

Guatemala 19 de noviembre de 2015

M Sc. Gerardo L. Arroyo C.

Director General de Investigación

Universidad de San Carlos de Guatemala

Maestro Arroyo:

Adjunto a la presente el informe final “**Diseño *in silico* de un Potencial Fármaco Agonista de la Orexina A, con propiedades antinarcotépticas**” (partida presupuestal 4.8.63.5.65), coordinado por el Licenciado **Omar Ernesto Velásquez González** y avalado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado de acuerdo a la guía de presentación de la Dirección General de Investigación y revisado en su contenido en función de los objetivos planteados y productos esperados, por lo que esta unidad de investigación da la aprobación y el aval correspondiente.

Sin otro particular, suscribo atentamente.

“Id y enseñad a todos”

Ph. D. Jorge Erwin López

Director Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas

Anexo: lo indicado.

Firma y Sello,

Director, Unidad Avaladora.

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial

Informe Final

“Diseño *in silico* de un Potencial Fármaco Agonista de la Orexina A, con propiedades antinarcóticas”

Equipo de Investigación

Omar Ernesto Velásquez González

Rony José Letona Lee

Elana Pacheco Vela

19 de noviembre de 2015

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas

M. Sc. Gerardo Arroyo Catalán

Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar

Coordinador General de Programas

Ing. Liuba María Cabrera Ovalle de Villagrán

Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial

Omar Ernesto Velásquez González

Coordinador del Proyecto “Diseño *in silico* de un Potencial Fármaco Agonista de la Orexina A, con propiedades antinarcolépticas”

Rony José Letona Lee

Auxiliar de Investigación I

Elena Pacheco Vela

Auxiliar de Investigación I

Partida Presupuestaria

4.8.63.5.65

Año de ejecución: 2015

Resumen	1
Palabras Clave	1
Introducción	2
Marco Teórico y Estado del Arte	4
Materiales y Métodos	12
Resultados	16
Análisis y Discusión de Resultados	18
Impacto Esperado	29
Conclusiones	30
Referencias	31
Actividades de Gestión y divulgación	35

RESUMEN

La Narcolepsia es una enfermedad neurológica avanzada, caracterizada por una excesiva somnolencia diurna, transiciones prematuras de vigilia sueño y movimientos oculares rápidos. En los seres humanos se debe a la falta de los neuropéptidos Orexinas A y B, que controlan los ritmos circadianos mediante la regulación del ATP y cuya ausencia parece también estar ligada a procesos neurodegenerativos más avanzados, como las Enfermedades de Alzheimer y Parkinson. Es de suma importancia, el recuperar la función de señalización de las orexinas, para evitar problemas neurodegenerativos y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Una aproximación adecuada a un problema de este tipo consiste en el diseño racional de moléculas, el cual puede generar y evaluar una gran cantidad de opciones mediante tamizaje virtual de alto rendimiento, mediante técnicas *in silico*. Para esta investigación se realizó una modelación de la Orexina A y su receptor, disponibles en formato PDB, mediante docking y dinámica molecular, con el fin de obtener la energía de interacción del complejo receptor – ligando. Posteriormente se obtuvieron derivados un nanotubo de carbono modificado para coincidir con la estructura de la orexina, para finalmente comparar la información de interacción entre el nanotubo de carbono con el receptor de la Orexina A. Puede concluirse que la utilización del nanotubo modificado puede ser una aproximación adecuada, pero es necesario modificar algunos residuos de amino ácidos para que el nanotubo modificado funcione como agonista de la Orexina A.

PALABRAS CLAVE

Narcolepsia, Orexinas A y B, Diseño “in silico” de Fármacos, Diana Farmacológica, neuropéptido, barrera hematoencefálica.

INTRODUCCIÓN

La narcolepsia es una enfermedad neurodegenerativa, asociada inclusive con el Parkinson y Alzheimer, que se caracteriza por cambios súbitos en los estado de sueño – vigilia, excesiva somnolencia diurna, así como otras manifestaciones, que pueden incluir cataplejía, alucinaciones.

Se ha observado que la señalización de la orexina, oligopéptido ausente en la enfermedad de la Narcolepsia, probablemente por una reacción inmunológica en los productores de la molécula, está relacionada con la estimulación del consumo de ATP dentro de la célula, por lo que su ausencia, además de los trastornos de sueño mencionados, tiene efecto en el apetito, y a largo plazo, en el estado normal de las neuronas del encéfalo.

Aunque existe evidencia de que el estado anormal no depende del receptor, y por tanto se puede recuperar la función, el tratamiento se ha enfocado únicamente en el tratamiento de los síntomas. Sin embargo, se ha observado que dicha terapéutica únicamente es útil para pacientes que tienen un nivel ligeramente disminuido en la orexina, cuando la mayoría de pacientes presenta una ausencia total de la misma.

Al describir la orexina A, cuyo receptor es mucho más selectivo para dicho ligando, se observa que existen dos hélices alfa que funcionan como esqueleto de la estructura, unidas por un puente disulfuro, así como una cola, que está involucrada en el reconocimiento con el receptor. Debido a que se poseen las estructuras de la orexina A y su receptor de manera tridimensional, es asequible y necesaria la simulación de las mismas, con la finalidad de obtener alternativas que permita recuperar la función perdida, sorteando problemas de administración, sobre todo al tomar en cuenta que una administración que no sea directa en el encéfalo debe sortear la barrera hematoencefálica.

De esta manera, es necesario resolver las siguientes cuestiones: ¿Es posible encontrar un compuesto base, que funcione como agonista de Orexina A? ¿Es posible derivatizarlo “in silico” para que sea más activo que los agonistas existentes? ¿Cómo será la interacción geométrica de los agonistas con el receptor natural de Orexina A? ¿Cuál será la energía de interacción entre el agonista generado “in silico” y el receptor de Orexina A? ¿Cuáles serán los principales farmacóforos de la molécula que interactúan con el neuropéptido?

¿Es plausible utilizar un vehículo farmacéutico para el agonista generado, de manera de facilitar su acceso a los receptores (La Regla de Lipinski)?

La respuesta a estas preguntas se obtendría mediante el alcance de los siguientes objetivos:

- a) Proponer derivados que puedan suplir la función de las Orexinas, a través de un algoritmo evolutivo, por el sitio de enlace.
- b) Encontrar la estructura óptima de las Orexinas A y B, así como sus receptores en un medio acuoso explícito.
- c) Realizar la alineación y el docking de los ligandos en el sitio activo de Orexina A y B.
- d) Encontrar la energía de interacción del ligando y el receptor por métodos de Docking y de cálculo energético por métodos de mecánica molecular y mecánica cuántica.
- e) Obtener de las propiedades termodinámicas absolutas de los ligandos y los receptores.
- f) Obtener de las relaciones QSAR–ADME para los ligandos y los derivados propuestos.
- g) Examinar la posibilidad de utilizar un vehículo para medicamentos con ADME desfavorable.

MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.

Narcolepsia

La Narcolepsia es una enfermedad neurológica avanzada caracterizada por una excesiva somnolencia diurna, transiciones prematuras de vigilia al sueño de movimientos oculares rápidos (REM) y interrupciones de las mismas, cataplejía, alucinaciones hipnagógicas o hipnopómpicas y sueño nocturno fragmentado; es clasificada como un trastorno del sueño.

Posee una prevalencia de una persona entre dos mil, sin embargo, suele ser poco diagnosticada, al menos en sus formas leves, debido a ser una enfermedad de bajo perfil.

Existe cierta evidencia que los neurotransmisores involucrados, los neuropéptidos Orexinas A y B, (OXA y OXB) están relacionados a largo plazo en trastornos que involucran degeneración crónica del sistema nervioso central, tales como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer dado que la función involucra la estimulación del consumo de ATP a nivel celular, por lo que la pérdida del neurotransmisor o su función involucraría tanto trastornos del sueño y del apetito.

El Estado del Arte en su relación con la enfermedad, indica que concentraciones de OXA menores de 100 pg/mL ya son capaces de originar Narcolepsia. En estudios realizados en cerebros de pacientes narcolépticos, se demostró la ausencia de neuronas con ARNm de Orexinas en el hipotálamo, así como una disminución de la inmunoreactividad en la misma región hipotalámica de 4 cerebros de pacientes. (Carrion, 2009).

Las neuronas encargadas de la producción de Orexinas se encuentran localizadas en el hipotálamo lateral y proyectan sus axones a numerosas regiones del sistema nervioso central donde se localizan los principales núcleos implicados en la regulación del sueño, especialmente el *locus cerelus* (LC), claves en la regulación de los estados de atención. (Valencia, Cassiani, Cardona & Villalobos, 2010).

Estudios *in vivo* en humanos, demostraron que pacientes que sufren narcolepsia deben este estado a una pérdida de estas células generadoras de los neurotransmisores, debido muy posiblemente a una respuesta del sistema inmunológico, esto es, el desarrollo de una

respuesta autoinmune, a diferencia de otros organismos en los que la pérdida de la función se debe a un problema con el receptor.

Terapéutica relacionada.

Los médicos usualmente tratan el insomnio utilizando agonistas a los receptores de benzodiazepinas, los cuales son moduladores alostéricos de señalamiento del GABA (Ácido Gama-aminobutírico). También se suelen utilizar antidepresivos, ya que estos son menos propensos a causar tolerancia y dependencia (Nischino, 2007).

Sin embargo, ninguno de estos fármacos está dirigido contra las orexinas o sus receptores. En la última década se han desarrollado bastantes fármacos antagonistas a las Orexinas, con los cuales se busca mejorar el sueño de los pacientes (Cai, Cooke, & Sherborne, 2006; Coleman, & Renger, 2010). Sin embargo, estos son de utilidad solamente en pacientes con niveles ligeramente disminuidos de Orexinas, con el problema de que la mayoría de los pacientes que padecen de Narcolepsia presentan niveles bajos o inexistentes de Orexinas en su sistema.

Es por ello que el desarrollo de agonistas de las Orexinas se inicia recientemente. Se ha sugerido que el desarrollo de un agonista que active selectivamente al receptor OX2R (receptor de Orexina B) podría promover el estado de alerta diurna sin ser extremadamente adictivo (Scammell, & Winrow, 2011).

Terapéutica de la Narcolepsia.

La terapéutica actual de la enfermedad se enfoca en la regulación de los procesos de sueño que tienen relación con el sistema límbico e hipotalámico. De esta manera se utilizan estimulantes del sistema nervioso central (Modafinil) e inhibidores de la serotonina (Rinsaterin) para el tratamiento del sueño diurno.

La utilización del oxibato de sodio (neurotransmisor, derivado de la sal sódica del Ácido Gamahidroxibutírico) ha sido recomendada por la Academia Americana de Medicina del Sueño, puesto que permite el tratamiento de todos los síntomas.

Estructura de las orexinas A y B

Ambos péptidos derivan de un precursor común de 131 aminoácidos, llamado prepro-orexina. El gen localizado en el cromosoma 17Q21 en los humanos es el encargado de codificar este péptido. El mRNA de la prepro-orexina consiste de dos exones y un intrón, distribuidos en 1432 pb. Los 143 pb del exón 1 incluyen una región no traducida 5' y la región que codifica los 7 primeros residuos es la secuencia señal secretora. El exón 2 contiene la porción restante del marco de lectura y la región no traducida 3'. Ambas Orexinas son modificadas post-traducción, siendo la OX-A piroglutamil ciclada en el aminoácido N-terminal y amidada en el aminoácido C terminal. La OX-B solamente está aminada en el aminoácido C terminal (Sakutai, *et al.*, 1998; Lee, Bang, Chae, Kim, Lee, & Lee, 1999).

Estructura primaria orexina A

La OX-A es un péptido de 33 aminoácidos cuya secuencia se encuentra totalmente conservada entre ratas, humanos, cerdos y vacas. Las principales características estructurales de la OX-A humana son dos hélices α que abarcan los residuos C14-H21 (hélice 1) y N25-L31 (hélice 2) en solución, siendo la hélice 1 más compacta que la hélice 2. Ambas hélices están conectadas por un bucle flexible. La estructura contiene dos enlaces disulfuro entre los residuos C56-C12 y C12-C14 en el N terminal. Estos enlaces provocan una conformación rígida entre los residuos R8-T1. Esta proteína contiene un bucle formado por los residuos RQKT, el cual está relacionado con su afinidad por los receptores de orexina 1 (OX-1) (Kim, Hong, Kim, & Lee, 2004).

Estructura primaria orexina B

La OX-B es un péptido de 28 aminoácidos que comparte homología con la OX-A en un 46%. Este péptido difiere solamente por dos aminoácidos al comparar sus secuencias en humanos y ratones; la secuencia porcina posee una substitución de un residuo de Serina por Prolina

Estructura de los receptores de las orexinas A y B

Actualmente se conocen dos receptores que son estimulados por las Orexinas, los receptores OX-1 y OX-2. Ambos forman parte de una subclase, bajo la clase A, de Proteínas G acopladas al receptor. Se encuentran predominantemente localizados en el hipotálamo y el *locus coeruleus*, aunque han sido encontrados en otras partes del Sistema Nervioso Central (Trivedi, Yu, MacNeil, Van der Ploeg, & Guan, 1998; Lu, Bagnol, Burke, Akil, & Watson, 2000; Del Cid-Pellitero & Garzon, M. 2011).

Cada receptor de las orexinas consiste en una cadena polipeptídica sencilla que posee siete regiones transmembrana, con un N-terminal extracelular y un C-terminal intracelular. Los extremos amino contienen sitios consensuados para la glicosilación ligada a átomos de Nitrógeno y Oxígeno y los extremos carboxilo tienen posibles sitios de palmitoilación ligadas a Azufre.

Los bucles extracelulares contienen residuos de Cisteína, posiblemente creando puentes disulfuro y un segundo bucle intracelular contiene una secuencia de aminoácidos “DRW” en vez de la secuencia “DRY” (Kukkonen, 2008).

Como receptores acoplados a la Proteína G, la activación de los Receptores de Orexina catalizan el cambio GTP/GDP en Proteínas G heterotriméricas con una subsecuente transducción de la señal por las sub-unidades $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$.

Estructura primaria del receptor de orexina 1

El OX-1 se encuentra codificado en el cromosoma 1, es una cadena polipeptídica de 425 aminoácidos.

Los receptores de Orexinas tienen siete dominios transmembrana (TM1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) en forma de hélices, cuatro dominios extracelulares y cuatro dominios intracelulares. En diversos estudios se ha encontrado que la región TM3 es la que posee mayor importancia en el desarrollo de antagonistas de las Orexinas (Malherbe, Roche, Marcuz, Kratzeisen, Wettstein, & Bissantz, 2010).

Se ha observado que residuos de la región TM3 interactúan con otros residuos de las regiones TM2 y TM7 creando una unión fuerte entre estas regiones, fenómeno que no se observa en el OX2.

La conformación de TM3 permite la formación de un pequeño hueco entre TM3, 4 y 5, con el residuo A127 localizado en una posición de “portero”. Dentro del hueco puede encontrarse los residuos Y215, F219 y Y224 los cuales son de importancia para la unión de antagonistas. (Heifetz, Morris, Biggin, Barker, Fryatt, Bentley, 2012)

Estructura primaria del receptor de orexina 2

El OX-2 se encuentra codificado en el cromosoma 6, es una cadena polipeptídica de 444 aminoácidos.

Al igual que la OX-1 esta posee siete dominios transmembrana (TM1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) en forma de hélices, cuatro dominios extracelulares y cuatro dominios intracelulares. Al igual que el OX1 la región TM3 es la que posee mayor importancia en el desarrollo de antagonistas de las orexinas (Malherbe, *et al.*, 2010).

Diseño Racional de Fármacos.

El desarrollo de una droga puede ser considerado como una carrera de obstáculos, en cuanto deber superar varias barreras desde que sea evaluada como potencial fármaco hasta que pueda ser comercial.

Debido a que la inversión de recursos en la fabricación de un nuevo medicamento, tanto en tiempo como en inversión de recursos físicos es alta y onerosa, se hace necesario el reducir aquellas moléculas que no sean biológicamente activas, o aquellas que no tengan el efecto deseado.

Con esto en mente, en las últimas décadas el desarrollo de fármacos nuevos ha sido fuertemente influenciado por la posibilidad de utilizar métodos computacionales, generando el así llamado “diseño racional” y el diseño asistido por computadoras –diseño “in silico”-.

Existen varias razones que justifican este éxito, primero el reconocimiento molecular puede ser definido como la habilidad de las biomoléculas de distinguir selectivamente e interactuar en orden de promover eventos biológicos (como transporte y regulación de funciones metabólicas).

La disponibilidad de información estructural acerca de la interacción entre los compuestos es otro motivo a ser tomado en cuenta para entender el éxito del método teórico de diseño de fármacos.

En efecto, la existencia de bases de datos con la estructura cristalográfica de ligandos, receptores y aún más, del complejo formado, permiten que se puedan utilizar métodos teóricos, a través de cálculos computacionales, para modelar las interacciones entre estos.

Para desarrollar fármacos, “basados en estructura”, existen dos aproximaciones normalmente usadas.

En el primer caso, el espacio que queda disponible por el receptor se utiliza para encontrar un ligando que sea adecuado, tanto en forma y tamaño, como en interacciones con el hospedero.

Por otro lado, cuando se basa en el ligando se realizan una serie de cambios a la estructura activa base y se busca una molécula con estructura similar. Existe también la aproximación conjunta, en la cual se utilizan ambas formas de trabajar, siempre que se posean tanto las estructuras del ligando como del receptor.

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, ciencia donde se aplica el diseño a nivel molecular, 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. Cachau *et al.* 2007).

El diseño de drogas a nanoescala 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 *et al.* 2008). Inhibidores de la Topoisomerasa 1 se han diseñado logrando síntesis efectivas posteriores de fenantriones modificados, gracias a estas técnicas computacionales. (Lee *et al.* 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, 2006). Un farmacóforo representa una función química, que es válida para cualquier molécula que la posea y para la actividad biológica específica. (Vogel, *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, *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.

Es posible definir una “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, 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, *et al.* 1997).

MATERIAL Y MÉTODOS

Debido a que es un desarrollo teórico de una molécula nueva solamente es necesario utilizar sistemas de cómputo. En este caso el Clúster de cálculo de la Unidad de Química Teórica y Computacional que se encuentra en el tercer nivel del edificio T-10 de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, Ciudad Universitaria, zona 12. Guatemala, Guatemala. 14°36'03.55" Norte y 99°33'45.40" Oeste, a 1517 MSNM.

Se trata de una investigación de tipo experimental, de modo descriptivo.

La secuencia de una secuencia canónica fue el primer paso para la determinación de una estructura óptima sobre la cual se diseña el derivado de la Orexina.

Obtenida la secuencia canónica se genera un archivo .pdb de la proteína, para luego obtener una imagen tridimensional del compuesto.

a. Obtención de conformación del ligando

Optimización de Geometría a través de algoritmos de minimización de energía en campos de fuerzas MMFF94, en Avogadro.

Optimización hiper fina de la geometría a través de métodos de segunda derivada de minimización de energía: cálculos *ab initio* utilizando RHF 6-31g++. (Usar cálculos obtenidos con método semiempírico AM1) en Firefly utilizando Avogadro como interfaz gráfica y preparador de archivo de entrada.

Detalles de minimización (información del Self Consistent Field): Función de onda R-Closed Shell, SCF máximas: 100. Número máximo de pasos: 100. Convergencia: 0.001 Hartree/Bohr. Temperaturas: 298.15 y 310.15 °K, suponiendo Hükel. Simetría C1.

Cálculo de cargas a nivel hiper fino: Cargas de Mülliken cálculos *ab initio* utilizando RHF 6-31g++. (Usar cálculos obtenidos con método semiempírico AM1) en Firefly utilizando Avogadro como interfaz gráfica y preparador de archivo de entrada.

Análisis Termodinámico de la Orexina a través de un cálculo de frecuencias.

b. Obtención de la descripción farmacóforica de las Orexinas (A y B).

Utilizar relaciones QSAR–ADME basadas en CoMSIA de SYBYL (TRYPOS).

Hidrofobicidad.

Aromaticidad.

Aceptores/donadores de Puentes de Hidrógeno.

Potencial Electroquímico y Estérico (CoMFA)

Logaritmo de partición octanol/agua

Coefficiente de Refractividad.

Todos los resultados deben ser almacenados en formato .mol2 (de Sybyl).

c. Configuración en Solución

Solvatación de OX-A, OX-B, OX-1 y OX-2 utilizando Molecular Silverware Algoritm, parametrizado como Box, con una iteración por capa.

Minimización de energía en Sybyl de la configuración obtenida utilizando un campo de fuerza MM3.

Extracción “in silico” de la molécula para aislarla del solvente.

Realizar una alineación con Sybyl

d. Proceso de Enlace

Docking entre Orexina A y OX-1, Orexina B y OX-2. Utilizando el programa Autodock 4.01.

Características del Docking:

Algoritmo Lamarckiano.

Tamaño de población: 300 individuos.

Número máximo de evaluaciones. 2.5 millones.

Número máximo de generaciones: 27,000.

Número máximo de individuos sobrevivientes por corrida: 1.

Número de generaciones que se escoge al peor individuo: 10.

e. Medición de las Energías de Enlace:

i. Algoritmos de docking

Utilizar el programa APBS (Adaptative Poisson–Boltzmann Solver v. 0.5.1 para calcular la energía de enlace de cada molécula candidata usando como parámetros del modelo:

Vpvector: “Using max ion radius (2 Angstroms) for exclusion function”.

Debye length: 30.425 Angstroms.

Current memory usage: 62.004 MB total, 62.004 MB high water.

Grid dimension: 65*65*65.

Grid spacing: 1.593*1.825*1.758

Grid lengths: 101.970*116.792*112.494

Multigrid levels: 5

f. Diseño de Derivados:

Utilizando el software RACHEL de SYBYL se mantiene sin alteración la sección que interactúa directamente con el residuo del receptor que es persistente entre los distintos

receptores entre especies.

Cada derivado debe ser sometido al procedimiento descrito en esta metodología en los puntos del **a** al **f**. Las series deben correr hasta encontrar el punto máximo de convergencia o llegar a un punto de escasas moléculas exitosas.

Muestreo: al tratarse de una simulación computacional, los criterios de muestreo no aplican, puesto que los algoritmos computacionales que resuelven los modelos matemáticos, describen el problema de manera en que la incertidumbre de los cálculos no hacen referencia al muestreo, sino a la metodología de solución del modelo, por lo que es intrínseco al cálculo.

Operacionalización de las variables

Tipo de Variable	Dimensional	Forma de análisis
Constante de inhibición	mM	Debe ser menor a la velocidad de difusión del ligando
Energía libre de enlace	KJ/mol	Debe ser negativa
Relación estérica – electrostática	Adimensional	Debe ser cercana a 1
Relación H dadores y aceptores	Adimensional	Debe ser cercana a 2
Logaritmo partición octanol - agua	Adimensional	Debe ser cercana a 5

RESULTADOS

Matriz de Resultados

Objetivo Específico	Resultado Esperado	Resultado Obtenido
Proponer derivados que puedan suplir la función de la Orexina, a través de un algoritmo evolutivo, por el sitio de enlace.	Obtención de moléculas con propiedades farmacofóricas adecuadas	Estructura modificada de dos nanotubos de carbono de dimensión y quiralidad conocida, con secciones de amino ácidos.
Encontrar la estructura óptima de las Orexinas A y B, así como sus receptores en medio acuoso explícito.	Estructura optimizada de la orexina y el receptor en medio acuoso.	Dinámicas moleculares con indicación explícita de los átomos de receptor y ligando en medio acuoso explícito.
Realizar la alineación y el docking de los ligandos en el sitio activo de la Orexina A y B.	Estructura del complejo ligando – receptor.	Posicionamiento del ligando con respecto al receptor. En cuanto a este punto, aún hace falta validación experimental.
Encontrar la energía de interacción del ligando y el receptor por métodos de Docking y de cálculo energético por métodos de mecánica molecular y mecánica cuántica.	Energía de Interacción de los complejos ligando – receptor.	Energía de Interacción de los complejos ligando – receptor.

<p>Obtener las propiedades termodinámicas absolutas de los ligandos y los receptores.</p>	<p>Obtención de funciones termodinámicas y funciones de partición de los ligandos y receptores</p>	<p>Este parámetro no se evaluó, puesto que finalmente no es trascendente para la interpretación de los demás resultados, ni existe parámetro de comparación empírico.</p>
<p>Obtener las relaciones QSAR – ADME para los ligandos y los derivados propuestos.</p>	<p>Hidrofobicidad, aceptores/donadores de puentes de hidrógeno, CoMFA, log P octanol/agua, Cf de Refracción</p>	<p>Descripción de Estructura – Actividad comparada entre la orexina y los nanotubos de carbono modificados con respecto a las condiciones de biodisponibilidad y toxicidad.</p>
<p>Examinar la posibilidad de utilizar un vehículo para medicamentos con ADME desfavorable.</p>	<p>Moléculas candidatas a vehículos del medicamento.</p>	<p>Este parámetro no fue evaluado, puesto que el nanotubo puede</p>

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El desarrollo de moléculas nuevas por medio de técnicas de tamizado molecular virtual presenta múltiples retos, desde un punto de vista metodológico, primeramente por la necesidad de técnicas adecuadas de manejo de información (debido a la gran cantidad de datos que se generan), y luego, por la contrastación de estos resultados a la realidad.

Este último punto presenta así mismo, diversas aristas. Por un lado, la interpretación adecuada de los resultados obtenidos de manera intuitiva, o con sentido químico – farmacológico no suele ser inmediata. Por otro lado, la mejor manera de utilizar la información intuitiva que pudiera surgir, debe finalmente ser contrastada para poder tener una mayor validez.

Para conseguir todo lo anterior, se presentarán a continuación la información desde una perspectiva intuitiva, conectando con los resultados obtenidos, para tener una mayor claridad.

La interacción ligando – receptor es un fenómeno biológico dinámico, en el cual una molécula con funciones normalmente relacionadas con una actividad fisiológica, sea esta realizada por la misma molécula, o utilizada como señalizador, interactúa con un receptor en un tejido diana, provocando la actividad querida.

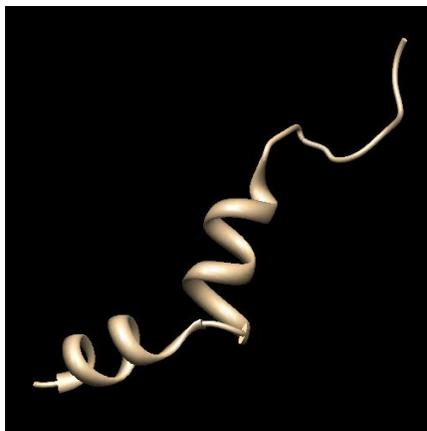
Los modelos bioquímicos iniciales conceptualizaron esta interacción como de tipo llave – cerradura, sin embargo, este paradigma se queda realmente corto, puesto que se excluye a las interacciones intermoleculares, una descripción de los procesos a temperatura corporal, y la interacción que tienen las moléculas involucrados con el solvente.

La descripción computacional de toda esta información suele también presentar una dificultad ulterior, consistente en la elección de un modelo matemático adecuado que pueda representar adecuadamente los fenómenos.

Cuando se utilizan estructuras digitales de las moléculas, que suelen estar en bases de datos, estas han surgido de experimentos principalmente de Difracción de Rayos X o Resonancia Magnética Nuclear. La estructura obtenida entonces, presenta la inconveniencia de que ha sido capturada en un entorno forzado por el experimento, y por tanto, puede variar con respecto a su comportamiento en el organismo.

Las secciones relacionadas con la minimización de energía, del objetivo específico número 2 (o b) han sido realizadas para obtener finalmente la estructura que biológicamente presentan el receptor OX – 1 y la Orexina A, evaluando a la molécula de manera aislada, como punto de partida. De esta manera, se ha podido representar adecuadamente las estructuras optimizadas, como se muestra en las figuras 1 y 2.

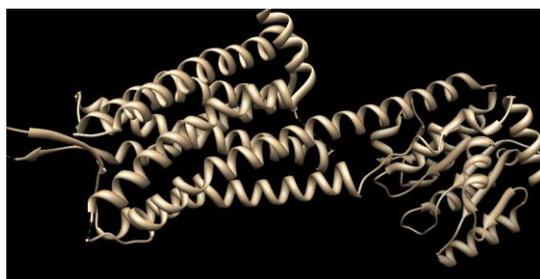
Figura 1: Estructura optimizada de la Orexina A



Fuente: Cálculo de Minimización de Energía, realizado en la Unidad de Química Computacional, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

En las representaciones de interfaz gráfica puede observarse claramente las características principales del neuropéptido Orexina A descritas en la literatura: Dos hélices alfa (secciones similares a un resorte), conectadas con un bucle flexible. La sección superior visualizada se ha propuesto que es la que tiene la función directa de señalización.

Figura 2: Vista lateral del receptor OX -1



Fuente: Cálculo de Minimización de Energía, realizado en la Unidad de Química Computacional, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Figura 2: Vista frontal del receptor OX -1

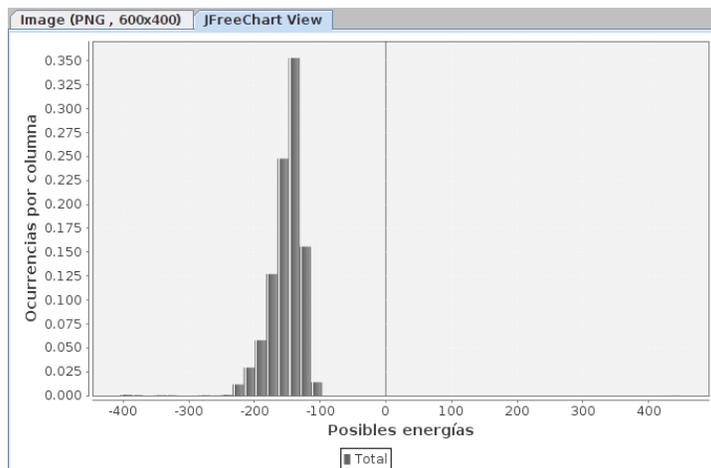


Fuente: Cálculo de Minimización de Energía, realizado en la Unidad de Química Computacional, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

En la vista frontal del receptor de Orexina A se observa claramente un canal, el cual interactúa con la orexina A, y permite la señalización intramembrana (en el extremo posterior del receptor, que no se visualiza en la vista frontal, pero sí en la lateral).

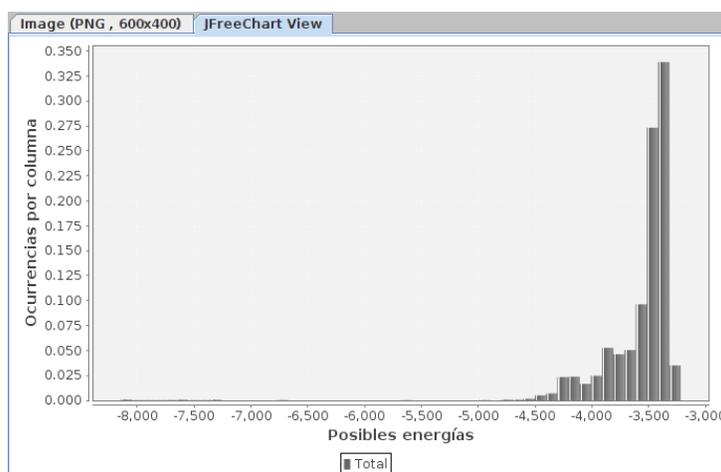
Posterior a la revisión estructural aislada, es necesario reproducir el comportamiento fisiológico, tanto del receptor, como del ligando. Esto se realizó mediante Dinámica molecular, en la cual se obtiene un comportamiento que obedece a dinámica newtoniana, y se calcula computacionalmente los estados que tendrá *a posteriori* la molécula en agua (por ser el solvente fisiológico), a una temperatura también fisiológica (310 K). De esto, se obtiene una distribución de frecuencias, que proporcionan un comportamiento estadístico de la probabilidad de encontrar diferentes conformaciones de las moléculas.

Figura 4: Distribución energética de la Orexina A



Fuente: Cálculo de Dinámica Molecular, realizado en la Unidad de Química Computacional, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

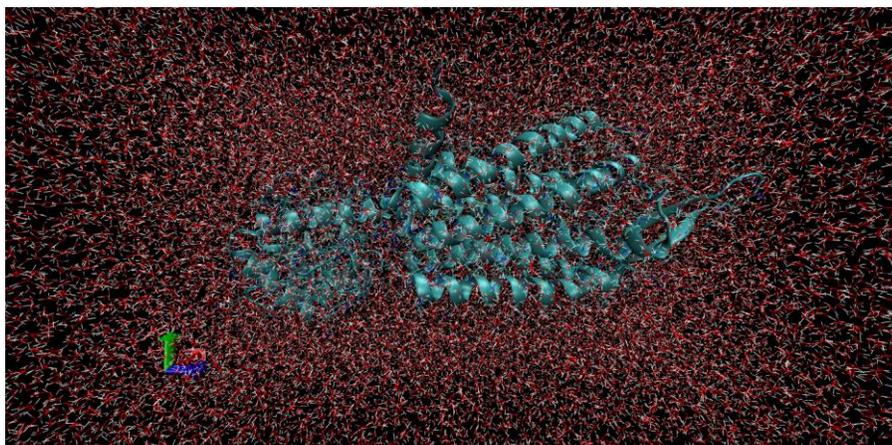
Figura 5: Distribución energética del receptor OX - 1



Fuente: Cálculo de Dinámica Molecular, realizado en la Unidad de Química Computacional, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

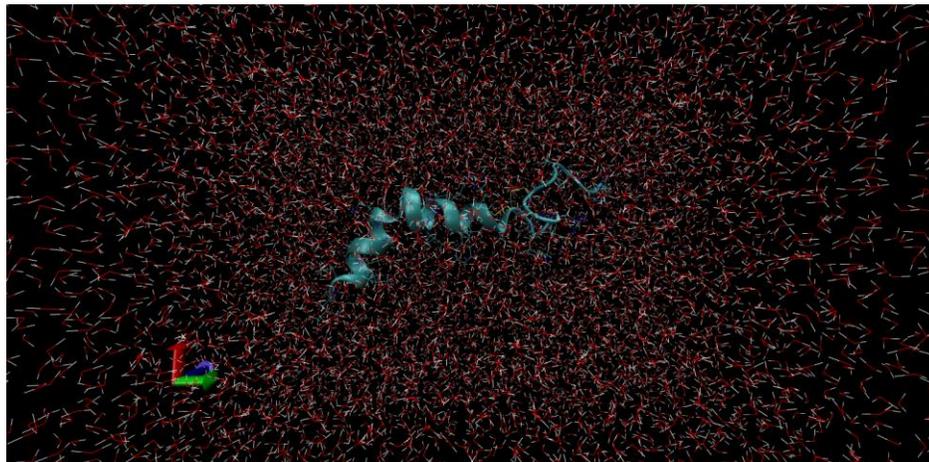
Se observa que los comportamientos energéticos de las macromoléculas en los solventes presentan un comportamiento similar al Gaussiano, aunque ligeramente sesgado. Esto se debe a que el análisis de datos aquí representado tiene ciertas etapas, en las cuales el muestreo energético denota estados “estacionarios” antes de alcanzar la estructura que minimiza la energía en medio acuoso (representada por el conjunto de conformaciones de mayor energía) correspondientes a -3400 J/mol para el receptor de OX – 1, y -150 J/mol para la Orexina A. Se coloca a continuación una representación gráfica de un ejemplo de estas estructuras.

Figura 6: Conformación de ejemplo de la estructura del receptor OX – 1 en “condiciones corporales”



Fuente: Cálculo de Dinámica Molecular, realizado en la Unidad de Química Computacional, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

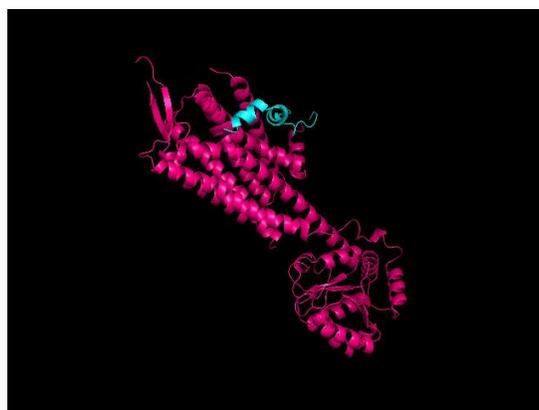
Figura 7: Conformación de ejemplo de la estructura de la orexina A en “condiciones corporales”



Fuente: Cálculo de Dinámica Molecular, realizado en la Unidad de Química Computacional, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

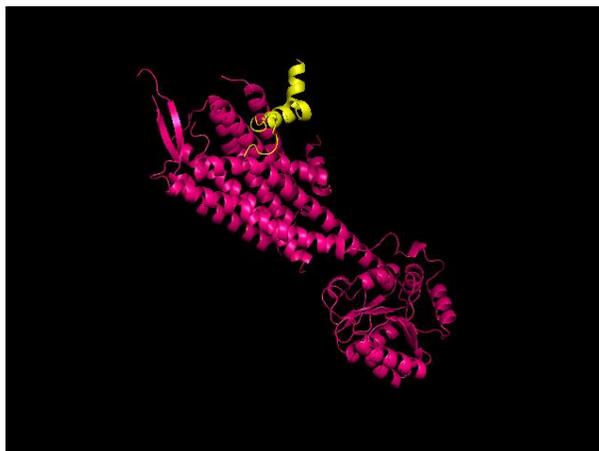
Al obtener las estructuras del receptor y el ligando en condiciones simuladas a las del cuerpo, se puede obtener información de la energía de interacción mediante un Docking adecuado. Esta información servirá posteriormente para diseñar una estructura que tenga el mismo comportamiento que la Orexina A, pero que sea posible administrar como fármaco. Dos estructuras representativas se colocan a continuación. Este proceso aún se encuentra en desarrollo, y es necesario encontrar aún el mejor Docking de las moléculas.

Figura 8: Docking de la Orexina A y el receptor OX -1



Fuente: Cálculo de Docking, realizado en la Unidad de Química Computacional, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Figura 8: Docking de la Orexina A y el receptor OX -1



Fuente: Cálculo de Docking, realizado en la Unidad de Química Computacional, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Una vez alcanzado este punto, la investigación ha permitido proponer como plantilla para realizar derivados dos nanotubos de carbono, unidos por un esqueleto carbonado para revisar su posterior interacción con el receptor OX – 1, y obtener de esta manera Energías de Gibbs y Constantes de Formación de valores similares a los que se obtienen de la interacción con la Orexina A, con las siguientes características.

TABLA 1. PARÁMETROS DE NANOTUBOS DE CARBONO

Nanotubo/Parámetro	Longitud/ A	Índice de quiralidad	Ángulo de quiralidad
Nanotubo 1: Hélice alfa 1	10	n=4 m=2	19.1
Nanotubo 2: Hélice alfa 2	11.4	n=4 m=2	19.1

Fuente: Cálculo de propiedades moleculares realizado en la Unidad de Química Computacional, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

DESCRIPTORES - PARÁMETROS DE FF

TABLA 2. DESCRIPTORES TOPOLÓGICOS PARA QSAR-1D.

	Átomos	Enlaces	Ángulos	Diedros	Impropios
Orexina-A	494	500	907	1328	93
Nueva Molécula	525	576	1088	1784	37

El número de átomos es mayor en el ligando diseñado que en la orexina. Esto es de esperarse, puesto que la estructura de los nanotubos de carbono que reemplazan a las hélices alfa contiene más átomos que las anteriores. Por la misma razón la cantidad de enlaces, ángulos y diedros es también mayor en el caso del nuevo ligando. En el caso de las interacciones impropias, estas resultaron menores en el caso del nanotubo puesto que la estructura de los mismos es más rígida y permite un mucho menor movimiento de un carbono terciario dentro de una red aromática. La cantidad de átomos aromáticos es, por lo mismo, mayor en el caso del ligando que en el de la orexina, mientras que la cantidad de átomos alifáticos resulta inversa.

TABLA 3. DESCRIPTORES ATÓMICOS PARA QSAR-1D.

	Átomos		
	Aromáticos	Alifáticos	Quirales
Orexina-A	16	478	33
Nueva Molécula	70	455	49

Una cuestión estructural a considerar es que en el caso del ligando, la cantidad de centros quirales es mayor a la de la orexina. Esto no se esperaba, puesto que la orexina se compone de aminoácidos que ya poseen centros quirales, mientras que los nanotubos son simétricos. Sin embargo, muchos carbonos de las aristas y aquellos que resultaron funcionalizados le dieron a esta nueva estructura una mayor cantidad de centros quirales, haciéndola más específica en su interacción con el receptor, aunque mucho más difícil de sintetizar.

TABLA 4. DESCRIPTORES FÍSICOS PARA QSAR-1D.

	Área Superficial / Å^2		Peso / uma
	Molecular	Accesible a solvente	
Orexina-A	3606.75	3930.705	3582.1434
Nueva Molécula	3737.136	4083.944	4073.5766

El área superficial del nanotubo de carbono es mayor a la de la orexina. También lo es el área accesible a solventes. Considerando que un aumento en el área lleva a mayores interacciones por parte de esta molécula con el medio es posible indicar de que las fuerzas electrostáticas y de Lennard-Jones son mayores con este ligando, facilitando así que se acoplara al receptor.

Finalmente, el peso molecular del nuevo ligando fue mayor al de la orexina. Se puede asumir que esta nueva molécula es más densa que la orexina, puesto que su peso molecular es mayor, pero el volumen de ambas es casi idéntico.

SIMILITUD Y CRITERIOS DE BIODISPONIBILIDAD

TABLA 5. DESCRIPTORES POR "FINGERPRINT" PARA QSAR-2D.

Fingerprints (parte 1)											
Indigo			Morgan (ECFP modificado)			RDKit (Daylight modificado)			Avalon		
Tanimoto	EuclidSub	Tversky	Tanimoto	EuclidSub	Tversky	Tanimoto	EuclidSub	Tversky	Tanimoto	EuclidSub	Tversky
0.432	0.723	0.604	0.114	0.288	0.205	1	1	1	0.443	0.9	0.6

TABLA 6. DESCRIPTORES POR "FINGERPRINT" PARA QSAR-2D.

Fingerprints (parte 2)								
MACCS			Patrones			Por Capas		
Tanimoto	EuclidSub	Tversky	Tanimoto	EuclidSub	Tversky	Tanimoto	EuclidSub	Tversky
0.867	0.977	0.929	1	1	1	0.698	0.991	0.822

INDIGO

Similitud por enlaces es más baja, debido a que un caso es una red protéica y el otro es una red aromática.

MORGAN

Toma en cuenta similitud por segmentos de la molécula dado un radio. Este pudo haber salido muy bajo debido a tanto átomo aromático que se hallaba en los nanotubos.

RDKIT

Estudia las subestructuras. En el caso del nanotubo, muchas de las subestructuras son grupos R de aminoácidos. Esto explica por qué es que estas estructuras presentan tanta similitud.

AVALON

Toma en cuenta muchos otros descriptores como el número de átomos, el tipo, etc. Los resultados en este caso dependen mucho más de la métrica, sin embargo se muestra que una alta similitud, probablemente porque las dos moléculas se parecen; lo único que cambia son algunos aspectos químicos.

DOCKING

TABLA 7. ENERGÍAS DE LAS 10 MEJORES INTERACCIONES ENTRE LA MOLÉCULA Y EL RECEPTOR EN AUTODOCK 4.

	AutoDock 4									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Orexina-A	23.25	23.47	23.67	23.95	24.2	26.38	26.57	28.22	29.44	55.95
Nueva Molécula	9.83	10.92	12.05	13.66	13.82	13.94	14.23	16.3	17.08	29.52

TABLA 8. ENERGÍAS DE LAS 10 MEJORES INTERACCIONES ENTRE LA MOLÉCULA Y EL RECEPTOR EN ZDOCK.

	ZDOCK									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Orexina-A	1558.096	1556.786	1550.814	1504.835	1476.465	1470.646	1460.977	1431.001	1425.917	1406.7
Nueva Molécula	1604.896	1582.742	1562.799	1513.357	1511.723	1508.739	1487.835	1486.696	1476.454	1475

Tanto al utilizar Autodock como ZDOCK, el nanotubo mostró una afinidad mayor al receptor. La tendencia sugiere que estos resultados son válidos y que el nuevo ligando es más afín al receptor. Es importante notar que el campo de fuerzas utilizado por ZDOCK es mucho más rudimentario que el de AutoDock 4, y sin embargo, la tendencia que presentan ambos programas es clara. Esto se debió probablemente a la gran superficie del ligando y así mismo la mayor posibilidad de interacciones, sobre todo, al tomar en cuenta los centros quirales.

IMPACTO ESPERADO

La presente investigación permitió demostrar, a nivel puramente científico, que es posible desarrollar una nanomolécula (en este caso, un nanotubo de carbono) modificada para que se comporte de manera similar a un oligopéptido, de manera que se abre la posibilidad de diseño terapéutico mediante esta técnica. Este resultado es altamente sujeto a publicación.

Por otro lado, el diseño *de novo* de la molécula es una opción adecuada para la terapéutica específica de la narcolepsia en humanos, que debe ser sintetizada y evaluada para las posteriores fases clínicas.

CONCLUSIONES

1. Se logró reproducir la interacción entre el receptor de la orexina A con su receptor en medio acuoso explícito.
2. Se obtuvo la descripción energética del receptor, el ligando y el complejo formado entre la Orexina A y su receptor.
3. Se logró diseñar un derivado de la Orexina A, utilizando como plantilla un nanotubo de carbono.
4. Se obtuvieron los parámetros del nanotubo de carbono modificado, con interacciones similares a la de la Orexina A, con su receptor.
5. Se describieron las propiedades de biodisponibilidad teóricas del nanotubo de carbono modificado, observándose una mayor especificidad del nanotubo de carbono.

REFERENCIAS

- Adeghate, E.** (2012). Orexins: tissue localization, functions, and its relation to insulin secretion and diabetes mellitus. *Vitamins & Hormones*, 89, 111-133.
- Álvarez, E.** (2008). Avances en el diagnóstico y tratamiento síndrome de narcolepsia-cataplejía. *Clinical Journal of Health*, 2, 5-11.
- Bengtsson, W., Makela, K., Sjoblom, M., Uotila, S., Akerman, K., Herzig, K., & Flemstrom, G.** (2007). Food induced expression of orexin-receptors in rat duodenal mucosa regulates the bicarbonate secretory response to orexin-A. *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293, G501–G509.
- Cai, J., Cooke, F. & Sherborne, B.** (2006). Antagonists of the orexin receptors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16(5), 631-646.
- Carrion A.** (2009). Sistema hipocretinérgico y narcolepsia. *Revista de Medicina de Chile*, 137, 1209-1216.
- Cavas M., Navarro F.** (2002). Papel del sistema de la hipocretina/orexina en la regulación del sueño. *Psiquiatría Biológica*, 9 (2), 83-87.
- 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.
- 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.
- Del Cid-Pellitero, E., & Garzon, M.** (2011) Hypocretin1/OrexinA-containing axons innervate locus coeruleus neurons that project to the Rat medial prefrontal cortex. Implication in the sleep-wakefulness cycle and cortical activation. *Synapse*, 65, 843-857.
- Dun, N., Dun, S., Chen, C., Hwang, L., Kwok, E., & Chang, J.** (2000). Orexins: a role in medullary sympathetic outflow. *International Regulatory Peptide Society*, 96, 65-70.

- Edwards, C.**, Abusnana, S., Sunter, D., Murphy, K., Ghatei, M., & Bloom S. (1999). The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *Journal of Endocrinology*, *160*, R7-R12.
- Hagan, J.**, Leslie, R., Evans, M., Wattam, T., Holmes, S., et al. (1999). Orexin A activates locus ceruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*, 10911-10916.
- Heifetz, A.**, Morris, G. B., Biggin, P. C., Barker, O., Fryatt, T., Bentley, J., Hallett, D.; Manikowski, D.; Pal, S.; Reifegerste, R.; Slack, M.; Law, R. (2012). Study of Human Orexin 1 and 2 GPCR Receptors, their Novel and Published Antagonists by Modelling, Molecular Dynamic Simulations and Site Directed Mutagenesis. *Biochemistry*, *51* (15), 3178-3197.
- Heinonen, M.**, Purhonen, A., Mäkelä, K., & Herzig, K. (2008). Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiology*, *192*, 471-485.
- Kim, H.**, Hong, E., Kim, J., & Lee, W. (2004). Solution Structure of Human Orexin-A: Regulator of Appetite and Wakefulness. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, *37*(5), 565-573.
- 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.
- Lee, J.**, Bang, E., Chae, K., & Kim, J. (1999). Solution structure of a new hypothalamic neuropeptide, human hypocretin-2/orexin-B. *European Journal of Biochemistry*, *266*, 831-839.
- Lu, X.-Y.**, Bagnol, D., Burke, S., Akil, H., & Watson, S. J. (2000). Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Hormones and Behavior*, *37*, 335-344
- 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.

- Malherbe, P.**, Roche, O., Marcuz, A., Kratzeisen, C., Wettstein, J. G., & Bissantz, C. (2010) Mapping the binding pocket of dual antagonist almorexant to human orexin 1 and orexin 2 receptors: comparison with the selective OX1 antagonist SB-674042 and the selective OX2 antagonist N-ethyl-2-[(6-methoxy-pyridin-3-yl)-(toluene-2-sulfonyl)-amino]-N-pyridin-3-ylmethylacetamide (EMPA). *Molecular Pharmacology*, 78, 81-93.
- Nischino, S.** (2007). Narcolepsy: Pathophysiology and Pharmacology. *Journal of Clinical Psychiatry*, 68(suppl 13), 9-15.
- Nishino, S.**, Ripley, B., Overeem, S., Lammers, G. J., & Mignot, E. (2000). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *The Lancet*, 355(9197): 39.
- Peyron, C.**, Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., et al., (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nature Medicine*, 6(9), 991-997.
- 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.
- Sakurai, T.**, Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., et al. (1998). Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell*, 92, 573-585.
- Samson K.**, Gosnell, B., Chang, J., Resch, Z., & Murphy, T. (1999). Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res*, 831, 248–253.
- Scammell, T. E.** & Winrow, C. J. (2011). Orexin Receptors: Pharmacology and Therapeutic Opportunities. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 10(51), 243–266.
- Song CM**, **Lim SJ**, **Tong JC**. Recent advances in computer-aided drug design. Advance Access, Oxford Journals, [Brief Bioinform.](#) 2009 May 11.

- Takahashi, N.**, Okumura, T., Yamada, H., & Kohgo, Y. (1999). Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254, 623-627.
- Tiseo PJ**, **Perdomo CA**, **Friedhoff LT**. Metabolism and elimination of ¹⁴C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. *Journal of Clinical Pharmacology*. (1998) Nov; 46 Suppl 1:19-24.
- Trivedi, P.**, Yu, H., MacNeil, D. J., Van der Ploeg, L. H. T., & Guan, X.-M. (1998). Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Letters*, 438, 71-75.
- Valencia, M.**, Cassiani, C., Cardona, J., & Villalobos J. (2010). El sistema orexinérgico/hipocratinérgico y su rol en los trastornos del sueño. *Salud Uninorte Barranquilla*, 26(2), 285-297.
- Volkoff, H.** (2012). Sleep and orexins in nonmammalian vertebrates. *Vitamins & Hormones*, 89, 315-339.

ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN

Como parte de la presente investigación, se realizaron exposiciones del diseño de la misma, así como resultados parciales (de manera descriptiva solamente) en la Semana Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en la Universidad de San Carlos de Guatemala, en la Semana de Ciencia y Tecnología, en el marco del foro de Ciencias Básicas, durante la exposición de Química Computacional, así como en el 10° Congreso Europeo de Química Computacional en Fulda, Alemania.