadena alifática larga, la cual permite una gran flexibilidad conformacional para acomodar al ligando.



En esta gráfica se puede observar con mejor detalle las interacciones estéricas cercanas para el compuesto 5082,

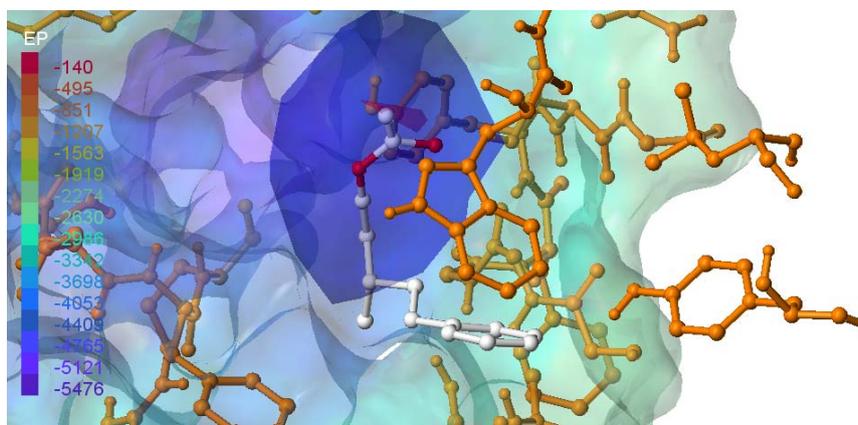
Potencial Electrostático



En la gráfica anterior se presenta una comparación en el análisis gráfico y de valores del potencial electrostático. Para los 4 mejores compuestos encontrados, el potencial electrostático es muy cercano. Este potencial se debe principalmente al poder iónico del grupo éster que está presente en todos los compuestos. Es posible observar que para 18978 y para 12857 el potencial cambia, debido a la interacción iónica que encuentran sus miembros. El valor de interacción positiva mayor, está reflejado por el mayor campo electrostático positivo (azul) encontrado, menos el total de campo electrostático desfavorable (rojo). Por este motivo, aunque el compuesto 12857 tiene mayor potencial electrostático total su valor es menor que el de 18978.

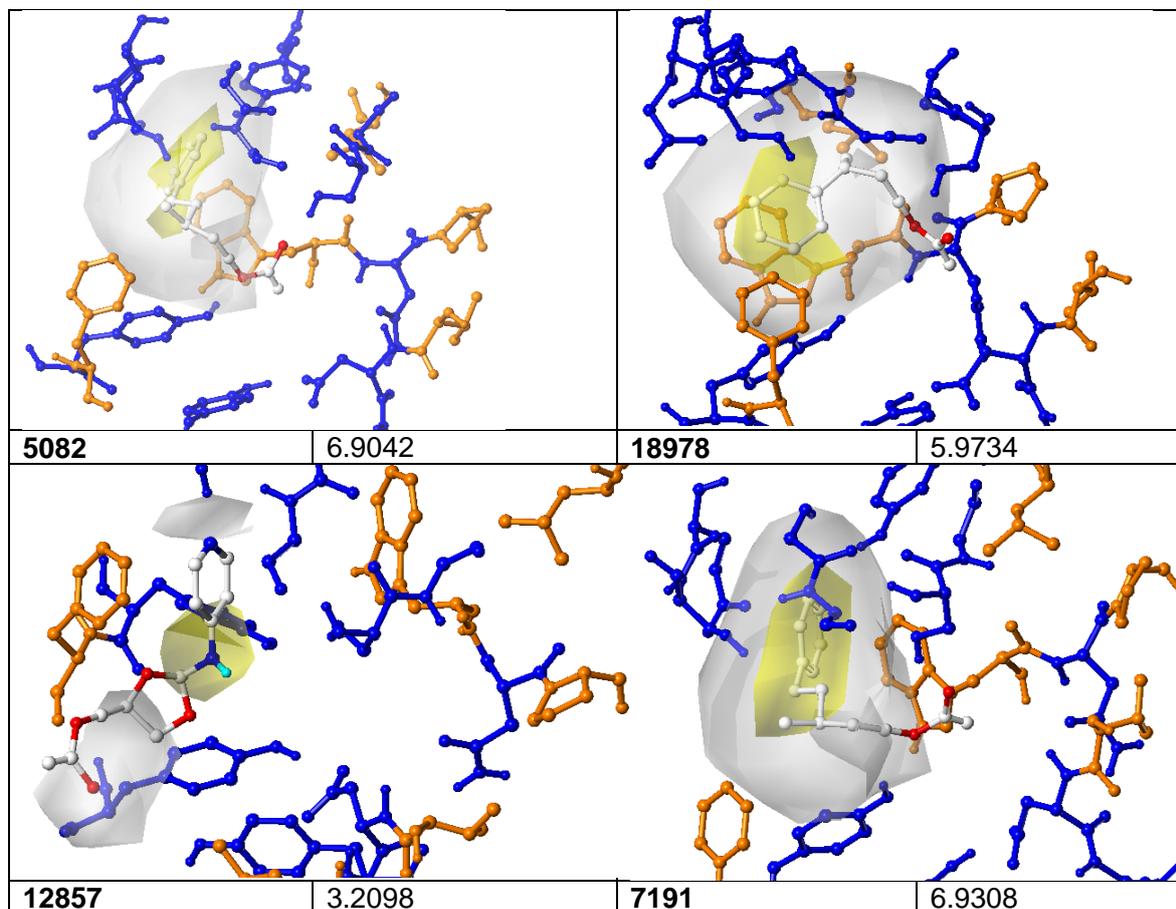
GRAFICA No.38 Interacciones en electrostáticas de 5082:

En esta gráfica pueden observarse las interacciones electrostáticas representadas para la acetilcolinesterasa en un campo de Van der Waals plotado en toda su superficie. La escala del nivel electrostático se aprecia en el lado izquierdo de la gráfica. Para la molécula 5082 es posible observar el campo electrostático de color azul.



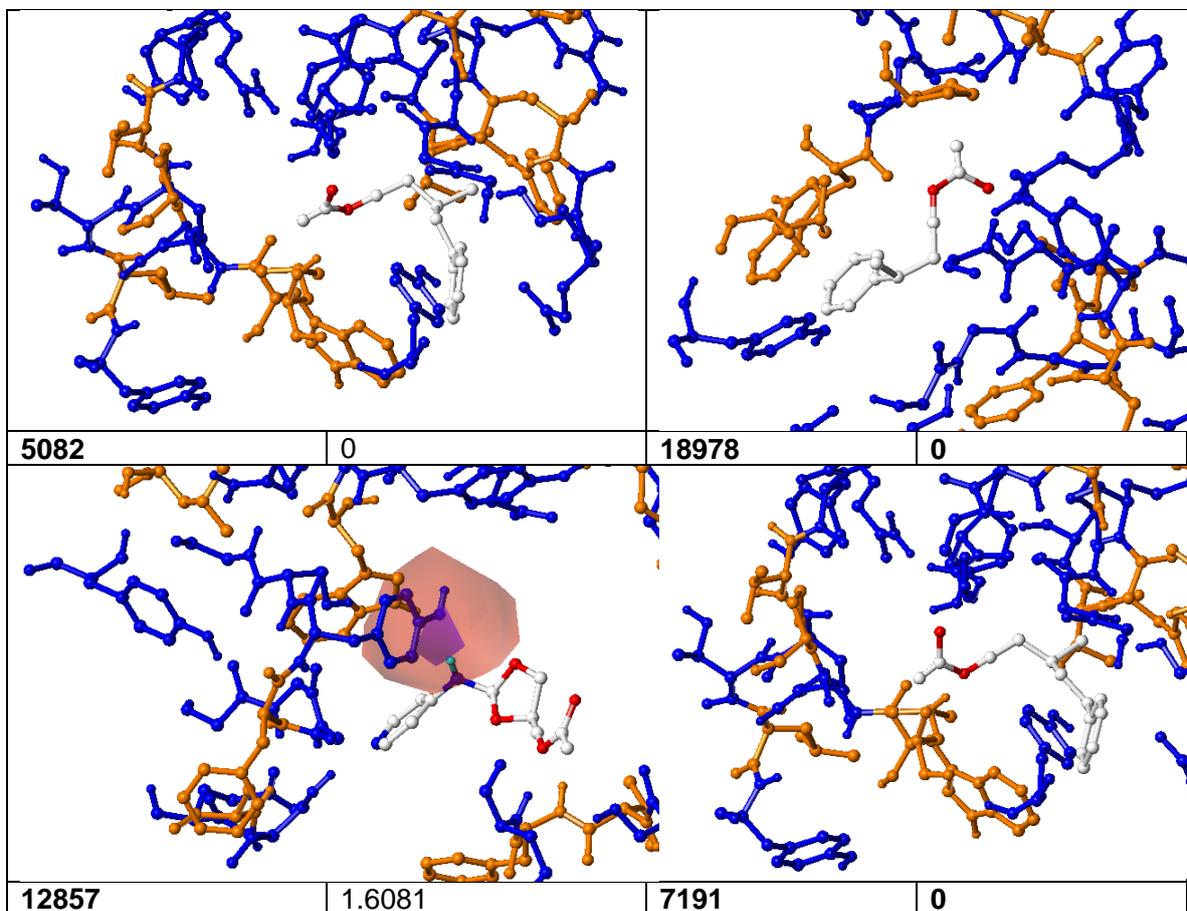
El campo electrostático de 5082 aquí mostrado es positivo, este se encuentra principalmente formado por el grupo éster, el cual es el grupo base con el cual trabaja la acetilcolinesterasa.

Potencial Hidrofóbico



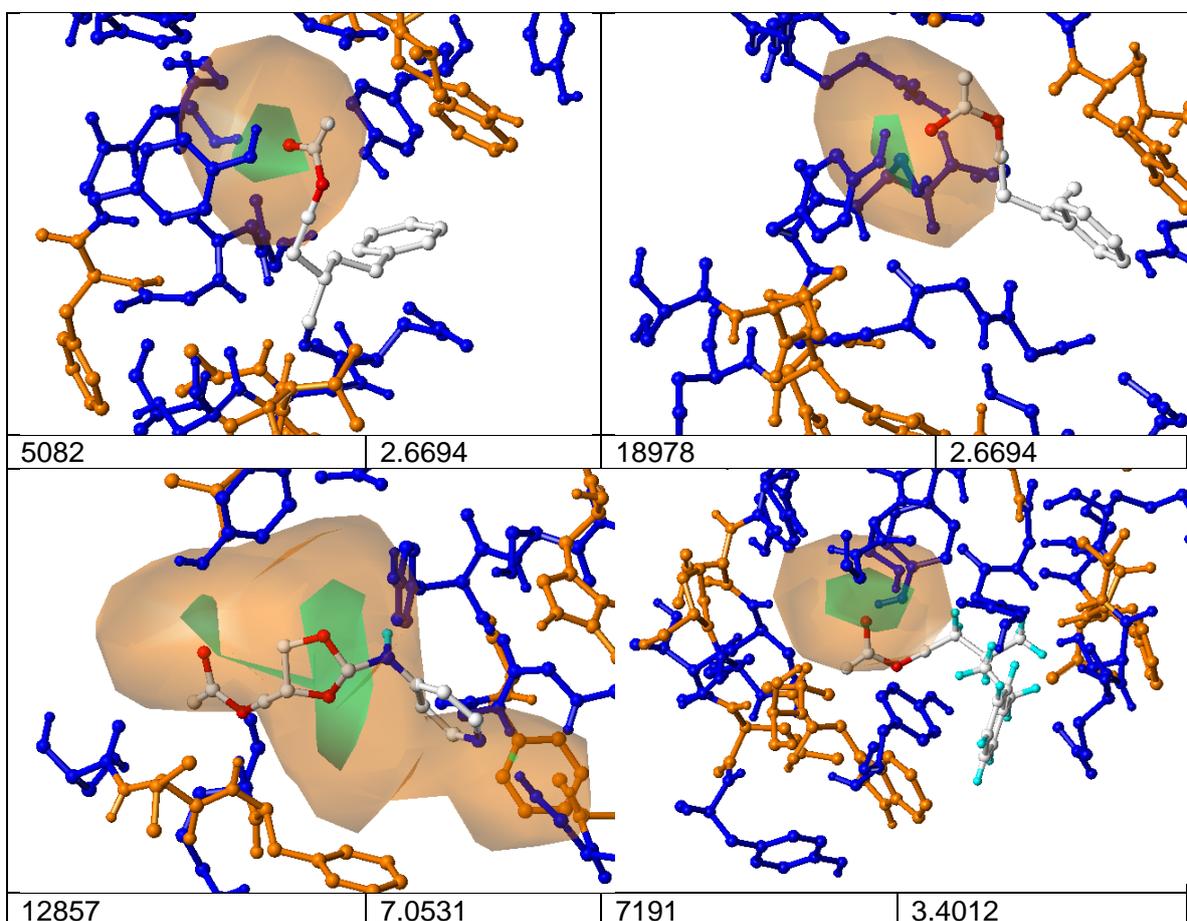
El potencial hidrofóbico es notablemente mejor para los compuestos 5082 y 7191 dado que el anillo triptófano posee mejores interacciones de van der Waals mientras que el grupo acetilo encuentra interacciones más hidrófobas en el sitio activo, esto es más difícil en el caso de compuestos como 12857 debido a su relativamente alta composición en grupos polares, que le hacen difícil encajar entre los grupos hidrófobos de la enzima. Sin embargo pueden observarse claramente en esta gráfica cómo 12857 posee buenas interacciones en su grupo amino que está incrustado dentro de un anillo pirrol.

Donador



De los cuatro compuestos evaluados, únicamente 12857 posee un hidrógeno donador, que pertenece a la amina central del compuesto. Las interacciones que posee son negativas, como lo muestra el campo magnético de color rojo. En general, el valor potencial positivo de estas interacciones es muy bajo de cualquier forma.

Aceptor



muy Los cuatros compuestos poseen interaccionesceptoras de hidrógeno principalmente por causa del grupo éster que tienen los 4 en común, las diferencias entre 5082, 18978 y 7191 radican básicamente en los efectos inductivos de la cadena carbonada de la molécula, es por esto que 7191 por tener el grupo metilo en posición beta es más influyente y levemente mejora sus interaccionesceptoras, mientras que 5082 posee el grupo en posición gama, por lo que su efecto electrónico inductivo será menor, y es exactamente el mismo caso del compuesto 18978.

12857 por otra parte posee varios heteroátomos que lo hacen mucho más electronegativo en general y por tanto es notablemente un mejor aceptor de protones.

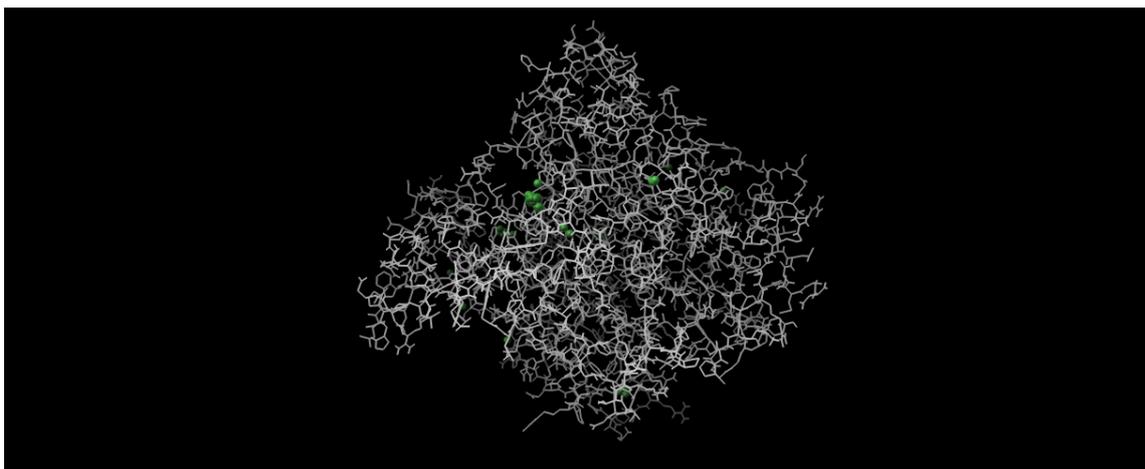
En conclusión el compuesto 5082, presenta las mejores características farmacofóricas generales, y además posee una de las mejores evaluaciones de CLOGP encontradas. Además es destacable que en el compuesto 7191

Comprobación de Resultados

Docking de 5082

La molécula 5082 ha sido seleccionada como el mejor candidato de todos los generados y evaluados en esta investigación. Esta selección se ha basado en todos los parámetros previamente discutidos. Aunque todos son importantes, probablemente los dos parámetros que dan una idea más inmediata de la calidad del candidato escogido son CLOGP y la energía libre de enlace enzima ligando. Donde se puede observar que 5082 posee características intermedias entre las Calyxaminas A y B y la Acetilcolinesterasa.

De esta manera, el docking realizado con el programa Autodock 4.01 muestra, en su gráfica que los sitios activos de 5082 en la Acetilcolinesterasa no están dispersos, sino bien localizados. Estos focos de reactividad 5082-enzima están directamente relacionados con los sitios de enlace encontrados para la acetilcolina y para la acetilcolinesterasa.



En la gráfica anterior, puede apreciarse tres puntos principales, de los cuales uno es de mayor tamaño. El de mayor tamaño indica el mejor sitio activo de 5082 en la acetilcolina, y es este sitio en base al cual fue diseñado precisamente 5082.

La cara opuesta de la enzima también presenta otras varias interacciones que marcan otros sitios de reacción para 5082, estos otros sitios también están relacionados con otros sitios encontrados para la acetilcolina.

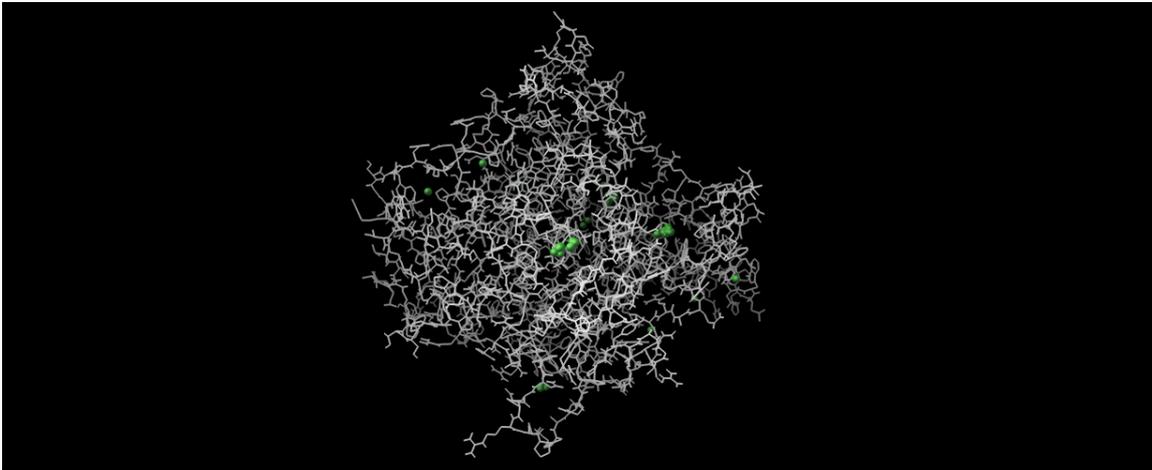
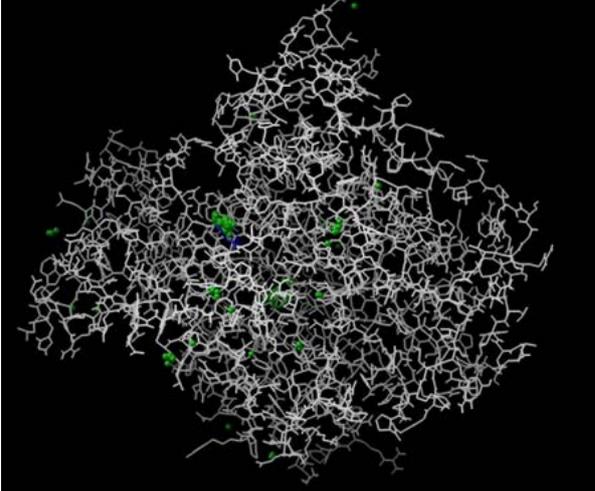
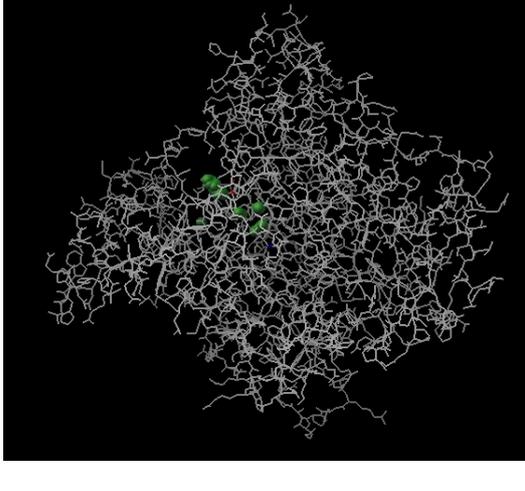
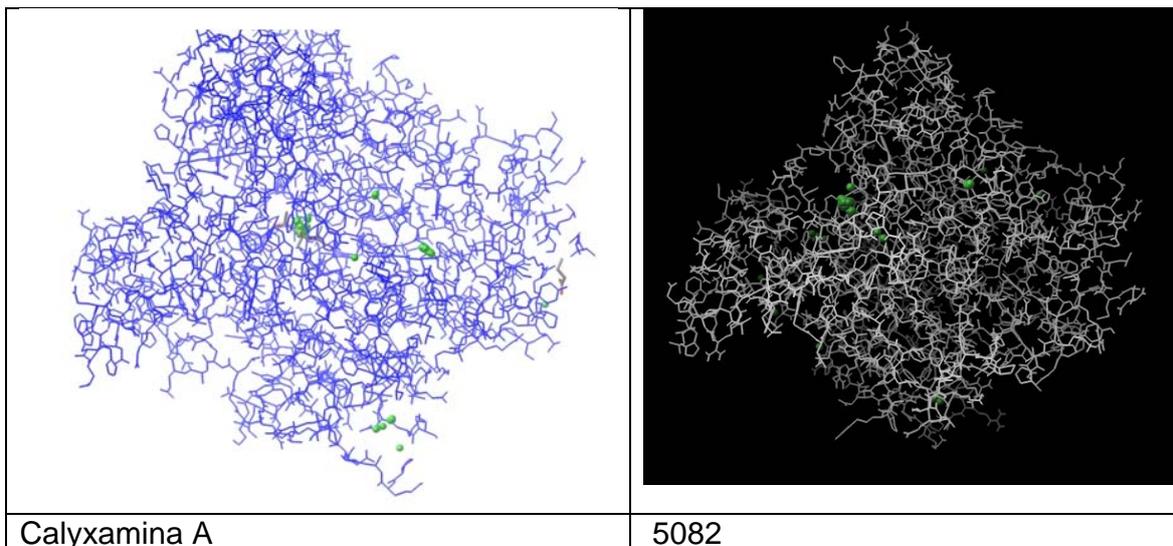
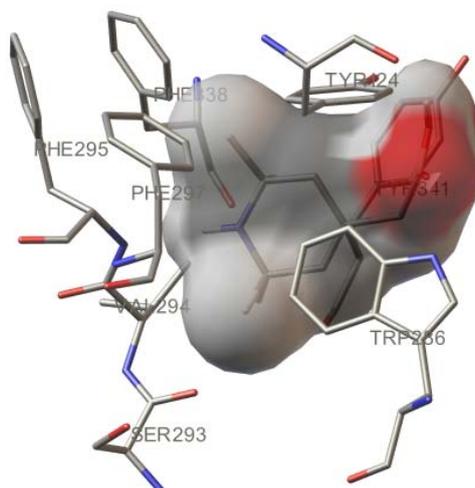


Tabla gráfica de comparaciones entre los sitios activos para las moléculas activas en Acetilcolinesterasa.

Acetilcolina	Calyxamina B
	



El análisis de interacciones cercanas muestra que en efecto los grupos R aminoacídicos cercanos a 5082 en el sitio activo principal son básicamente los mismos que los encontrados para las otros compuestos, Calyxaminas y Acetilcolina. De manera que es posible concluir que en cuanto a 5082 se refiere, esta molécula desarrolla una actividad bioquímica óptima en su interacción acetilcolina-ligando



Puede verse en la gráfica anterior, cómo el triptófano encuentra interacciones de van der Waals cercanas, mientras que grupos polares como el oxígeno presente en la tirosina, y grupos fenilalanina hacen interacciones de puentes de hidrógeno muy importantes para la correcta estabilidad de 5082 en el sitio activo

Esto se confirma fácilmente con la tabla de datos comparada para los valores de Calyxaminas, Acetilcolina y 5082

Corrida No.	A única	B única	Acetilcolina	5082
Rango	1_1	2_1	1_1	1_1
Energía de Enlace	-7.59	-6.41	-3.47	-4.62
Constante de Inhibición KI	2.74uM	20.14uM	2.84mM	407.97uM
Energía Intermolecular	-7.89	-7.3	-4.67	-6.71
Energía Interna	-0.12	-0.15	0.32	-0.07
Energía Torcional	0.3	0.89	1.19	2.09
Energía Extendida de No enlace	-0.12	-0.15	-0.32	-0.07
Media de la Raíz Cuadrada (RMS)	0	0	0	0.0
RMS de Referencia	206.6	123.51	123.22	17.95
Eficiencia de Ligando	-0.54	-0.46	-0.35	-0.29

En donde en la energía de enlace se puede observar directamente que el valor está en -1.000 Kcal/mol mejor ponderado que la Acetilcolina, lo cual presupone que durante la competencia de actividad sustrato-enzima-compuesto, la enzima seleccionará a 5082 con n poco más de preferencia sobre la Acetilcolina en orden de ganar más estabilidad de enlace, sin embargo, al comparar 5082 con la diferencia energética liberada por las Calyxaminas A y B que casi duplican el valor de la Acetilcolina, se observa que en efecto la Calyxamina sería mucho más afín que 5082 y que Acetilcolina a la Acetilcolinesterasa, de manera que, el hecho de que 5082 mantenga esta diferencia energética es favorable si se desea establecer una relación reversible enzima-ligando como lo hace la acetilcolina al ser degradada por esta enzima, asegurando también que por la mejor afinidad de 5082 su unión se mantendrá favorecida pero no será permanente, encontrando de esta manera un mejor equilibrio para 5082 entre la Calyxamina y la Acetilcolina, por lo cual, la energía de enlace enzima ligando obtenida para el compuesto 5082 se puede considerar como óptima.

La constante de inhibición, la cual está relacionada al grado de impedimento estérico que realiza el ligando en la enzima, hace ver que la unión de 5082 en este sitio activo efectivamente crea un notable obstáculo en la enzima, esto es óptimo si se espera que 5082 haga más lento el trabajo de la acetilcolina.

Por último, otro parámetro que vale la pena discutir es la eficiencia de ligando, la cual está en promedio bien ponderada al igual que los otros sustratos que se pueden observar en esta lista.

9. CONCLUSIONES

9.1 Se determinaron las características bioquímicas de la Acetilcolinesterasa en función de sus propiedades teóricas:

- Densidad de hidrógenos dadores.
- Densidad de hidrógenos aceptores.
- Relación de la densidad entre hidrógenos dadores y aceptores.
- Potencial Lipofílico.
- Análisis de la profundidad de cavidades y
- Potenciales electroquímicos basados en cargas de Gasteiger y las relaciones de Poisson-Boltzman.

9.2 En base a estas propiedades determinadas fue posible encontrar una serie de sitios activos presentes en la acetilcolinesterasa, cuya función es hidrolizar la acetilcolinesterasa y los cuales están de acuerdo con lo previamente reportado experimental y teórico en la literatura.

Los sitios activos presentes en la Acetilcolinesterasa para la Calyxamina A, para la Calyxamina B y para la Acetilcolina, son virtualmente los mismos, existen pequeñas diferencias entre los aminoácidos que poseen preferencia en la interacción entre las tres moléculas, pero básicamente se puede decir que estos aminoácidos generalmente son

- Fenilalanina
- Triptófano
- Tirosina

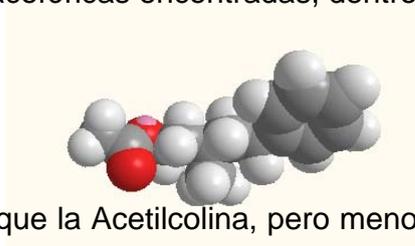
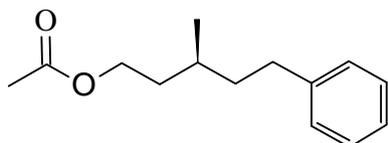
Para el caso particular de la Acetilcolina, es posible proponer que una arginina realiza el trabajo de ubicar en una correcta conformación al sustrato, debido a que durante los docking, se encontró la formación de dos importantes puentes de hidrógeno acetilcolina-enzima que eran coincidentes con una conformación óptima que permite el acercamiento de varios grupos tirosina para promover potencialmente la hidrólisis de la acetilcolina.

Existe un sitio activo principal en la acetilcolinesterasa, determinado por el hallazgo recurrente de muy bajas energías de enlace liberadas para la interacción de todas las moléculas afines de sustrato-Acetilcolinesterasa que fueron evaluadas en esta investigación. Dicho sitio activo se ubica esencialmente alrededor de la TYR337, con importantes interacciones aportadas por PHE298 y PHE337. Existe aún un segundo sitio activo y un tercero muy importantes, pero el principal se caracterizó por encontrar siempre las energías de enlace más destacadas para todos los docking realizados. Dicho sitio activo se encuentra en la parte central interna de la Acetilcolinesterasa y las moléculas acceden a él a través de un canal que posee importantes atracciones electrostáticas que guían a los compuestos a través del conducto. Los otros sitios activos son característicos

también por sus importantes interacciones electrostáticas, y su forma es más semejante a una ostra que se encuentra abierta.

9.3 Se han obtenido varios derivados que mejoraron la energía de enlace desplegada por las Calyxaminas A y B y la Acetilcolina, dentro de ellos se puede mencionar como los más importantes diseñados, en base a los buenas puntuaciones relativas a las constantes farmacofóricas estudiadas para cada uno: 7191, 5082, 18978 y 12857, de los cuales los primeros dos son isómeros, y 18978 guarda una estructura química muy cercana a estos dos. 12857 es diferente ya que posee un anillo piridínico semejante al de Calyxaminas y su estructura química es más compleja, sin embargo, las propiedades farmacofóricas de este, aunque fueron muy destacables, no superaron a los otros 3.

Se ha seleccionado a 5082 (3-metil-5-fenilpentilacetato) como el mejor candidato líder encontrado en esta serie de compuestos diseñada, basándose en la excelente calidad de sus propiedades farmacofóricas encontradas, dentro de ellas.



- Es más afín a la Acetilcolinesterasa que la Acetilcolina, pero menos que las Calyxaminas.
- Su CLogP es 2.98, siendo el CLogP ideal cercano a 5.00 se considera el valor obtenido como bueno.
- Aunque su evaluación fisicoquímica total es la 2da mejor en la lista, un análisis detallado revela que en realidad este es el mejor compuesto.
- Posee excelentes calidades hidrófobas.
- Su análisis de hidrógenos dadores y aceptores lo ubica en 1.98 siendo uno de los mejores compuestos obtenidos.

Por lo anterior se puede concluir que el compuesto 5082 cumple con la regla de Lipinsky.

Se considera que químicamente el compuesto 5082 posee una estructura química fácil de sintetizar ya que únicamente está constituido por un anillo aromático y una cadena alifática que termina en grupo éster. Además es posible decir que su síntesis puede partir de compuestos económicos y fáciles de encontrar.

9.4 Se ha corroborado la eficiencia del enlace 5082-Acetilcolinesterasa mediante la realización de un Docking, el cual ha demostrado que la afinidad de este compuesto es superior a la de la Acetilcolina y menor que la de las Calyxaminas.

La energía de enlace teórica de 5082-Acetilcolinesterasa es de -4.62 kcal/mol.

10. RECOMENDACIONES

Es posible desarrollar mejoras sobre el compuesto seleccionado como derivado óptimo en esta investigación, dichas mejoras se recomiendan que sean de la siguiente forma:

- Incrementar el peso molecular del compuesto.
- Incrementar la lipofilia del derivado.
- Incrementar paralelamente las características donadoras y aceptoras.

Sin embargo, vale la pena hacer pruebas in vitro de 3-metil-5-fenilpentilacetato, en virtud de que esta molécula se puede conseguir en el mercado a un costo relativamente aceptable, o bien su síntesis es conocida y puede desarrollarse de forma económica.

Dichas pruebas preclínicas, se recomienda que estén orientadas en función de: Obtener estructuras cristalográficas del enlace de 5082-Acetilcolinesterasa por medio de difracción de rayos X para corroborar los datos teóricos aquí obtenidos.

Se recomienda comenzar simultáneamente el diseño de pruebas preclínicas para estimar la toxicidad del compuesto y la actividad biológica real del mismo.

11. BIBLIOGRAFIA

A

Asociación Guatemalteca contra el Alzheimer, 2007, Informe Anual
Alzheimer's Association 2009 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 2009 May;5(3):234-70

B

Bagautdinov B, Yutani K, Riken Structural GenomicsPROTEOMICS, Initiative (Rsgi), 2008

C

Cóbar, O.; Vásquez, A. Síntesis y Actividad Biológica de Calyxaminas y Calyxolanos, Dos Nuevas Clases de Productos Naturales Marinos. *Resúmenes de Proyectos de Investigación 2004*, Dirección General de Investigación. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005, 26-29.

Cachau RE, Gonzalez-Nilo FD, Ventura ON, Fritts MJ. In-silico nanobio-design. A new frontier in computational biology. *Curr Top Med Chem.* 2007;7(15):1537-40

G

Gil-Néciga E., Gobartt AL., Treatment patten of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitors. *Rev Neurol* 2008, 46(8):461-4.

Guo J, Hurley MM, Wright JB, Lushington GH. A dockin score function for estimating ligand-protein interactions: application to acetylcholinesterase inhibition. *J MedChem* 2004 (22):5492-500

H

Harel, M., Schalk, I., Ehter-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C Axelsen, Ph., Silman, I., And Sussamn, J.L. Quaternay ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1993, 90:9031-9035.

K

Kubis AM, Janusz M. Alzheimer's disease: new prospects in therapy and applied experimental models. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2008 Aug 5;62:372-92.

L

Landmark K, Reikvam A. Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia--are they useful in clinical practice? *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2008128(3):294-7

Lee SH, Van HT, Yang SH, Lee KT, Kwon Y, Cho WJ. Molecular design, synthesis and docking study of benz[b]oxepines and 12-oxobenzo[c]phenanthridinones as topoisomerase 1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 May 1;19(9):2444-7. Epub 2009 Mar 18

Lucas S, Heim R, Negri M, Antes I, Ries C, Schewe KE, Bisi A, Gobbi S, Hartmann RW. Novel aldosterone synthase inhibitors with extended carbocyclic skeleton by a combined ligand-based and structure-based drug design approach. J Med Chem. 2008 Oct 9;51(19):6138-49. Epub 2008 Sep 3

M

Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon,S.,Krejci, E.,And Vallette, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 1993,41:31-91

P

Pepeu G, Giovannini MG. Cholinesterase inhibitors and beyond. *Curr Alzheimer Res.* 2009. 2:86-96

R

Rodriguez, A.; Cobar, O.; Padilla, O.; Barnes, C. Calyxamines A and B, Novel Piperidine Alkaloids from the Caribbean Sea Sponge *Calyx podatypa*. *Journal of Natural Product.*, 1997, 60, 1331-1333.

S

Shevtsov PN, Shevtsova EF, Burbaeva GSh. Effect of tacrine, amiridine, akatinol memantine, and triazolam on phosphorylation, structure, and assembly of microtubules from brain microtubular proteins in Alzheimer diseases. *Bull Exp Biol Med.* 2008 145(2):218-22

Song CM, Lim SJ, Tong JC. Recent advances in computer-aided drug design. *Advance Access, Oxford Journals, Brief Bioinform.* 2009 May 11.

T

Taylor, P, and Radié, Z. The cholinesterases from genes to proteins *annu. Rev Pharmacol. Toxicol.*, 1994., 34:281-320

Tiseo PJ, Perdomo CA, Friedhoff LT. Metabolism and elimination of 14C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study Br J Clin Pharmacol. 1998 Nov;46 Suppl 1:19-24.

12. ANEXOS

Para todas las evaluaciones evaluadas en las tablas de propiedades farmacofóricas, se adjunta información para comprender la lectura de los valores. Esta información es proporcionada por los desarrolladores del programa de modelaje Molecular SYBYL de la compañía Tripos.

Valores de las Funciones de Punteos

Los valores indican la afinidad de enlace al ligando como constantes de $-\log K$.

Valores de Funciones Objetivo

Las Funciones Objetivo tienen una puntuación máxima de 10.0. Cualquier desviación en cualquiera de los descriptores de funciones de punteo medida de los valores derivados del resto del grupo de compuestos es sustraídos del valor máximo. Así, el punteo resultante simplemente describe la característica de los ligados para la evaluación ideal del grupo de compuestos. Aunque el autor postula que una puntuación alta puede indicar un mejor compuesto, uno no puede derivar ninguna medida directa del enlace de estos números.

Valores de Punteo Negativo

Los valores negativos de las puntuaciones obtenidas, se debe a que el programa implementa una función de penalización por la distancia con el objeto de generar compuestos que llenen el sitio activo. Esto evita que ligandos que apenas llenan el sitio activo sean tomados en cuenta. Por lo que los ligandos deben llenar óptimamente un 66% de la distancia entre el enlace que se está modificando y el objetivo.

Compuestos con valores negativos se consideran pseudo hits. El programa no descarta estos pseudo hits debido a que ellos proveen importantes datos acerca de la complementariedad estérica y electrostática. El programa usa esta información para determinar heurísticamente (empíricamente) cuales grupos químicos a utilizar en la generación siguiente.

Resultado de las Tablas de Evaluaciones Surflex Dock

La hoja de cálculos mostrada posee la siguiente información

Punteo Total= La evaluación total de Surflex Dock expresada como $-\log K_d$. La evaluación total incluye un valor de choque (*Crash score*).

The columns contain the following information:

Valor de Choque = El grado de penetración inapropiada por el ligando en la proteína y de interpenetración (auto choque) entre átomos ligados que son separados por enlaces rotables. Los valores de choque cercanos a 0 son favorables. Números negativos indican penetración. Mientras más pequeño sea el valor de choque, mejor docking es desplegado como falso positivo. De cualquier forma, esto puede descartar positivos verdaderos que encajan muy unidos en la cavidad.

Polar = contribución de el enlace de interacciones de hidrógenos no polares al valor total. El valor total polar puede ser útil para excluir del docking resultados que no hacen puentes de hidrógeno.

Punteo G: Esta función está elaborada en base al trabajo del grupo de Willet (G. Jones, P. Willett, R. Glen, A.R. Leach and R. Taylor, *J. Mol. Biol.*, **1997**, 267, 727) y se basa en las energías de los puentes de hidrógeno, la energía del complejo ligando-enzima y la energía interna del ligando utilizando la ecuación

$$E_{\text{complejo}} = \sum_{\text{ligando}} \sum_{\text{enzima}} \left(\frac{A}{r_{ij}^8} - \frac{B}{r_{ij}^4} \right)$$

En donde r_{ij} es la distancia interatómica.

A y B son obtenidas del campo de los parámetros de fuerza calculado por Tripos para cada tipo de átomo.

Todos los términos son limitados a [-0.5, 0.5] para prevenir átomos en proximidad cercana y sobrevalorar su cálculo. Esto es menos drástico que el potencial común entre 6-12 y favorece los contactos cercanos entre los restos hidrofóbicos.

En otras palabras esta constante mide que tan bien está encajado el ligando en el sitio activo usando como referencia la distancia internuclear ligando-enzima.

Punteo D: Esta función de evaluación está basada en el trabajo de Kuntz y sus colaboradores (I. D. Kuntz, J. M. Blaney, S. J. Oatley, R. Langridge, and T. E. Ferrin, *J. Mol. Biol.*, **1982**, 161, 269), y toma en cuenta solamente la carga y las interacciones de van der Waals entre la proteína y el ligando.

$$D_{\text{punteo}} = \sum_{\text{ligando}} \sum_{\text{enzima}} \left(\frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} + 332.0 \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \right)$$

Donde q_i es la carga del átomo.

D es la constante dieléctrica.

A y B son obtenidas de los parámetros de campo de fuerza de Tripos para cada tipo de átomo.

Las cargas son computadas por el método de Gasteiger Marilli

Los términos de van der Waals es ignorado por causa de hidrógenos que enlazan hidrógenos.

Todos los términos son limitados a [-0.5, 0.5] para prevenir átomos en la proximidad de una sobrevaloración de los cálculos.

Punteo C: Consenso del punteo computado por el Docking y sus funciones de evaluación adicionales.

Punteo PMF

Esta función de evaluación está basada en el trabajo de Muegge y Martin ([2] I. Muegge and Y. C. Martin, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42,791) , quienes han analizado un gran set de complejos elaborados de *Protein Data Bank* y desarrollan un grupo de energías libres de interacción de Helmholtz para pares atómicos proteína-ligando (Potencial de Fuerza Media del inglés Potential of Mean Force PMF).

La ecuación en la que se basa es la siguiente:

$$E_{\text{complejo}} = \sum_{\text{ligando}} \sum_{\text{enzima}} A_{ij} r_{ij}$$

Donde $A_{ij}r_{ij}$ es la contribución de un par de átomos tipo i y j a la distancia r_{ij} .

Estas contribuciones fueron obtenidas de las funciones tabuladas PMF, y e implícitamente tratan los varios efectos de entalpia, entropía y solvatación.

Punteo Químico: Esta función de evaluación está basada en el trabajo de Eldridge, Murray, Auton, Polini y Mee (M. D. Eldridge, C. W. Murray, T. R. Auton, G. V. Paolini, and R. P. Mee, *J. Comp.-Aided Molec. Des.*, **1997**, 11, 425-445) Este incluye términos para el puente de hidrógeno, interacciones metal-ligando, contacto Lipofílico y entropía rotacional, en conjunto con un término de intercepto.

Punteo Global C: Es el punteo consenso a través del set de datos completo (Solamente calcula para evaluaciones multi Mol2)

Los valores de las propiedades fisicoquímicas para cada átomo están basados sobre las siguientes fuentes:

Steric CoMSIA field: Está basado en las tablas de valores de Van der Waals pertenecientes al programa y no pueden ser modificadas.

Electrostatic CoMSIA fields: Utiliza las cargas calculadas para la molécula. Estos valores son acezados a la vez que el campo es computado y así puede ser modificado por recalcu o directamente editando la carga.

Hydrogen bond donor and acceptor fields:

Para crear los campos aceptores y donadores, CoMSIA crea primero átomos pivote en sitios donadores y aceptores,. Cada uno de estos puntos es usado tanto por el campo donador como por el aceptor. Cualquier sito puntual donador o aceptor a 1.8 Armstrong de un átomo real en la molécula es ignorado en el campo de cálculo.

El campo aceptor contiene información acerca de donde los grupos donadores de puentes de hidrógeno deben estar en el receptor.

El campo donador describe donde el grupo aceptor de puentes de hidrógeno debe estar localizado en el receptor.