



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

Informe final

**Tamizaje in silico de receptores para tres moléculas identificadas en *Litsea guatemalensis*
Menz como posibles responsables del efecto antiinflamatorio. Código B22-2020**

Equipo de investigación

Nombre de la coordinadora
Lucrecia Margarita Peralta de Madriz

Investigadores
María Nereida Marroquín Tintí
Allan Ronaldo Vásquez Bolaños
Lesbia Mengala Guerra Urizar

Auxiliar de investigación II
Otto Roberto Polanco Morán

Guatemala, febrero 2021

Instituto de Investigaciones Química y Biológicas (IIQB)

Contraportada (reverso de la portada)

Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Ing. Liuba María Cabrera Ovalle de Villagrán
Coordinador del Programa de Investigación

M.A. Lucrecia Margarita Peralta de Madriz
Coordinador del proyecto

M.Sc. María Nereida Marroquín Tintí
Lic. Allan Ronaldo Vásquez Bolaños
M.A. Lesbia Mengala Guerra Urizar
Investigadores

Otto Roberto Polanco Morán
Auxiliar de investigación II

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2020. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.4.41. durante el año 2020 en el Programa Universitario de Investigación de Desarrollo Industrial

Índice

1. Resumen	1
2. Palabras clave	1
3. Abstract and keyword	1
4. Introducción	2
5. Planteamiento del problema	3
6. Preguntas de investigación	5
7. Delimitación en tiempo y espacio	5
8. Marco teórico	5
9. Estado del arte	12
10. Objetivo general	16
11. Objetivos específicos	16
12. Hipótesis (si aplica)	16
13. Materiales y métodos	16
14. Vinculación, difusión y divulgación	20
15. Resultados	20
16. Análisis y Discusión de Resultados	29
17. Conclusiones	32
18. Impacto esperado	33
19. Referencias	33
20. Apéndice	40

Índice de Tablas

Número	Nombre de la tabla	página
Tabla 1	Estructuras proteicas estudiadas como potenciales receptores para los metabolitos ensayados.	20
Tabla 2	Estructuras proteicas estudiadas como potenciales receptores para los metabolitos ensayados.	22
Tabla 3	Mejores 10 receptores para el ligando 5,7,3',4'-Tetrahidroxiisoflavona en base a los punteos obtenidos en docking	22
Tabla 4	Mejores 10 receptores para el ligando Pinocembrina en base a los punteos obtenidos en docking.	23
Tabla 5	Mejores 10 receptores para el ligando Escopoletina en base a los de punteos obtenidos en docking.	23
Tabla 6	Propuestas de modificaciones estructurales a mejorar el efecto antiinflamatorio de las estructuras base.	28

Índice de Figuras

Número	Nombre de la figura	página
Figura 1	Comparación de la pose e interacciones de la 5,7,3',4'-Tetrahidroxiisoflavona obtenida por docking con las del orotato en la enzima dihidroorotato deshidrogenasa	24
Figura 2	Comparación de la pose e interacciones de la Pinocembrina obtenida por docking con las del orotato en la enzima dihidroorotato deshidrogenasa	24
Figura 3	Comparación de la pose e interacciones de la Escopoletina obtenida por docking con las del orotato en la enzima dihidroorotato deshidrogenasa.	24
Figura 4	Interacciones presentadas entre la escopoletina, pinocembrina y la tetrahidroxiisoflavona con el receptor 2DOR (enzima dihidroorotato deshidrogenasa)	25
Figura 5	Interacciones presentadas entre la escopoletina, pinocembrina y la tetrahidroxiisoflavona con el receptor 3N8X (ciclooxigenasa-1)	26
Figura 6	Interacciones presentadas entre la escopoletina y pinocembrina con el receptor 4YTC (quinasa Janus, JAK)	27
Figura 7	Interacciones presentadas entre la pinocembrina y la tetrahidroxiisoflavona con el receptor 4IVC (quinasa Janus, JAK1)	28

Tamizaje in silico de receptores para tres moléculas identificadas en *Litsea guatemalensis* Menz como posibles responsables del efecto antiinflamatorio.

1. Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar mediante métodos in silico qué molécula o moléculas son las responsables del efecto antiinflamatorio que ha demostrado poseer *Litsea guatemalensis* y determinar sobre qué receptor se acoplan. Esto permitió determinar el posible mecanismo de acción de la actividad antiinflamatoria.

Se realizó una escala de referencia a partir de las estructuras de moléculas con efecto antiinflamatorio ya reportado, para cada receptor con que se probaron los metabolitos de interés. Se emplearon distintas funciones de puntuación, y el mejor acoplamiento de las moléculas de referencia, lo que se utilizó como punto de partida para evaluar las moléculas de estudio, utilizando el software Gold, el NAND.

Se analizaron las moléculas de pinocembrina, escopoletina, 5,7,3'4'-tetrahidroxi-isoflavona, que se han identificado en *L. guatemalensis*, sobre receptores que intervienen en el proceso antiinflamatorio. Con el presente estudio se logró determinar que las tres moléculas intervienen en el proceso antiinflamatorio, con mayor afinidad con la enzima dihidroorotato deshidrogenasa.

2. Palabras clave

pinocembrina, escopoletina, 5,7,3'4'-tetrahidroxi-isoflavona, docking de alto rendimiento.

3. Abstract and keyword

The objective of this study was to evaluate by in silico means what molecule or molecules are responsible for the anti-inflammatory effect that *Litsea guatemalensis* has been proven to have and to determine to what receptor do they bond to. Thus, it was possible to determine the mechanism of the anti-inflammatory effect.

A reference scale was created based on known molecular structures with anti-inflammatory effects, for every receptor that the metabolites of interest were tested. Various points-based weighing was done to find the best bond for the reference molecules which was used as a starting point to evaluate the molecules studied using the Gold NAND software.

The molecules evaluated were pinocembrin, escopoletin, 5,7,3'4'-tetrahydroxi-isoflavone which have been identified in *L. guatemalensis*. These were evaluated on receptors that are involved in the anti-inflammatory effect. In the present study we have shown that the three molecules are involved in the anti-inflammatory effect with higher affinity with the dihydroorotate dehydrogenase enzyme.

Keyword: pinocembrin, escopoletin, 5,7,3'4'-tetrahydroxi-isoflavone, high performance docking

4. Introducción

Con el objetivo de incrementar las oportunidades de diseñar nuevos fármacos se han desarrollado diversas y novedosas estrategias para identificar, tanto dianas como ligandos a un nivel de alto rendimiento. Entre los muchos posibles escenarios hay necesidad de caracterizar las dianas farmacológicas conocidas como ligandos bioactivos.

Para la determinación experimental a un nivel molecular preciso, de una diana para un ligando se pueden seguir muchas direcciones, desde simple selección de objetivos a varias estrategias ómicas.

La aplicación de métodos computacionales contribuye a la generación de hipótesis acerca de los mecanismos de acción, al diseño de nuevas estructuras químicas con actividad biológica y en la selección de moléculas para evaluación experimental *in vitro* e *in vivo*. Además, los métodos *in silico* han dado aportes significativos en el desarrollo de medicamentos que se encuentran ya en uso clínico (Saldívar-González, Prieto-Martínez, & Medina-Franco, 2017). Las técnicas *in silico* se han empleado ampliamente para buscar actividades biológicas potenciales de compuestos químicos aislados de fuentes naturales (Medina-Franco, 2013).

Litsea guatemalensis Menz es una especie que pertenece al género *Litsea*, en dicho género se incluyen aproximadamente 622 especies que se distribuyen en diferentes países especialmente áreas tropicales y subtropicales; se reportan 4 especies de este género en México y Centro América. Se ha evidenciado su potencial medicinal como antibacteriano (Wang & Liu, 2010), antioxidante (Hwuang, Choi, & Lee, 2005) y antifúngico (Wang, Liao, Lin, Chou & Su, 2010). Desde el punto de vista químico, este género presenta alcaloides, flavonoides, lactonas y componentes oleosos volátiles (terpenos y fenilpropanoides) (Agrawal, Choudhary, Sharma, & Dobhal, 2011; Jiménez-Pérez & Lorea-Hernández, 2009; Vallverdú, Vila, Cruz, Cáceres, & Cañigüeral, 2005).

La inflamación es un componente de una respuesta protectora a la que los inmunólogos denominan inmunidad innata. Aunque la inflamación ayuda a eliminar las infecciones y otros estímulos nocivos e inicia la reparación, la reacción inflamatoria y el consiguiente proceso reparativo pueden ser causa por sí mismos de un importante daño. Las reacciones inflamatorias normales totalmente beneficiosas pueden producir lesiones y convertirse incluso, en la característica más importante cuando la reacción es muy intensa (Kumar, Abbas, & Aster, 2013).

Existen inductores-sensores de inflamación, estos pueden ser exógenos o endógenos. Los inductores exógenos se pueden clasificar en dos grupos: microbianos y no microbianos. A su vez, hay dos clases de inductores microbianos: patrones moleculares asociados a patógenos y factores

de virulencia. Los patrones moleculares asociados a patógenos se definen en el sentido de que el huésped ha desarrollado un conjunto correspondiente de receptores (conocidos como receptores de reconocimiento de patrones) que detectan su presencia. La segunda clase de inductor microbiano comprende una variedad de factores de virulencia y, por lo tanto, está restringida a los patógenos. A diferencia de los patrones moleculares asociados a patógenos, no son detectados directamente por receptores dedicados. Así mismo, los inductores endógenos de inflamación son señales producidas por tejidos estresados, dañados o con mal funcionamiento (Medzhitov, 2008).

Los mediadores inflamatorios se pueden clasificar en siete grupos según sus propiedades bioquímicas: aminas vasoactivas, péptidos vasoactivos, fragmentos de componentes del complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas y enzimas proteolíticas.

Las citocinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-1, IL-6) son producidas por muchos tipos de células, sobre todo por macrófagos y mastocitos. Tienen varios roles en la respuesta inflamatoria, incluida la activación del endotelio y los leucocitos y la inducción de la respuesta de fase aguda. Las quimioquinas son producidas por muchos tipos de células en respuesta a inductores de inflamación. Controlan la extravasación de leucocitos y la quimiotaxis hacia los tejidos afectados (Medzhitov, 2008).

Varias enzimas proteolíticas (incluyendo elastina, catepsinas y metaloproteinasas de matriz) tienen diversos roles en la inflamación, en parte a través de la degradación de la ECM y las proteínas de la membrana basal. Estas proteasas tienen papeles importantes en muchos procesos, incluida la defensa del huésped, la remodelación de tejidos y la migración de leucocitos (Medzhitov, 2008).

Otro punto importante para la inflamación es el reclutamiento de los linfocitos. La secuencia de acontecimientos durante el reclutamiento de los leucocitos desde la luz vascular al espacio extravascular incluye: 1) marginación y rodamiento a lo largo de la pared vascular; 2) adhesión firme al endotelio; 3) transmigración entre las células endoteliales, y 4) migración hacia los tejidos intersticiales en la dirección del estímulo quimiotáctico (Kumar, Abbas, & Aster, 2013).

Dentro del contexto de los productos naturales antiinflamatorios, la medicina tradicional ha utilizado diversos productos para tratar y cuidar a pacientes con enfermedades que conllevan respuesta inflamatoria (Nathan, 1987), pero no siempre se conoce el mecanismo de acción de este proceso.

5. Planteamiento del problema

La inflamación es una respuesta fisiológica del organismo que puede llegar a causar una gran cantidad de problemas para la salud como dolor crónico, obesidad, neuropatía periférica,

diabetes, enfermedad cardíaca, derrame cerebral, migrañas, problemas de tiroides, entre otras (Cockrell, Steiner, Henderson, Perrin, 2010).

Si el proceso de inflamación no es tratado adecuadamente puede afectar seriamente la salud, ya que se ha identificado por ejemplo que en el Alzheimer la inflamación crónica destruye las células del cerebro (Wyss-Coray, 2006); en el asma las citoquinas inflamatorias inducen reacciones autoinmunes contra el revestimiento de las vías respiratorias; en la artritis reumatoide las citoquinas inflamatorias inducen reacciones autoinmunes contra articulaciones (Pearlman, 1999).

El tratamiento antiinflamatorio en las enfermedades crónicas como la artritis puede ocasionar otras complicaciones de salud, por ejemplo, el consumo de antiinflamatorios no esteroides (AINE) constituye la segunda causa más frecuente de úlcera péptica, y representa un alto riesgo para el desarrollo de complicaciones gastrointestinales, preferentemente hemorragia digestiva y perforación (Quintero, 2000).

Debido a las complicaciones que puede ocasionar la inflamación, es importante contar con otras alternativas de tratamiento para los procesos patológicos; en los últimos años, se han realizado estudios in vivo e in vitro sobre el efecto de plantas medicinales o moléculas aisladas de las mismas en busca de un efecto antiinflamatorio; dichas investigaciones han dado resultados positivos (García, Rojo, García, Hernández, 2002; Bortolini, et. al, 2011; Ribeiro, et.al, 2014).

En la investigación realizada por Bortolini y colaboradores (2011) se demostró por métodos in vivo, que el extracto etanólico de laurel (*Litsea guatemalensis*) presenta una actividad antiinflamatoria en la inflamación producida por la caragenina en ratón; además, se identificaron tres moléculas de estructura fenólica, siendo esto importante ya que estudios realizados por Ribeiro y colaboradores (2014) demostraron que algunos flavonoides (compuestos fenólicos) presentan actividad antiinflamatoria.

Pocos estudios se han realizado en modelos in silico evaluando la actividad antiinflamatoria sobre los receptores que intervienen en dicho proceso; por lo que, no se tiene conocimiento sobre qué molécula es la responsable de la actividad ni los posibles ligandos. Al determinar cuál de las estructuras químicas identificadas en *L. guatemalensis* es la responsable del efecto farmacológico y su ligando, sería posible iniciar la búsqueda de nuevas sustancias químicas que tengan efecto antiinflamatorio. Es por ello que la presente investigación tiene como objetivo determinar cuál de las moléculas ya identificadas en *L. guatemalensis* es la responsable del efecto antiinflamatorio ya reportado para la especie, determinando su posible mecanismo de acción mediante método in silico; así como la optimización del mejor candidato mediante el empleo de química combinatoria.

6. Preguntas de investigación

¿Cuál de las moléculas bioactivas, identificadas en *Litsea guatemalensis* es la responsable del efecto antiinflamatorio que la especie ha presentado en modelos in vivo?

¿Sobre qué receptores interactúa la molécula para ejercer el efecto antiinflamatorio?

¿Las moléculas de *Litsea guatemalensis* se unen a las mismas proteínas de receptor que los fármacos antiinflamatorios de referencia?

7. Delimitación en tiempo y espacio

Delimitación en tiempo: La investigación se realizó de febrero 2020 a febrero 2021, terminando de recolectar los datos en el mes de enero 2021, para su posterior análisis y elaboración del manuscrito e informe final.

Delimitación espacial: la investigación se llevó a cabo en el Departamento de Química Medicinal, de la Escuela de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, durante once meses. Empleando librerías gratuitas tales como Protein Data Bank y Drug Bank.

8. Marco teórico

Los productos naturales que, inherentemente contienen una gran cantidad de diversas estructuras, han sido las mayores fuentes de agentes bioactivos y continuamente serán protagonistas para el descubrimiento de nuevos fármacos (Shen y otros, 2003).

El tamizaje virtual se define como la evaluación de compuestos usando programas de computadora, y tal como sugiere esta definición, en el mismo se evalúa un gran número de moléculas. Debido a que los métodos se han refinado mucho y cada vez son más certeros, el tamizaje virtual se ha convertido en una parte integral del proceso de diseño de fármacos (Rollinger, Stuppner, & Langer, 2008), y puede usarse para seleccionar cuáles son los mejores candidatos que, posteriormente pueden ser sintetizados para ser probados en otro tipo de estudios. El reconocimiento molecular (unión) juega un rol central en los sistemas biológicos. Una amplia variedad de procesos fisiológicos son el reflejo de la unión del ligando con macromoléculas, especialmente con proteínas. (Shen y otros, 2003)

El denominado “Virtual target screening” es un anglicismo que puede traducirse como cribado o tamizaje de dianas y que también se conoce como docking inverso o tamizaje inverso. Es un método aplicado sobre una población de biomoléculas (biblioteca), que en este estudio específico

son las proteínas endógenas que participan en el proceso fisiológico de la inflamación, para detectar cuál o cuáles proteínas presentan una afinidad por el ligando o ligandos de interés (Xu, Huang, & Zou, 2018). El proceso inicia realizando acoplamiento molecular de fármacos con actividad conocida (de referencia) que se sabe interactúan de forma específica con los receptores de la biblioteca que se desea tamizar para generar parámetros de control. Este proceso de “calibración” provee una referencia para cada proteína que luego puede ser comparada contra el resultado obtenido del docking de la misma proteína con el metabolito de interés para distinguir una interacción adecuada o “hit” de las que no podrían serlo (Santiago, y otros, 2012).

El “docking” o acoplamiento molecular es un método que predice la orientación de una molécula (pose) con respecto a otra cuando interactúan a través de fuerzas intermoleculares o enlaces no covalentes, como las interacciones hidrofóbicas, interacciones dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno para formar un complejo relativamente estable (Lengauer & Rarey, 1996). Las asociaciones formadas entre biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos juegan un papel relevante en la transmisión de señales bioquímicas en el organismo; por esta razón, el docking es uno de los métodos más frecuentemente utilizados en el desarrollo de fármacos basado en estructura.

A través de cálculos de mecánica molecular o mecánica cuántica también es posible predecir la fuerza de la asociación o afinidad entre las dos moléculas, lo que se reporta usando una función de puntuación (Jain, 2006). Existen cuatro clases generales de funciones de puntuación: las basadas en campos de fuerzas, las empíricas, las estadísticas y las más recientes que se basan en aprendizaje de máquina (Fenu, Lewis, Good, Bodkin, & Essex, 2007).

La mayoría de los programas o algoritmos de docking capaces de ejecutar los mismos implementan alguna o varias funciones de puntuación (Sousa, y otros, 2013), por lo que se podrían usar estas directamente o bien realizarles modificaciones con el fin de refinarlas para que reflejen una mayor especificidad. En este estudio se pretende estudiar estadísticamente varias de estas opciones de puntuación para determinar cuál de ellas tiene un mejor poder predictivo para las moléculas usadas. (Santiago, y otros, 2012)

Además de las funciones de puntuación generadas por computadora, puede ser necesaria la evaluación por parte de un investigador de otros parámetros no incluidos en los algoritmos de los programas, como, por ejemplo, la similitud entre los aminoácidos de la proteína que interactúan con los ligandos o el tipo de interacción que generan. Este parámetro es muy importante ya que existen teorías bien documentadas como la teoría de los tres puntos de Easson-Stedman que propone que al menos tres áreas del ligando deben interactuar simultáneamente con sitios complementarios en el receptor (The Kanji Foundry Press, 2017). Esto se deriva del hecho de que se han observado grandes diferencias en los efectos biológicos de distintos enantiómeros de una molécula por lo que es importante verificar que los puntos y tipos de interacción de los

metabolitos en estudio sean similares a los que se reportan para las moléculas de referencia, lo que puede expresarse como un porcentaje y considerarse otra función de puntuación distinta que también debe ser tomada en cuenta.

La respuesta inflamatoria implica una amplia serie de procesos donde una variedad de mediadores solubles está involucrados en la activación de células residentes (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos tisulares y mastocitos) y en el reclutamiento y activación de células inflamatorias (monocitos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos). Esos mediadores solubles pueden organizarse en cuatro grupos principales: metabolitos lipídicos inflamatorios como el factor activador de plaquetas (PAF) y los derivados de ácido araquidónico, prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) y lipoxinas; tres cascadas de proteasas solubles/sustratos (coagulación, complemento y cininas), que generan numerosos péptidos proinflamatorios; óxido nítrico, un potente vasodilatador endógeno; y citocinas, que son los principales determinantes para el infiltrado celular, el estado de activación celular y las respuestas sistémicas a la inflamación (Feghali & Wright, 1997).

La inflamación es un componente de una respuesta protectora a la que los inmunólogos denominan inmunidad innata. Aunque la inflamación ayuda a eliminar las infecciones y otros estímulos nocivos e inicia la reparación, la reacción inflamatoria y el consiguiente proceso reparativo pueden ser causa por sí mismos de un importante daño. Los componentes de la reacción inflamatoria que destruyen y eliminan los microbios y tejidos muertos pueden también ocasionar daños en los tejidos normales. Por tanto, las reacciones inflamatorias normales totalmente beneficiosas pueden producir lesiones, las cuales pueden, incluso, convertirse en la característica más importante cuando la reacción es muy intensa (Kumar, Abbas, & Aster, 2013).

Existen otros inductores-sensores de inflamación que pueden ser exógenos o endógenos. Los inductores exógenos se pueden clasificar en dos grupos: microbianos y no microbianos. A su vez, hay dos clases de inductores microbianos: patrones moleculares asociados a patógenos y factores de virulencia. La primera clase de inductores microbianos es un conjunto limitado y definido de patrones moleculares conservados que es transportado por todos los microorganismos de una clase dada (Medzhitov, 2008).

Los patrones moleculares asociados a patógenos se definen en el sentido de que el huésped ha desarrollado un conjunto correspondiente de receptores (conocidos como receptores de reconocimiento de patrones) que detectan su presencia. La segunda clase de inductor microbiano comprende una variedad de factores de virulencia y, por lo tanto, está restringida a los patógenos. A diferencia de los patrones moleculares asociados a patógenos, no son detectados directamente por receptores dedicados. Así mismo, los inductores endógenos de inflamación son señales producidas por tejidos estresados, dañados o con mal funcionamiento (Medzhitov, 2008).

Los mediadores inflamatorios se pueden clasificar en siete grupos según sus propiedades bioquímicas: aminas vasoactivas, péptidos vasoactivos, fragmentos de componentes del complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas y enzimas proteolíticas. Las aminas vasoactivas (histamina y serotonina) se producen de forma total o nula cuando los mastocitos y las plaquetas se degranulan. Tienen efectos complejos sobre la vasculatura, causando una mayor permeabilidad vascular y vasodilatación, o vasoconstricción, según el contexto. En segundo lugar, los péptidos vasoactivos pueden almacenarse en forma activa en vesículas secretoras (por ejemplo, sustancia P) o generarse mediante procesamiento proteolítico de precursores inactivos en el fluido extracelular (por ejemplo, quinas, fibrinopéptido A, fibrinopéptido B y productos de degradación de fibrina) (Medzhitov, 2008).

Los fragmentos del complemento C3a, C4a y C5a (también conocidos como anafilatoxinas) son producidos por varias vías de activación del complemento. C5a (y en menor medida C3a y C4a) promueven el reclutamiento de granulocitos y monocitos e inducen la desgranulación de los mastocitos, lo que afecta el sistema vascular.

Otro componente de la inflamación son los mediadores lipídicos. Estos se componen de eicosanoides y factores de activación plaquetaria. Su proceso de formación inicia desde los fosfolípidos, como la fosfatidilcolina, que están presentes en la región interna de las membranas celulares. Después de la activación por iones Ca^{+2} intracelulares, la fosfolipasa A2 citosólica genera ácido araquidónico y ácido lisofosfatídico, los precursores de las dos clases de mediadores lipídicos enumerados anteriormente. El ácido araquidónico se metaboliza para formar eicosanoides, ya sea por ciclooxigenasas (COX1 y COX2), que generan prostaglandinas y tromboxanos, o por lipoxigenasas, que generan leucotrienos y lipoxinas (Medzhitov, 2008).

Las citocinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-1, IL-6) son producidos por muchos tipos de células, sobre todo por macrófagos y mastocitos. Tienen varios roles en la respuesta inflamatoria, incluida la activación del endotelio y los leucocitos y la inducción de la respuesta de fase aguda. Las quimioquinas son producidas por muchos tipos de células en respuesta a inductores de inflamación. Controlan la extravasación de leucocitos y la quimiotaxis hacia los tejidos afectados (Medzhitov, 2008).

Varias enzimas proteolíticas (incluyendo elastina, catepsinas y metaloproteinasas de matriz) tienen diversos roles en la inflamación, en parte a través de la degradación de la matriz extracelular y las proteínas de la membrana basal. Estas proteasas tienen papeles importantes en muchos procesos, incluida la defensa del huésped, la remodelación de tejidos y la migración de leucocitos (Medzhitov, 2008).

Otro punto importante para la inflamación es el reclutamiento de los linfocitos. Los leucocitos normalmente fluyen con rapidez por la sangre, y en la inflamación es preciso que se detengan y lleguen al lugar donde se encuentra el agente lesivo o el foco de daño tisular, que típicamente se

encuentran localizados fuera de los vasos. La secuencia de acontecimientos durante el reclutamiento de los leucocitos desde la luz vascular al espacio extravascular incluye: 1) marginación y rodamiento a lo largo de la pared vascular; 2) adhesión firme al endotelio; 3) transmigración entre las células endoteliales; y 4) migración hacia los tejidos intersticiales en la dirección del estímulo quimiotáctico (Kumar, Abbas, & Aster, 2013).

Como se mencionó anteriormente, dentro de los mediadores químicos del proceso inflamatorio se encuentran; la histamina, las cininas, las citocinas y las quimiocinas. Un papel muy importante en las etapas tempranas de este proceso lo juegan los eicosanoides. La mayoría de los estímulos inflamatorios promueven la activación de la enzima fosfolipasa A2, la cual actúa sobre los fosfolípidos de las membranas celulares y estimula la liberación de ácido araquidónico. Dicha molécula una vez liberada puede ser transformada en estos mediadores siguiendo dos vías fundamentalmente de transformación, a través de la lipooxigenasa (5-LO) y de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). En dependencia de la ruta se promueve la síntesis de leucotrienos y/o prostaciclina, prostaglandinas, tromboxanos y el factor activador plaquetario; por otra parte, ocurre un incremento en la producción de radicales libres y el factor de transcripción kappa-beta (NF- κ B) (Regalado, A. & Sánchez L., 2015) (Zambrano-Vázquez, O. et al., 2017).

La función de los antiinflamatorios no esteroideos -AINEs- es bloquear las enzimas prostaglandina H2 sintasas, que son las causantes de producir prostaglandinas durante el proceso inflamatorio. Los mamíferos tienen dos isoformas de la prostaglandina H2 sintasa, la ciclooxigenasa 1 (COX1) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Ambas poseen en su estructura más de 600 aminoácidos y, aunque tienen similar secuencia de aminoácidos (60 a 65 %), poseen diferentes funciones (Meneses, L. & Cuesta, S., 2015).

La estructura de COX-1 presenta tres dominios, un primer dominio N-terminal corto del factor de crecimiento epidérmico, un dominio de unión a la membrana y un gran dominio C-terminal globular catalítico. El segundo, que se une a las membranas, está constituido por cuatro hélices que forman un canal que permite la entrada del ácido araquidónico de la membrana al sitio activo. En el tercer dominio hay dos lugares activos, uno que cataliza la ciclooxigenación y otro la peroxidación (Cuesta, S. et. al., 2017).

Estructuralmente, COX-2 es muy parecida a la COX-1, pero el sitio de unión para el ácido araquidónico es diferente; la COX- 2 presenta un canal 17% más amplio. Su estructura tridimensional consta de tres unidades independientes: una similar al factor de crecimiento epidérmico 2, otra en la membrana y otra en la que contiene los dos dominios enzimáticos (Cuesta, S. et. al., 2017).

Estudios previos demuestran que las enzimas ciclooxigenasas poseen dos sitios activos ciclooxigenasa y dos peroxidasas en su estructura. Los AINEs inhiben los sitios activos

ciclooxigenasa que se encuentran en la parte inferior de la enzima. (Meneses, L. & Cuesta, S., 2015).

La búsqueda de principios antiinflamatorios que tengan como diana biológica las enzimas ciclooxigenasas ha estado centrada en la selectividad frente a la isoforma COX2, debido a que esta enzima aparece tras la exposición de la célula a agentes como lipopolisacáridos o citocinas proinflamatorias y regula la producción de los prostanoideos que participan en la inflamación (Ramírez, M.; Dranguet, D.; & Morales, J., 2020).

El estrés oxidativo y los fenómenos inflamatorios se relacionan fisiopatológicamente en varias afecciones animales y humanas, entre las cuales se incluyen el cáncer, la aterosclerosis y la diabetes, así como en condiciones fisiológicas como el envejecimiento. Durante el curso del estrés oxidativo se liberan múltiples especies reactivas del oxígeno (EROs) que juegan un importante papel en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias. La liberación de EROs por parte de las células inflamatorias activadas, como los neutrófilos y los macrófagos, conduce al daño tisular por modificación de la estructura química de macromoléculas como el ADN y las proteínas, así como por peroxidación de los lípidos de membrana. Las EROs estimulan además la liberación de citocinas pro inflamatorias (interleucina-1, interferón- γ y factor de necrosis tumoral- α), las que producen el reclutamiento adicional de macrófagos y neutrófilos. Por tanto, el estrés oxidativo es un factor importante en la aparición y mantenimiento de los procesos inflamatorios y su control por medio de los antioxidantes puede reducir los efectos de la inflamación (Valdés-Izaguirre, L.; & Ramírez-Arzuaga, J., 2018).

Las citoquinas son un grupo de péptidos, proteínas y glicoproteínas directamente relacionadas con efectos anti- o proinflamatorios, de tal forma que la producción en exceso de algunas de ellas puede exacerbar la inflamación, agravando el proceso. Algunas de las principales citoquinas que intervienen en la respuesta inmune son la Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8) o el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) (Guillamón, E., 2018).

Los efectos glucocorticoides (antiinflamatorios e inmunodepresores) de mayor relevancia se deben a la interacción de los fármacos con receptores intracelulares específicos de glucocorticoides que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que controlan la transcripción génica. Dichos receptores de glucocorticoides están ampliamente distribuidos en la mayoría de las células del organismo; en presencia del ligando, el complejo se disocia y el receptor asociado al glucocorticoide se traslada al núcleo, en donde se une como homodímero a secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico (ADN) localizado en las zonas de regulación de los genes denominadas elementos de respuesta glucocorticoide (GRE), y son las que dotan de especificidad a la modulación de la transcripción génica (Cisneros, Y., et al., 2020).

El receptor de glucocorticoides (GR) α estructuralmente posee los tres dominios principales descritos para los receptores nucleares: el dominio N-terminal (NTD), el dominio central de

unión al ADN (DBD) y el dominio C-terminal de unión al ligando (LBD). El dominio NTD contiene la región de activación de la transcripción (AF-1), importante en la interacción con moléculas necesarias para la iniciación de la transcripción (cofactores, coactivadores, moduladores, etc.). El dominio DBD, que contiene dos grupos de cuatro cisteínas, cada una de las cuales coordina un átomo de Zn^{2+} . A través de este dominio, el GR se une a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). El dominio LBD contiene tres regiones principales: el bolsillo hidrofóbico de unión al ligando, una segunda función de activación (AF-2) que interactúa con correguladores y es dependiente de ligando, y la región de dimerización. Entre el DBD y el LBD, el GR presenta una región bisagra (HR) flexible y entre esta y el DBD, se encuentran dos señales de localización nuclear (NL1 y NL2) importantes para la translocación nuclear (Zappia, C.; 2016).

La inhibición de las Janus quinasas constituye un nuevo abordaje para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias con base inmunitaria (López-Sanromán, A., et. al. 2020). Los inhibidores de las Janus quinasas bloquean la transcripción genómica resultante de la interacción entre las citoquinas y sus receptores en superficie celular disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF α (Mosquera, J., 2020). Las Janus quinasas están en el origen de diversas respuestas inmunológicas e inflamatorias y engloban 4 enzimas intracelulares de tipo tirosina-quinasa (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 [tirosina quinasa-2]) asociadas con la región membranosa intracelular de distintos receptores que convierten las señales extracelulares, mediadas por diversas citocinas u hormonas, en procesos intracelulares. Normalmente, las JAK actúan en parejas formadas por JAK distintas, aunque JAK2 se combina también consigo misma. Cada pareja de JAK es específica para un grupo diferente de citocinas, activando así distintas señales de transducción y, por lo tanto, respuestas determinadas ante los diversos estímulos (López-Sanromán, A., et. al. 2020).

La inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) es una enzima que cataliza la oxidación dependiente de nicotinamida adenin dinucleótido (NADp) dependiente de monofosfato de inosina (IMP) a monofosfato de xantina (XMP) en la síntesis de novo (Pacho, M., 2018). Esta enzima es un determinante crítico en la vía de síntesis de nucleótidos. La adenosina y la guanina son bases nucleicas que pueden ser sintetizadas por dos vías: la vía hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa y, por tanto, la síntesis de *novo* de las purinas. Los linfocitos T y B son altamente dependientes de esta vía para la proliferación celular; durante la activación de las células T, la actividad de IMPDH aumenta diez veces. El resultado es la disminución de la migración de linfocitos a los sitios de inflamación e impiden la presentación de antígenos (Saldaña, M., 2017).

Dentro del contexto de los productos naturales antiinflamatorios, la medicina tradicional ha utilizado diversos productos para tratar y cuidar a pacientes con enfermedades que conllevan procesos inflamatorios. Considerando que la inflamación es un mecanismo fisiopatológico básico, la magnitud de la respuesta inflamatoria es crucial, una respuesta inflamatoria insuficiente resulta en inmunodeficiencia, lo cual puede conducir desde una infección hasta cáncer. Por otro

lado, una excesiva respuesta inflamatoria causa morbilidad y mortalidad en enfermedades tales como, arteriosclerosis, tromboembolismo, enfermedad arterial coronaria, cerebral y periférica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, peritonitis, esclerosis múltiple y artritis reumatoide, entre otras (Nathan, 1987).

Los flavonoides son metabolitos secundarios comunes en el reino vegetal considerados sustancias bioactivas relativamente no tóxicas que presentan una gran variedad de efectos biológicos (prevención de enfermedades coronarias, cáncer, desórdenes gastrointestinales e inflamación). Existen evidencias del efecto de los flavonoides sobre la inhibición de varias enzimas involucradas en procesos inflamatorios (Wang et al 1999, Kwon et al 2005, García-Mediavilla et al 2007). Los flavonoides son moléculas prometedoras para la resolución de los procesos inflamatorios crónicos, en especial las que presentan un grupo catecol en su estructura. Estos metabolitos inhiben las COX's así como la inhibición de la producción de prostaglandina E2 (PGE2) inflamatoria y proinflamatoria citosinas (Ribeiro, 2014).

9. Estado del arte

El desarrollo de nuevos fármacos basado en estructura se enfoca en encontrar una molécula que se una a una proteína y sea capaz de alterar el funcionamiento de esta y que la alteración producida sea a su vez suficiente para modificar el curso de una enfermedad o sus síntomas. En este proceso se puede usar la simulación por computadora para determinar si la molécula o conjunto de moléculas tienen una afinidad adecuada al unirse al o los receptores deseados, esto reduce el tiempo y el costo invertidos en el desarrollo de nuevos medicamentos. (Saldívar-González, Prieto-Martínez, & Medina-Franco, 2017).

Los productos naturales siguen siendo una fuente importante en el descubrimiento de nuevos fármacos, considerando la variedad de compuestos químicos que en ellos se encuentran. La predicción de su interacción con las distintas dianas farmacológicas se ha convertido en un gran reto. Para ello, se están aplicando distintas técnicas computacionales, las cuales resultan más económicas y de menor consumo de tiempo previo a las validaciones experimentales (Aurélien, et al., 2019).

Hoy en día existen diversos métodos computacionales y bases de datos en línea que pueden ayudar en estos procesos, sin embargo, realizar las pruebas con un número extenso de ligandos o de receptores, así como documentar y analizar los resultados obtenidos es un proceso demandante en tiempo y atención para los investigadores que lo ejecutan y exige cierta capacidad de cómputo a nivel de hardware y algoritmos bien diseñados a nivel de software.

Los estudios in silico de componentes antiinflamatorios en diversas especies vegetales, se ha abordado en varios estudios, como el realizado por Zhang, Q. y otros (2019), en el cual se cribaron in silico sesenta y nueve componentes inflamatorios potenciales con buenas propiedades

similares a las de los fármacos, en la corteza interna de *Cinnamomum cassia*, basándose en análisis de farmacología de red y acoplamiento molecular. JAK2, mPEGS-1, COX-2, IL-1 β y PPAR γ fueron consideradas como las cinco proteínas diana más importantes. Los compuestos tales como metil dihidromelilotosida, hieroquina B, dihidromelilotosida, alcohol deshidroconiferílico, balanofonina, fenetil (E) -3- [4-metoxifenil] -2-propenoato, quercetina y luteolina interactuaron cada uno con más de seis de las proteínas diana seleccionadas. Concluyendo que la corteza interna de *C. cassia* posee compuestos activos con buenas propiedades similares a las de los fármacos que pueden desarrollarse potencialmente para tratar la inflamación con componentes múltiples en objetivos múltiples.

El número de estructuras tridimensionales de proteínas que se encuentran disponibles en Protein Data Bank es de 175,977 hoy en día (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, 2021), y sigue aumentando, así como la capacidad de los equipos de cómputo que también se ha acelerado y los precios se han hecho más asequibles. Factores hacen que el “target screening” o tamizaje de dianas sea una realidad. El docking normal o tradicional se utiliza en el desarrollo de fármacos basado en estructura, que la misma se une a una proteína específica ya determinada. Una complicación de este enfoque es que pueden existir moléculas cuyo receptor no se conoce, o bien que interactúan con más de un receptor, estas interacciones con receptores inesperados pueden desencadenar efectos adversos graves también imprevistos. Estas razones han impulsado un interés creciente en el docking inverso, en el que se buscan dianas proteicas que puedan unirse a un ligando.

Además del docking inverso se han desarrollado otros enfoques para el tamizaje de dianas, entre los que se incluyen métodos estadísticos para cálculos de la similitud del sitio de unión y la predicción mediante descriptores (Lee & Kim, 2012). Sin embargo, el docking inverso es el método de elección para este tipo de estudios ya que es más exhaustivo y provee resultados más fiables para la industria farmacéutica. Sin embargo, estos métodos computacionales no reemplazan a los métodos *in vitro* e *in vivo* sino que los complementa al reducir el número de compuestos a ensayar con estos métodos, disminuyendo drásticamente el costo y el tiempo de las primeras fases del desarrollo de medicamentos. (Zoete, Grosdidier, & Michielin, 2009)

Existen diversos estudios mediante química computacional donde se determina la actividad antiinflamatoria de compuestos derivados de productos naturales, como el estudio de acoplamiento molecular de los análogos de la curcumina que reveló las orientaciones en los sitios activos de las COX y, por lo tanto, ayuda a diseñar nuevos inhibidores potentes, para el tratamiento de la inflamación (Selvam, Jachak, Thilagavathi, & Chakraborti, 2005). Por otra parte, Bulakumar y colaboradores (2010) diseñaron mediante química computacional una nueva serie de quinazolininas 8/10-trifluorometil-sustituidas-imidazo, a las cuales se les determinó que inhiben a las COX1 y COX2, por lo que se plantea las pruebas en edema de ratón, logrando una inhibición del 80% en varios derivados. Un estudio realizado sobre los compuestos aislados de *Alpinia officinarum* Hance evidenció mediante química computacional que la galangina y la 5-

hidroxi-7- (4 " -hidroxi-3 " -metoxifenil) -1-fenil-3-heptanona el acoplamiento molecular de estos compuestos y que tienen afinidad hacia el sitio activo de COX-2, que puede explorarse adicionalmente como inhibidores selectivos de COX-2 (Honmore et al., 2016). Con el empleo de la metodología in silico es posible la determinación de los mecanismos de acción de las moléculas, así como el poder potencializar a las mismas, para la obtención de moléculas con mejor actividad.

Dentro de las especies vegetales en las que se han identificado compuestos antiinflamatorios se encuentra *Alisma plantago-aquatica* subsp. *orientale* (Sam.) Sam, de acuerdo con el estudio de Zhaoa, X.-Y. y otros, 2018, en el que se indica que la investigación de componentes químicos de esta especie ha llevado al aislamiento e identificación de trece compuestos, incluido un sesquiterpeno nuevo, (10S)-11-hidroxi- β -ciperona (**1**), tres sesquiterpenos (**2-4**), cinco fenilpropanoides (**5-9**) y cuatro alcaloides (**10-13**). Sus estructuras se establecieron mediante análisis espectroscópicos de RMN 1D y 2D y HRESIMS. Todos los compuestos aislados se ensayaron para determinar sus actividades inhibitoras contra la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7 inducidas por LPS y sus actividades antioxidantes mediante un ensayo de barrida de DPPH. Los compuestos 1-13 mostraron efectos inhibidores significativos contra la producción de NO a una cierta concentración, mientras que el compuesto 5 mostró actividad antioxidante con IC₅₀ de 55.28 μ M. Las interacciones de los compuestos 1, 5 y 11 con iNOS se investigaron mediante acoplamiento molecular.

El potencial antiinflamatorio también ha sido evaluado in silico e in vitro en especies como *Cymbopogon citratus*, cuyo aceite esencial (CEO) exhibió actividad antiinflamatoria in vitro significativa con IC₅₀ – 397.11 \pm 1.45 μ g/ ml en comparación con diclofenaco sódico (IC₅₀ – 682.98 \pm 7.47 μ g/ ml). Los componentes químicos del aceite se determinaron mediante cromatografía de gases/espectroscopía de masas, siendo 8-metil-3,7-Nonadien-2-ona (E), α -pineno, limoneno, citral, óxido de limoneno y acetato de epoxi- α -terpenilo los componentes principales. El estudio de acoplamiento molecular in silico mostró que los fitocompuestos de CEO (óxido de cariofileno y β -cariofileno) tienen un potencial de unión considerable con los receptores 1HD2 y 5IKQ. La predicción PASS de estos fitocompuestos también confirmó una fuerte actividad antiinflamatoria de *C. citratus*. El análisis de ADMET también mostró que estos fitocompuestos son más seguros para reemplazar las drogas sintéticas con efectos secundarios (Salaria, D. y otros, 2020).

Respecto a la molécula de pinocembrina, de interés en el presente estudio, ha sido investigada in vitro por su potencial anti-alérgico, en el estudio de Hanieh, H. y otros, 2017, en el cual se investigó sus efectos en la respuesta alérgica mediada por IgE in vitro. Los estudios preliminares, utilizando un modelo microbiológico de *Klebsiella pneumoniae*, proporcionaron las primeras evidencias que sugieren que la pinocembrina es un posible inhibidor termoestable de la histidina descarboxilasa (HDC). La aplicación del análisis de acoplamiento reveló una posible interacción entre pinocembrina y HDC de mamíferos. Los estudios in vitro validaron la interacción predicha

y mostraron que la pinocembrina inhibe la actividad de HDC y la histamina en RBL-2H3 sensibilizados con IgE en respuesta a la estimulación con dinitrofenol (DNP)-albúmina de suero bovino (BSA). Además, mitigó el daño en la membrana mitocondrial, la formación de gránulos citoplasmáticos y la desgranulación como lo indica el nivel más bajo de β -hexoseaminidasa. También redujo el rango de mediadores proinflamatorios en la respuesta alérgica mediada por IgE, incluido el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6, óxido nítrico (NO), NO sintasa inducible (iNOS), fosforilación de inhibidores kappa B (I κ B)- α , prostaglandina (PGE)-2 y ciclooxigenasa (COX)-2.

Así mismo, la pinocembrina ha sido investigada por su potencial propiedad inhibidora contra los receptores ACE-II para el tratamiento de COVID-19, por Güler, H. y Kara, Y., 2020. En este estudio, las constantes de unión de once flavonoides, catequina, pinocembrina, crisina, éster fenético del ácido cafeico, ácido p-OH benzoico, ácido siríngico, ácido t-cinámico, ácido p-cumárico, rutina, ácido ferúlico y ácido gálico se midieron usando el software de acoplamiento molecular AutoDock 4.2. Según el análisis de acoplamiento, la catequina tiene el mejor potencial de inhibición entre todas las moléculas analizadas con alta energía de unión (-7.77 kcal/ mol) y el Ki más bajo (2.03 μ M); le sigue pinocembrina, crisina, éster fenético del ácido cafeico, respectivamente. Teniendo la molécula de referencia hidroxiclороquina una energía de enlace de -7.53 kcal/ mol y 3.04 μ M.

Otra de las moléculas de interés en el presente estudio es la escopoletina, la cual ha sido estudiada por su potencial antiamiloidogénico, anticolinesterasa y neuroprotector por Kashyap, P. y otros, 2020. Este estudio evaluó el potencial modificador de la escopoletina contra múltiples factores asociados a la enfermedad de Alzheimer, como las enzimas colinesterasas, péptidos A β y propiedades neuroprotectoras contra la citotoxicidad inducida por A β y H₂O₂ en condiciones in vitro. La escopoletina se identificó y cuantificó utilizando UPLC-QTOF (cromatografía líquida de ultra performance-analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), respectivamente. El potencial antiamiloidogénico se evaluó mediante el ensayo de unión con tioflavina T y rojo congo. La inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), se analizó mediante el ensayo de Ellman. El análisis UPLC-QTOF mostró que el fitoconstituyente más abundante presente en el extracto de raíz hidroalcohólica de *Argyrea speciosa* fue escopoletina seguida de festuclavina y ergometrina. La escopoletina se cuantificó adicionalmente utilizando el método de fase inversa (RP)-HPLC desarrollado en este estudio. Se encontró que el potencial neuroprotector de la escopoletina fue del 69% contra la neurotoxicidad inducida por A β 42 y del 73% contra la citotoxicidad inducida por H₂O₂ en cultivo de células PC12 a una concentración final de 40 μ M. A la misma concentración, la escopoletina inhibió la formación de fibrillas de A β 42 hasta en un 57%. La concentración de IC₅₀ para la inhibición de las enzimas AChE y BuChE por escopoletina fue de 5.34 y 9.11 μ M, respectivamente. Los resultados de antiagregación e inhibición enzimática se complementaron con fuertes interacciones moleculares de escopoletina con proteínas diana validadas por análisis de acoplamiento molecular in silico.

10. Objetivo general.

Identificar los posibles receptores farmacológicos involucrados en el efecto farmacológico que provocan las moléculas responsables del efecto antiinflamatorio de *Litsea guatemalensis* mediante métodos in silico.

11. Objetivos específicos

Verificar las interacciones fármaco-receptor de las moléculas con los receptores viables seleccionados.

Determinar un posible mecanismo de acción antiinflamatorio de las moléculas y el receptor con el que interactúan.

Proponer la optimización estructural de las moléculas de estudio para potencializar la interacción con el receptor.

12. Hipótesis (si aplica).

Por ser una investigación descriptiva no aplica.

13. Materiales y métodos

13.1 Enfoque y tipo de investigación: esta fue una investigación de enfoque mixto, ya que se obtuvo, computaron y evaluaron datos cuantitativos, así como cualitativos para las proponer los resultados y conclusiones incluidas en este informe. Además, fue una investigación explicativa ya que se pretendía profundizar y explicar un fenómeno observado previamente, el efecto antiinflamatorio de las tres moléculas estudiadas de *Listea guatemalensis* Menz.

13.2 Recolección de información:

13.2.1 Universo: todos los receptores farmacológicos involucrados en el proceso de la inflamación.

13.2.2 Población: aquellos receptores farmacológicos involucrados en el proceso de la inflamación que han sido descritos en la literatura y se conoce su mecanismo de acción.

- 13.2.3 Muestra: estructuras tridimensionales de receptores farmacológicos involucrados en el proceso de la inflamación que se han sido elucidadas y se encuentran disponibles en la base de datos Protein Data Bank.
- 13.2.4 Criterios de inclusión: todas las estructuras de complejos que tenían un sitio de unión a ligando definido y un ligando incluido en la estructura.
- 13.2.5 Criterios de exclusión: aquellas estructuras en las que no se encontraba o no se reportaba un sitio de unión a ligando, y aquellas en las que el ligando estudiado no era una molécula pequeña (complejos proteína-proteína, etc.). Cuando la estructura elucidada se encontraba en forma de dímero o tetramero, también se excluyeron aquellas cadenas que se encontraban repetidas.
- 13.3 No se hizo muestreo ya que se utilizaron todas las estructuras disponibles que cumplían con los criterios de inclusión. Para cada docking proteína-ligando se obtuvo de cuatro a diez distintas poses; para cada docking fármaco-proteína se obtuvo de cuatro a diez poses distintas; este número fue determinado por el software utilizado, usando un algoritmo genético, el cual se detiene cuando se obtiene el mismo resultado un determinado número de veces. (Verdonk, Cole, Hartshorn, Murray, & Taylor, 2003)
- 13.4 Técnicas e instrumentos:
- 13.4.1 Selección de receptores farmacológicos a utilizar: se realizó la revisión de literatura sobre los mecanismos bioquímicos de la inflamación para la selección de los receptores mejor descritos y que tuvieran un ligando de referencia para la comparación de resultados del docking.
- 13.4.2 Obtención de estructuras: a partir del listado de los receptores farmacológicos generado en el paso anterior se procedió a realizar una búsqueda en Protein Data Bank (PDB), en la que se encontró un total de 65 estructuras; estas fueron descargadas en el formato PDB y almacenadas en carpetas para su procesamiento posterior.
- 13.4.3 Análisis de interacciones proteína ligando de referencia: utilizando las estructuras descargadas de PDB, por medio del software PLIP (PharmAI) se generaron tablas de interacciones proteína-ligando, especificando el tipo de interacción y la distancia entre los átomos que la generaban. Además, por medio de Schrödinger Maestro se generaron imágenes bidimensionales para representar visualmente las interacciones descritas anteriormente. En este paso se eliminaron todas aquellas estructuras que no tenían un ligando

tipo small-molecule o que no tenían un sitio de unión definido, quedando un total de 50 proteínas que se procesaron según los pasos posteriores. (Salentin, Schreiber, Haupt, Adasme, & Schroeder, 2015) (Schrödinger, 2020).

- 13.4.4 Limpieza de estructuras: las estructuras restantes fueron procesadas en UCSF Chimera, en este programa se eliminaron las cadenas repetidas de aquellas estructuras que se encontraban como dímeros o tetrámeros, así como los grupos prostéticos que no participaban en las interacciones. Se aislaron los ligandos de referencia y cada molécula de agua que participaba en interacciones y se guardaron de forma independiente en formato mol2 en las carpetas correspondientes. Las proteínas limpias fueron guardadas en formato PDB para el proceso de minimización (Pettersen, y otros, 2004).
- 13.4.5 Dinámica molecular: a las estructuras de las proteínas limpias se les realizó un proceso de minimización, usando el software NAMD2, se utilizaron 150,000 pasos de minimización seguidos de 250,000 pasos de dinámica molecular a 310 K. El resto de los parámetros utilizados pueden consultarse en los anexos de este informe. (Phillips, y otros, 2020)
- 13.4.6 Dibujo y optimización 3D de metabolitos: los metabolitos a ensayar se dibujaron inicialmente en dos dimensiones usando Marvin 19.17.0 (Chemaxon), y fueron almacenados en el formato SMILES. Usando Avogadro 1.2.0 se trasladaron a tres dimensiones realizando la optimización por con el campo de fuerzas MMFF94, hasta obtener una conformación estable con $\Delta E \approx 0$, estas estructuras fueron guardadas en formato mol2. (Hanwell, y otros, 2012)
- 13.4.7 Cálculo de descriptores moleculares: a partir de los códigos SMILES, se calcularon los descriptores moleculares de Lipinski usando RDKit 2018.09.3.
- 13.4.8 Docking: fue realizado en el software GOLD 5.8.1 (CCDC), para cada proteína se agregaron los átomos de hidrógeno correspondientes, se configuró para que el software estableciera el espacio de búsqueda basándose en el inhibidor o ligando conocido incluido que se aisló previamente del PDB descargado, se conservaron las moléculas de agua del sitio de unión, de manera que pudiesen usarse si eran necesarias para formar puentes de hidrógeno u otro tipo de interacción, la flexibilidad de los ligandos se configuró para que pudiese darse la inversión de la silla y los átomos metálicos se configuraron en su geometría de coordinación original.

13.4.9 Hardware: los procesos antes descritos fueron realizados en diversos equipos propiedad de los miembros del equipo de investigación, debido a las restricciones impuestas para contener la propagación de la pandemia de COVID-19.

13.5 Operacionalización de las variables o unidades de análisis:

Objetivos específicos	VARIABLES O UNIDADES DE ANÁLISIS CONSIDERADAS	Forma en que se midieron, clasificaron o cualificaron
Verificar las interacciones fármaco-receptor de las moléculas con los receptores viables seleccionados.	Estructura tridimensional de la interacción generada por el docking. Sitio de unión con sus inhibidores definido. Número y disposición de átomos, enlaces y cargas. Tensión torsional y estérica de la estructura.	Se examinó la estructura por medio de la interfaz gráfica, las se encontraban en el sitio de unión adecuado se calificaron como viables. Las interacciones presentes también se analizaron por medio de la interfaz gráfica y la función de puntuación.
Determinar un posible mecanismo de acción antiinflamatorio de las moléculas y el receptor con el que interactúan.	Puntuación obtenida en el proceso de docking de los ligandos de referencia con cada proteína.	La puntuación fue calculada directamente por el algoritmo programa que ejecuta el docking. Se tabularon las puntuaciones, ordenándolas de mayor a menor según.

13.7 Procesamiento y análisis de la información:

Análisis de “Druglikeness”: es un concepto cualitativo que se utiliza en el diseño de fármacos para determinar qué tan “similar a un medicamento” es una sustancia con respecto a factores como la biodisponibilidad. Se estima a partir de la estructura molecular y el cálculo de los descriptores moleculares de Lipinski.

La función Chemscore descrita por Eldridge y colaboradores quién predijo que cuando las afinidades de unión, o puntuaciones, se grafican contra las afinidades de unión experimentales; el indicador clave de la calidad de las afinidades predichas es la similitud de las interacciones. Para cálculos basados en los modos de unión experimentales de los

ligandos, las funciones de puntuación, adecuadas para el acoplamiento, dan valores de alrededor de 8 kJ / mol, que corresponden a alrededor de 1 a 5 órdenes de magnitud en la afinidad. Sin embargo, esto no es tan importante para las aplicaciones de cribado virtual, porque aquí el objetivo es identificar ligantes potenciales en una base de datos de compuestos principalmente inactivos, en lugar de clasificar un conjunto de ligantes conocidos.

14. Vinculación, difusión y divulgación

Se estableció contacto con profesores de la Universidad de Colombia para el intercambio de experiencia sobre los estudios de docking y poder establecer trabajo en conjunto en un futuro. Se preparó un artículo para publicar en la revista *Ciencia, Tecnología y Salud*. Se presentaron resultados parciales en el II Encuentro Científico organizado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB- de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, en el mes de noviembre del 2020.

15. Resultados:

En la Tabla 1 se describen los códigos de las proteínas que se determinó tienen un papel en el proceso de la inflamación y que estaban disponibles, acopladas con un ligando, en Protein Data Bank -PDB-.

Tabla 1.

Estructuras proteicas estudiadas como potenciales receptores para los metabolitos ensayados.

Código	Nombre
1CJY	Fosfolipasa A2 citosólica humana
1HU9	Lipooxigenasa-3 (de soya) en complejo con 4-hidroperoxi-2-metoxi-fenol
1JR1	Inosina monofosfato deshidrogenasa en complejo con ácido micofenólico
1M2Z	Estructura cristalina de un complejo dímero del dominio de unión ligando-receptor de glucocorticoides humano unido a dexametasona y un coactivador TIF2
1NHZ	Estructura cristalina de la forma antagonista del receptor de glucocorticoides
1NPZ	Estructura cristalina del complejo inhibidor Catepsina S
1P93	Estructura cristalina de la forma agonista del receptor de glucocorticoides
2DOR	Dihidroorotato deshidrogenasa A de <i>Lactococcus lactis</i> en complejo con orotato
2F1G	Catepsina S en complejo con 2- (benzoxazol-2-ilamino)-acetamida no covalente
2H7J	Estructura cristalina de Catepsina S en complejo con un inhibidor no peptídico
2HXZ	Estructura cristalina de Catepsina S en complejo con un inhibidor no peptídico (grupo espacial hexagonal)
2V95	Estructura de globulina transportadora de corticosteroides en complejo con cortisol
2VDX	Estructura cristalina de la globulina de unión a corticosteroides escindida del asa reactiva
2VDY	Estructura cristalina de la globulina de unión a corticosteroides escindida del asa reactiva en

	complejo con cortisol
3CLD	Dominio de unión al ligando del receptor de glucocorticoides complejo con furoato de fluticazona
3E7C	Receptor de glucocorticoides LBD unido a GSK866
3EYG	Estructuras cristalinas de los complejos inhibidores JAK1 y JAK2
3EYH	Estructuras cristalinas de los complejos inhibidores JAK1 y JAK2
3K22	Receptor de glucocorticoides con alaninamida 10 unida con péptido TIF2
3KK6	Estructura cristalina de ciclooxigenasa-1 en complejo con celecoxib
3MNE	Estructura cristalina de la forma agonista del receptor de glucocorticoides de ratón estabilizada por la mutación F608S en 1.96A
3N8W	Estructura cristalina del heterodímero mutante de ciclooxigenasa-1 nativo R120Q en complejo con flurbiprofeno
3N8X	Estructura cristalina de ciclooxigenasa-1 en complejo con nimesulida
3N8Y	Estructura de ciclooxigenasa-1 acetilada de aspirina en complejo con diclofenaco
3N8Z	Estructura cristalina de ciclooxigenasa-1 en complejo con flurbiprofeno
3PGH	Ciclooxigenasa-2 (prostaglandina sintasa-2) complejada con un inhibidor no selectivo, flurbiprofeno
3PJC	Estructura cristalina de JAK3 complejada con un potente inhibidor del sitio ATP que muestra una alta selectividad dentro de la familia de Janus quinasas
4BB2	Estructura cristalina de la globulina transportadora de corticosteroides escindida en complejo con progesterona
4C49	Bucle reactivo escindido de CBG humano en complejo con cortisol
4CSJ	El descubrimiento de potentes moduladores selectivos del receptor de glucocorticoides, adecuados para inhalación
4E5W	Quinasa JAK1 (dominio JH1) en complejo con el compuesto 26
4I5C	Dominio de la quinasa Jak1 en complejo con el inhibidor
4IVC	Quinasa JAK1 (dominio JH1) en complejo con el inhibidor (trans-4-{2-[(1r)-1-hidroxietil]imidazo [4,5-d] pirrolo [2,3-b] piridina-1 (6h) -yl} ciclohexil) acetonitrilo
4LSJ	Estructura cristalina del dominio de unión al ligando del receptor de glucocorticoides unido a una dibenzoxapina sulfonamida
4NRE	Estructura de la 15-lipoxigenasa-2 humana con un sustrato simulado
4P6W	Estructura cristalina del dominio de unión al ligando del receptor de glucocorticoides unido al furoato de mometasona
4RIO	Estructura cristalina del dominio de la quinasa jak3 en un complejo con un inhibidor de pirrolopiridazina carboxamida
4YTC	Descubrimiento de VX-509 (decernotinib): un inhibidor potente y selectivo de la quinasa Janus (JAK) 3 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes
4YTF	Descubrimiento de VX-509 (decernotinib): un inhibidor potente y selectivo de la quinasa Janus (JAK) 3 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes
4YTI	Descubrimiento de VX-509 (decernotinib): un inhibidor potente y selectivo de la quinasa Janus (JAK) 3 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes
5IKQ	Estructura del ácido meclofenámico unido a la ciclooxigenasa-2 humana
5TQ3	Diseño y síntesis de un candidato clínico de inhibidor de quinasa pan-jak (pf-06263276) adecuado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de los pulmones y la piel.

5TQ4	Diseño y síntesis de un candidato clínico de inhibidor de quinasa pan-jak (pf-06263276) adecuado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de los pulmones y la piel.
5TQ6	Diseño y síntesis de un candidato clínico de inhibidor de quinasa pan-jak (pf-06263276) adecuado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de los pulmones y la piel.
5TQ7	Diseño y síntesis de un candidato clínico de inhibidor de quinasa pan-jak (pf-06263276) adecuado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de los pulmones y la piel.
5VO6	Estructura cristalina del dominio de quinasa jak3 en complejo con un inhibidor de pirrolopiridazina
5WFJ	El dominio de la quinasa jak3 en complejo con un inhibidor covalente
6BBU	Estructura cristalina de jak1 en complejo con el compuesto 25
6DXK	Receptor de glucocorticoides en complejo con el compuesto 11

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de los cálculos de los descriptores necesarios para verificar el cumplimiento de las reglas de Lipinski que permite evaluar un compuesto cualitativamente cómo adecuado para cumplir alguna determinada función farmacológica o actividad biológica.

Tabla 2.
Descriptores de los metabolitos ensayados.

Compuesto	Peso Molar	Total de átomos	DPH*	APH**	Número de anillos	ASPT***	CP****
Escopoletina	192.16	22	1	4	2	49,33	4,7436
Pinocembrina	256.25	31	2	4	3	68,53	3,9273
5,7,3',4'- Tetrahydroxiisoflavona	283.26	31	4	6	3	58,92	4,2525

*DPH: donadores de puentes de hidrógeno

**APH: aceptores de puentes de hidrógeno

***ASPT: Área superficial polar total

****CP: Coeficiente de partición octanol/agua

En las tablas 3, 4 y 5 aparecen ordenados en forma descendente los receptores que obtuvieron los diez mejores punteos según la función ChemScore en los dockings realizados para la 5,7,3',4'-Tetrahydroxiisoflavona, Pinocembrina y Escopoletina respectivamente, por lo que el primer receptor que aparece es el que obtuvo un mejor punteo y una mayor probabilidad para explicar el mecanismo antiinflamatorio de estas moléculas.

Tabla 3.

Mejores 10 receptores para el ligando 5,7,3',4'- Tetrahidroxiisoflavona en base a los punteos obtenidos en docking

Receptor	Identificador de Protein Data Bank	Punteo
Dihydroorotate dehydrogenase	2DOR	86.1791
Cyclooxygenase-1	3N8X	72.5198
JAK1 kinase	4E5W	72.1921
JAK3 kinase	4RIO	71.2365
JAK2 kinase	5TQ6	71.1966
JAK1 kinase	4IVC	70.2918
Antagonist Form of Glucocorticoid Receptor	1NHZ	68.8769
JAK1 kinase	4I5C	68.8686
Glucocorticoid Receptor	4LSJ	68.5894
Glucocorticoid Receptor	6DXK	67.9645

Tabla 4.

Mejores 10 receptores para el ligando Pinocembrina en base a los punteos obtenidos en docking.

Receptor	Identificador de Protein Data Bank	Punteo
Dihydroorotate dehydrogenase	2DOR	81.8432
Antagonist Form of Glucocorticoid Receptor	1NHZ	67.9540
Cyclooxygenase-1	3N8X	66.5372
JAK1 kinase	4IVC	65.305
Glucocorticoid Receptor	6DXK	61.8385
Cyclooxygenase-2	5IKQ	61.8204
Cyclooxygenase-1	3KK6	61.7723
JAK1 kinase	3EYG	61.7272
JAK3 kinase	4YTC	61.6908
JAK1 kinase	4E5W	61.6898

Tabla 5.

Mejores 10 receptores para el ligando Escopoletina en base a los de punteos obtenidos en docking.

Receptor	Identificador de Protein Data Bank	Punteo
Dihydroorotate dehydrogenase	2DOR	73,9461
Inosine Monophosphate Dehydrogenase	1JR1	58,1679
Cyclooxygenase-1	3N8X	54,1651
Antagonist Form of Glucocorticoid Receptor	1NHZ	52,4138
Corticosteroid-binding globulin	4BB2	51,1895

Corticosteroid-binding globulin	4C49	50,2599
Cyclooxygenase-1	3KK6	50,1299
Cyclooxygenase-1	3N8W	49,3579
JAK2 kinase	4YTF	49,0267
JAK1 kinase	3EYG	48,9760

En las figuras 1 a 3 se puede observar una visualización obtenida en USCF Chimera de las poses que adopta cada ligando en la proteína dihidroorotato deshidrogenasa. Se muestran etiquetados los residuos que se encuentran a menos de 5 Å de distancia y pueden participar en interacciones hidrofóbicas, así como los puentes de hidrógeno rotulados con la distancia a la que se encuentra el átomo donador del receptor.

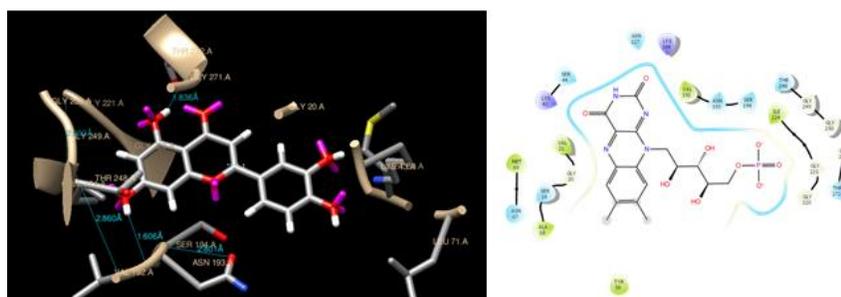


Figura 1.

Comparación de la pose e interacciones de la 5,7,3',4'- Tetrahydroisoflavona obtenida por docking con las del orotato en la enzima dihidroorotato deshidrogenasa

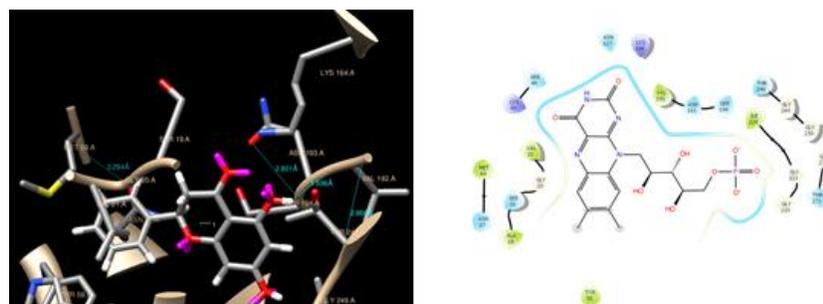


Figura 2.

Comparación de la pose e interacciones de la Pinocembrina obtenida por docking con las del orotato en la enzima dihidroorotato deshidrogenasa

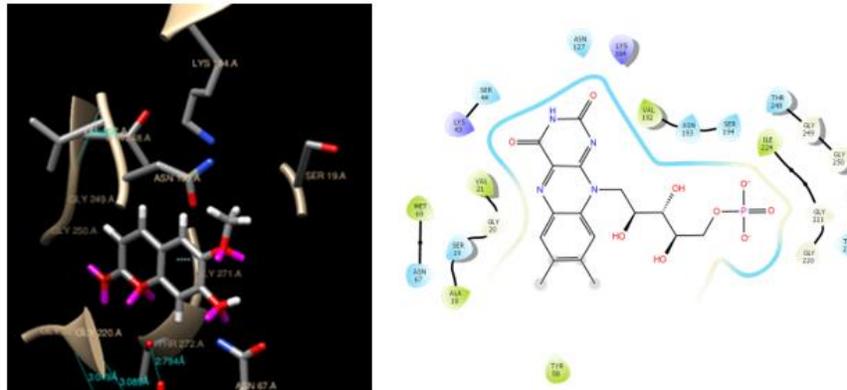
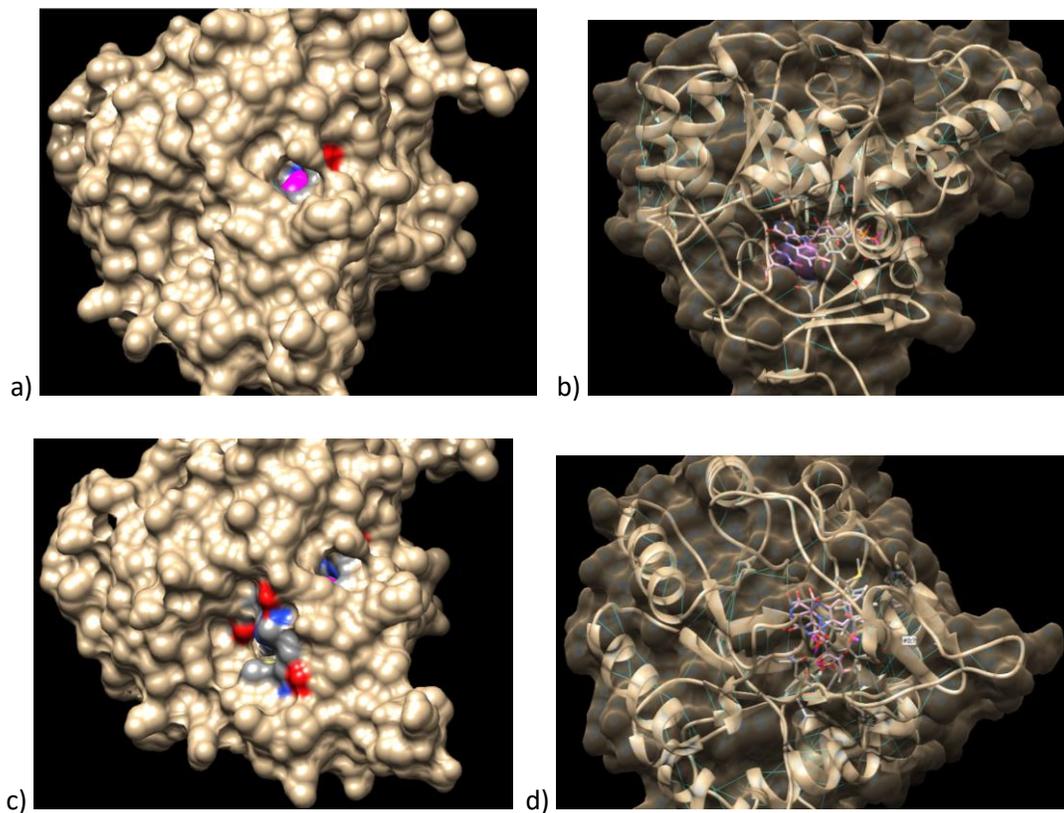
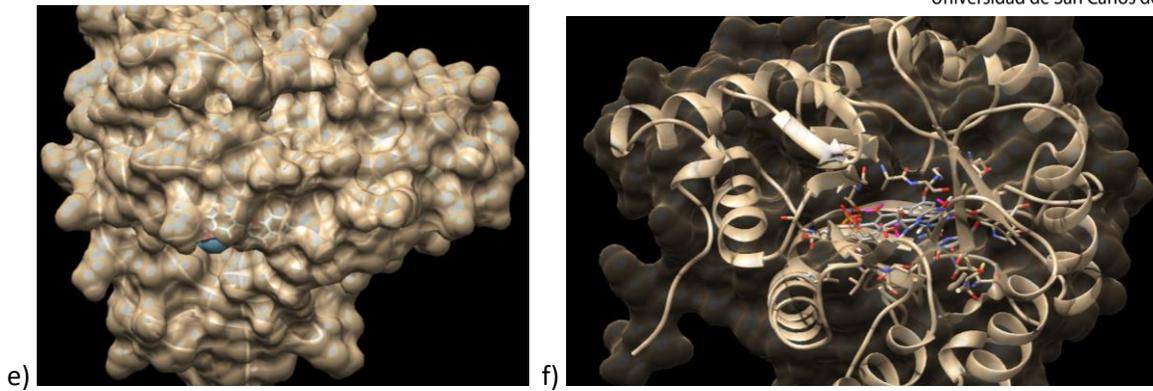


Figura 3.
Comparación de la pose e interacciones de la Escopoletina obtenida por docking con las del orotato en la enzima dihidroorotato deshidrogenasa.

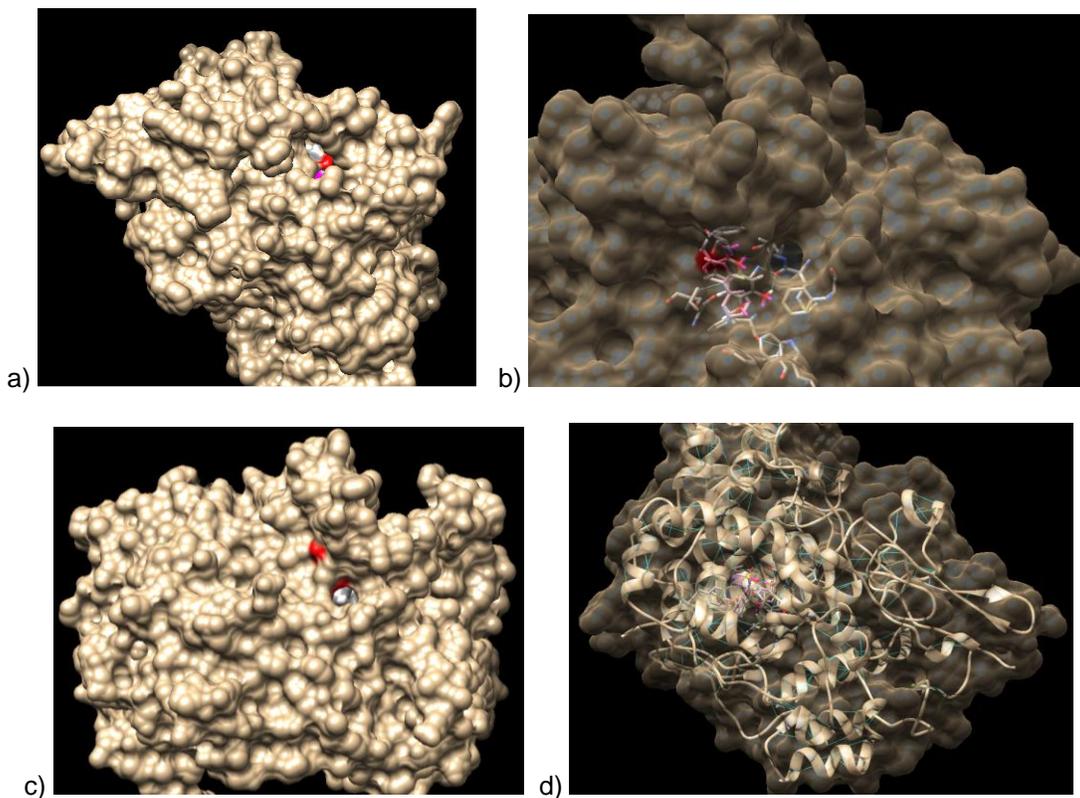


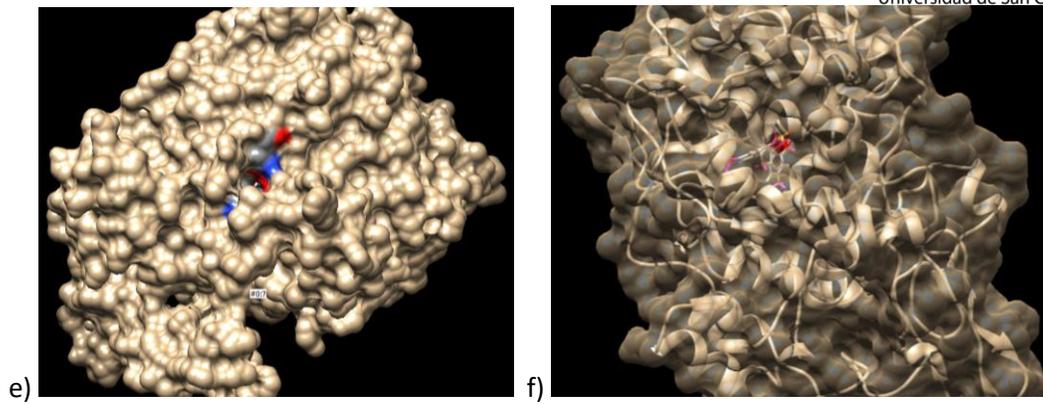


a) Receptor 2DOR con ligando de escopoletina, b) Receptor 2DOR con ligando de referencia leflunomida y escopoletina, c) Receptor 2DOR con ligando de pinocembrina, d) Receptor 2DOR con ligando de referencia leflunomida y pinocembrina, e) Receptor 2DOR con ligando de tetrahydroxiisoflavona, f) Receptor 2DOR con ligando de referencia leflunomida y tetrahydroxiisoflavona

Figura 4.

Interacciones presentadas entre la escopoletina, pinocembrina y la tetrahydroxiisoflavona con el receptor 2DOR (enzima dihidroorotato deshidrogenasa)

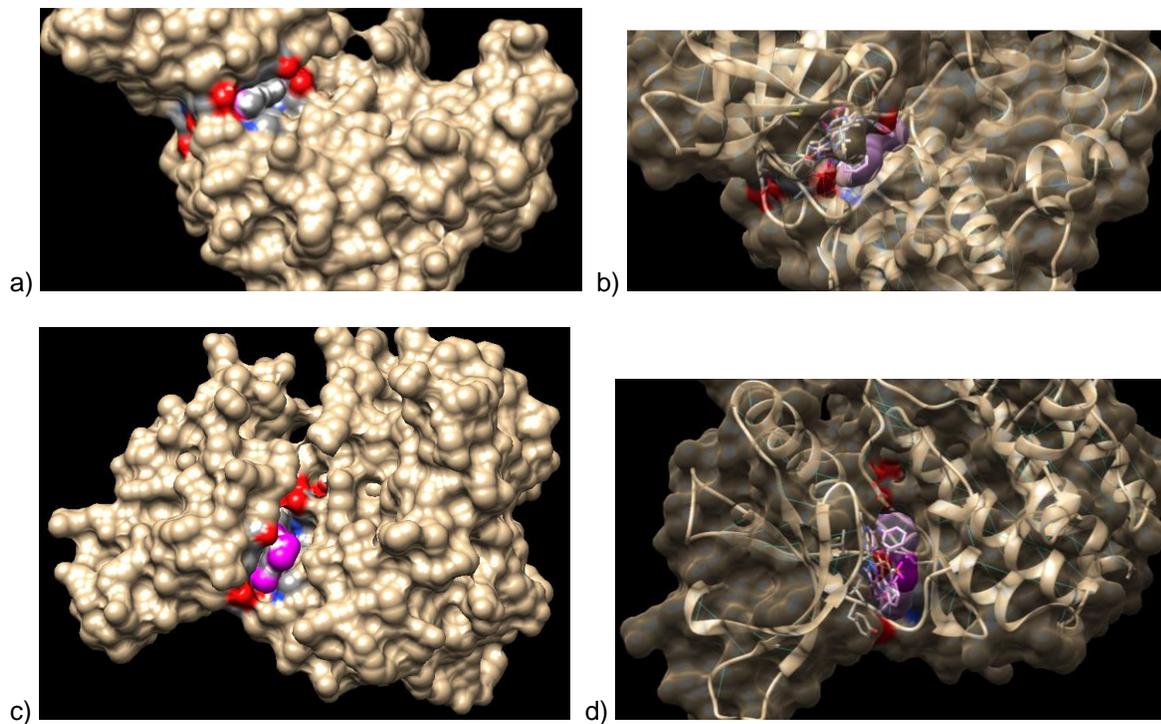




a) Receptor 3N8X con ligando de escopoletina, b) Receptor 3N8X con ligando de referencia nimesulida y escopoletina, c) Receptor 3N8X con ligando de pinocembrina, d) Receptor 3N8X con ligando de referencia nimesulida y pinocembrina, e) Receptor 3N8X con ligando de tetrahidroxiisoflavona, f) Receptor 3N8X con ligando de referencia nimesulida y tetrahidroxiisoflavona

Figura 5.

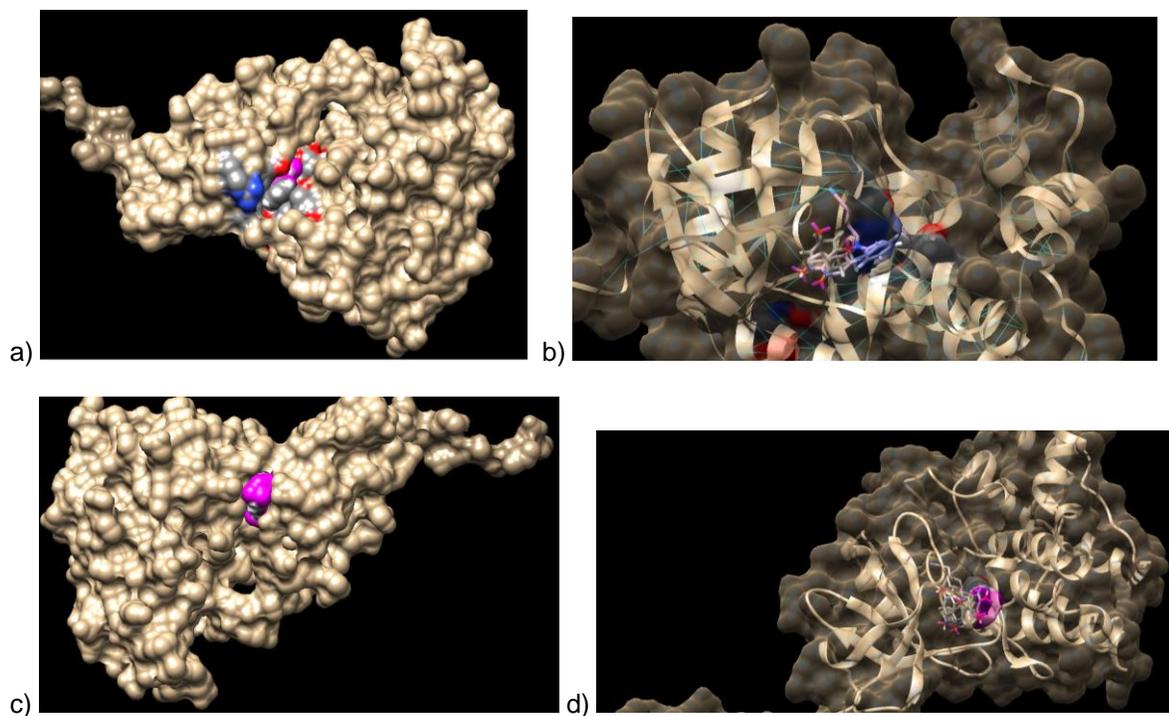
Interacciones presentadas entre la escopoletina, pinocembrina y la tetrahidroxiisoflavona con el receptor 3N8X (ciclooxigenasa-1)



a) Receptor 4YTC con ligando de escopoletina, b) Receptor 4YTC con ligando de referencia decernotinib y escopoletina, c) Receptor 4YTC con ligando de pinocembrina, d) Receptor 4YTC con ligando de referencia decernotinib y pinocembrina

Figura 6.

Interacciones presentadas entre la escopoletina y pinocembrina con el receptor 4YTC (Janus quinasa, JAK)



a) Receptor 4IVC con ligando de pinocembrina, b) Receptor 4IVC con ligando de referencia baricitimib y pinocembrina, c) Receptor 4IVC con ligando de tetrahidroxiisoflavona, f) Receptor 4IVC con ligando de referencia baricitimib y tetrahidroxiisoflavona

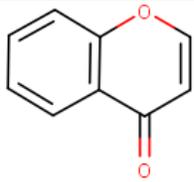
Figura 7.

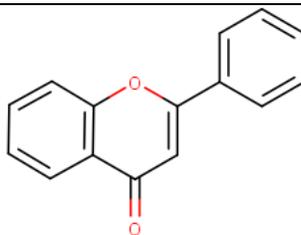
Interacciones presentadas entre la pinocembrina y la tetrahidroxiisoflavona con el receptor 4IVC (Janus quinasa, JAK1)

La incorporación de grupos funcionales en puntos determinados de la estructura base, puede llevar a un aumento de efecto farmacológico, modificación de aspectos farmacocinéticos o reducción de toxicidad; siendo importante evaluar los mismos para proponer nuevas moléculas a partir de las estructuras base analizadas. En la tabla 6 se presentan los posibles sustituyentes que se pueden incorporar en la estructura base y así optimizar la acción farmacológica de los compuestos analizados.

Tabla 6.

Propuestas de modificaciones estructurales a mejorar el efecto antiinflamatorio de las estructuras base.

Compuestos	R1	R2
	-OH	-OH
	-OCH ₃	-OCH ₃
	-OCH ₂ CH ₃	-OCH ₂ CH ₃
	-CCC	-CCC
	-F	-F



-OH	-OH
-OCH ₃	-OCH ₃
-OCH ₂ CH ₃	-OCH ₂ CH ₃
-CCC	-CCC
-F	-F

16. Análisis y discusión de resultados:

Para optimizar las oportunidades de desarrollar nuevos medicamentos, tanto la industria como la academia han desarrollado numerosas estrategias para identificar moléculas bioactivas, así como blancos terapéuticos a gran escala. Entre los múltiples escenarios posibles, uno de ellos es la necesidad de caracterizar los blancos para los ligandos bioactivos ya conocidos.

Los fármacos antiinflamatorios pueden interferir en los procesos patofisiológicos de la inflamación y así disminuir el daño en los tejidos y proveer mayor confort a las personas. Por lo tanto, es importante señalar que debido a la existencia de un gran número de especies disponibles para investigación el éxito de desarrollar nuevos fármacos a partir de productos naturales dependerá de un esfuerzo multidisciplinario para identificar nuevas moléculas. (Nunes, CR et al., 2020)

En el caso de los compuestos estudiados en esta investigación, se encontró una potente actividad antiinflamatoria, la cual fue caracterizada por medio de ensayos con animales, sin embargo, la caracterización de los blancos terapéuticos es necesaria para comprender su mecanismo de acción, relación estructura-actividad, incluso su toxicidad, así como para guiar la optimización estructural de los mismos. (Simão Da Silva et al., 2012)

En el proceso global de la inflamación intervienen muchos mecanismos, algunos mediados por una variedad de moléculas de señalización como consecuencia de la interacción con la superficie celular y los receptores/sensores intracelulares, además de la activación de los factores de complemento. Los mediadores pertenecen a diferentes clases químicas, tales como aminas biógenas (histamina, serotonina), proteínas y péptidos (enzimas hidrolíticas, citoquinas, factores de crecimiento, factores activadores de colonia, factores de complemento, anticuerpos, quininas), especies reactivas de oxígeno (ROS, anión superóxido, hidróperóxido, radicales hidroxilos), y lípidos (factores activadores de plaquetas, prostanoides, leucotrienos) (Gómez, H. et al., 2011). Estas estructuras proteicas cumplen un importante papel en el proceso de la inflamación y es por ello que fueron estudiadas como potenciales receptores para los metabolitos ensayados.

El entendimiento de cómo el proceso inflamatorio es activado y cómo es contenido son elementos claves para desarrollar estrategias para bloquear o reducir la respuesta inflamatoria (Estrada, H. et al., 2011).

Con respecto al espacio químico inmensamente grande que cubren los receptores que son posibles blancos terapéuticos se hace imposible probarlos todos, incluso con técnicas computacionales es necesario seleccionar cuáles deben cubrirse en un ensayo de tamizaje *in silico*; por esta razón, se realizó una investigación documental la cual se presentó de forma sintetizada en el marco teórico de este trabajo, y en base a esta se seleccionaron las proteínas que aparecen listadas en la Tabla 1 de los resultados.

Dentro de las proteínas seleccionadas se encuentran enzimas ampliamente estudiadas que participan en la generación de los mediadores de la inflamación, como la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa y la fosfolipasa A2, receptores de glucocorticoides y proteínas que se unen a estos, entre algunos otros tipos de receptores.

De cualquier forma, es necesario recordar que se requiere un traslape entre los receptores reales involucrados en el efecto de estos metabolitos y las estructuras disponibles que computacionalmente pueden ser ensayadas, el tamizaje *in silico* es una estrategia que puede fallar en reconocer receptores huérfanos. (Muller et al., 2006)

El protocolo descrito en la metodología de este estudio generó un ranking final de afinidad de cada metabolito con cada una de las proteínas ensayadas, se podría decir que están ordenadas en cuanto a su capacidad de acomodar a cada ligando.

La proteína que obtuvo el punteo más alto fue la dihidroorotato deshidrogenasa (2DOR). Esta enzima cataliza la oxidación de dihidroorotato a orotato, en la ruta de síntesis de las pirimidinas. El inhibidor más conocido de esta enzima, la leflunomida fue aprobada para su uso en medicina humana en el tratamiento de la artritis reumatoide hace más de 10 años y es un inmunosupresor. Este inhibidor se une al canal hidrofóbico de la enzima, las interacciones más relevantes son mediadas por moléculas de agua, hacia el residuo arginina-136 y un puente de hidrógeno con la tirosina-356. En el ensayo de docking realizado, los tres metabolitos quedaron dentro del canal hidrofóbico, bastante cerca del inhibidor conocido, las interacciones obtenidas no coinciden con las reportadas para la leflunomida. El punteo más alto con este receptor fue obtenido por la 5,7,3',4'- Tetrahidroxiisoflavona, y sus interacciones más importantes fueron dos puentes de hidrógeno, uno hacia la valina-192 y otro con la tirosina-272. (Munier-Lehmann et al., 2013)

Otra enzima que ocupó los primeros lugares para todos los ligandos y tiene un papel bien definido en la cascada de la inflamación es la ciclooxigenasa-1 (3N8X), en este caso el ligando de referencia fue la Nimesulida, un antiinflamatorio, con efectos analgésico y antipirético. La difracción de rayos X elucidó que este inhibidor se halla dentro del sitio activo de la enzima, las

interacciones modeladas fueron un átomo azufre junto a Arg120, el grupo metilo junto a Tyr355. Mientras que el anillo de ciclohexano se extendía hacia el sitio activo cerca de Ser530. En la pose predicha por GOLD para la 5,7,3',4'- Tetrahidroxiisoflavona, esta se superpone con el inhibidor en el anillo C y A, incluso el oxígeno se encuentra en la misma posición. (Sidhu et al., 2010)

Con respecto a las Janus quinasas (4E5W, 3EYG, 4IVC, 4I5C, 4RIO, 5TQ6, 4YTC), aparecen muchas veces en el top de las proteínas mejor puntuadas por el GoldScore. Los inhibidores de Janus quinasas bloquean la transcripción genómica resultante de la interacción entre las citoquinas y sus receptores en superficie celular disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF α . Los estudios de relación estructura-actividad para los inhibidores de JAK-1 y JAK-2 revelan que es importante la unión a la región “bisagra” (residuos Glu957 y Leu959), así como la ocupación de una bolsa lipofílica cerca de Leu1010, también hay un giro P entre Gly887 y Lys908 (catalítica), los contactos tipo puente de hidrógeno o electrostáticos con esta zona son importantes en la potencia de varios inhibidores. En el resultado modelado por el docking para la pinocembrina y la tetrahidroxiisoflavona se observa que el anillo C de ambos flavonoides queda dentro de la región bisagra, mientras que la región de los anillos A y B está orientada a la región del giro P con algunos puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo del flavonoide. En el caso de la pinocembrina se observa un comportamiento similar en cuanto a los puentes de hidrógeno del lado de los anillos A y B, aunque la ausencia de polaridad en el lado del anillo C reduce la puntuación del mismo en el ranking. Para la escopoletina, por ser una molécula más pequeña, solo puede introducirse en la región del giro P, y formar un puente de hidrógeno, pero no logra interactuar de ninguna forma con la región de la bisagra (Kulagowski et al., 2012).

El receptor de glucocorticoides (4LSJ, 1NHZ, 6DXK) es un receptor delicado, ya que los ligandos que se unen a este deben ser selectivos para evitar efectos colaterales debido a su potencial unión a receptores relacionados a hormonas esteroideas, el sitio de unión de los ligandos esteroideos para este receptor está formado por los residuos hidrofóbicos en las hélices alfa-3, 6, 8 y 11. En las poses modeladas por el docking para la tetrahidroxiisoflavona se observa una superposición clara entre los anillos del flavonoide y los del ligando en el complejo cristalizado, la tetrahidroxiisoflavona forma además un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del anillo C y la metionina 79 de la hélice 3, así mismo los anillos A y B se orientan hacia la hélice 11, y el hidroxilo de la posición 5 forma un puente de hidrógeno con leucina 99 de este dominio. Aunque la superposición es menos exacta en el caso de la pinocembrina, se observa que esta ocupa la misma posición que el ligando entre las hélices antes mencionadas, y solo se forma un puente de hidrógeno con leucina 34 en la hélice 8. Para el caso de la escopoletina, vemos que aunque también es capaz de introducirse en el mismo espacio que los otros dos flavonoides y los inhibidores sintéticos, no se modela ninguna interacción tipo puente de hidrógeno o electrostática, lo que se refleja en la función de puntuación (Brzozowski et al., 1997; Carson et al., 2014).

El diseño de novo de derivados de los metabolitos estudiados es un objetivo importante de este trabajo, ya que puede ayudar a la selección de candidatos que se evaluarán en estudios posteriores *in vitro* o *in vivo*, actualmente existe un mercado comercial de moléculas ya sintetizadas que pueden comprarse para utilizarse en pruebas *in vitro* o en modelos animales, y una optimización estructural *in silico* puede guiar una decisión de compra.

Se construyeron 432 derivados a partir de las estructuras de los metabolitos, los sitios de sustitución y los grupos utilizados se resumen en la Tabla 6. Para tener un fármaco efectivo, una molécula con la actividad biológica deseada, con una potencia suficiente, y que carezca de toxicidad, que alcance el blanco farmacológico en una concentración adecuada y permanezca en este sitio suficiente tiempo para desencadenar una respuesta biológica, se evaluó por medio de la herramienta SwissADME (Daina et al., 2017).

La absorción intestinal y el acceso al encéfalo son dos de los factores farmacocinéticos esenciales a estimar en moléculas con actividad antiinflamatoria como las que se evaluaron en este estudio, en las predicciones hechas por el algoritmo de SwissADME todos los derivados tendrían una buena absorción gastrointestinal, esto debido a su peso molecular y a su capacidad para protonarse y desprotonarse según el pH del medio que los rodea. Por otro lado, en la evaluación de permeabilidad por la barrera hemato-encefálica, el modelo predijo que doce de los derivados producidos no tendrían permeabilidad para atravesar esta barrera. Por lo que no presentarían una actividad analgésica central.

El trabajo pionero de Lipinski et al. examinó compuestos activos por vía oral para definir rangos fisicoquímicos para una alta probabilidad de ser un fármaco oral (es decir, la *druglikeness*). Derivado de este trabajo se genera la *regla de cinco* que delineó la relación entre parámetros farmacocinéticos y fisicoquímicos.

17. Conclusiones

- 17.1 Los tres metabolitos de estudios presentaron un buen acoplamiento en el canal hidrofóbico de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (2DOR). Esta enzima cataliza la oxidación de dihidroorotato a orotato, en la ruta de síntesis de las pirimidinas, teniendo una interacción muy parecida a la que presenta el inhibidor leflunomida.
- 17.2 El metabolito 5,7,3',4'- tetrahidroxiisoflavona fue el que presentó los punteos de interacción más elevados entre cada uno de los receptores analizados. Por lo que es este metabolito el que ejerce mayor efecto antiinflamatorio, se infiere que es el responsable de este efecto farmacológico en el laurel.
- 17.3 Una ventaja del tamizaje *in silico* es que, actualmente existe un mercado comercial de moléculas ya sintetizadas que pueden comprarse para utilizarse en pruebas *in vitro* o en

modelos animales, y una optimización estructural *in silico* puede guiar una decisión de compra.

18. Impacto esperado

Los resultados generados permitieron caracterizar la interacción de las tres moléculas de características fenólicas identificadas en *Litsea guatemalensis* sobre los receptores involucrados con la respuesta de biológica de la inflamación, determinando qué molécula es la responsable del efecto antiinflamatorio ya reportado por la especie por métodos *in vivo*. Así mismo se estableció el posible mecanismo de acción antiinflamatorio de las moléculas al determinar el receptor al que se acopla para producir dicho efecto. Esto es de importancia ya que se propuso modificaciones estructurales para potencializar el efecto antiinflamatorio que se determinó en las moléculas de estudio, y así encontrar alternativa de tratamiento de patologías de inflamación crónica como la artritis y el reumatismo. En busca de tener alternativas de moléculas con mayor efecto terapéutico y menos efectos secundarios, al tener un mejor conocimiento de su interacción con el receptor y posteriores modificaciones estructurales.

19. Referencias

- Agrawal, N., Choudhary, A. S., Sharma, M. C., & Dobhal, M. P. (2011). Chemical constituents of plants from the genus *Litsea*. *Chemistry & Biodiversity*, 8:223–243.
- Aurélien F.A. Moumbock, Jianyu Li, Pankaj Mishra, Mingjie Gao, Stefan Günther (2019). Current computational methods for predicting protein interactions of natural products. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1367-1376, Doi.org/10.1016/j.csbj.2019.08.008.
- Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.2.0. <http://avogadro.cc/>
- Balakumar, C., Lamba, P., Kishore, D. P., Narayana, B. L., Rao, K. V., Rajwinder, K., ... & Narsaiah, B. (2010). Synthesis, anti-inflammatory evaluation and docking studies of some new fluorinated fused quinazolines. *European journal of medicinal chemistry*, 45(11), 4904-4913.
- Bortolini K., Klein-Junior L., Cruz S., Cáceres A., Meira N., Monache F., Cechinel-Filho V. (2011). Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic evaluation of the condiment laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) and its chemical composition. *Food Chemistry* 132: 1980-1986. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.036
- Brzowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. Å., & Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652), 753–758. <https://doi.org/10.1038/39645>
- Carson, M. W., Luz, J. G., Suen, C., Montrose, C., Zink, R., Ruan, X., Cheng, C., Cole, H., Adrian, M. D., Kohlman, D. T., Mabry, T., Snyder, N., Condon, B., Maletic, M.,

- Clawson, D., Pustilnik, A., & Coghlan, M. J. (2014). Glucocorticoid receptor modulators informed by crystallography lead to a new rationale for receptor selectivity, function, and implications for structure-based design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(3), 849–860. <https://doi.org/10.1021/jm401616g>
- Cisneros, Y., Neto, A., Chávez, S., Rodríguez, E., Ramírez, A., & Dueñas, Y. (2020). Farmacología de glucocorticoides empleados en el tratamiento de la COVID-19. *Revista de Toxicología en Línea*, 62, 42-56.
- Cockrell A., Steiner M., Henderson F., Perrin E. (2010) Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood. *Pediatrics*. 125: 801-809.
- Cuesta, S., Vela, C., Morocho, S., & Meneses, L. (2017). Modelación molecular de la interacción del paracetamol y el 4-aminofenol con las enzimas Ciclooxygenasa 1 y 2. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 38(2), 97-105.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(October 2016), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking
- Feghali C.A., Wright T.M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience*. 2:2-26.
- Fenu, L., Lewis, R., Good, A., Bodkin, M., & Essex, J. (2007). Chapter 9: Scoring Functions: From Free-energies of Binding to Enrichment in Virtual Screening. En H. Dhoti, & A. R. Leach, *Structure-Based Drug Discovery* (págs. 223–246). Dordrecht: Springer.
- G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach and R. Taylor, *J. Mol. Biol.*, 267, 727-748, 1997
[\[DOI: 10.1006/jmbi.1996.0897\]](https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897)
- García L., Rojo D., García L., Hernández M. (2002). Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana Investigación Biomedica*. 21(3):214-216.
- Garcia-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. (2007). The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal Pharmacology*. 557: 221-229.
- Guillamón, E. (2018). Efecto de compuestos fitoquímicos del género *Allium* sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. *Ars Pharmaceutica*, 59(3), 185-196.
- Güler, H., & Kara, Y. (2020). Targeting CoV-2 Spike RBD: ACE-II Complex with Phenolic Compounds from *Cistus* (*Cistus L.*) Bee Pollen for COVID-19 Treatment by Molecular Docking Study. *Journal of Apitherapy and Nature*, 3(1), 10-23.
- Hanieh, H., Hairul, V., Saravanan, S., Chellappandian, M., Ragul, K., Durga, A., . . . Thirugnanasambantham, K. (2017). Pinocembrin, a novel histidine decarboxylase inhibitor with anti-allergic potential in in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 814, 178-186.
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor. *Journal of Cheminformatics*, doi: 10.1186/1758-2946-4-17.
- Honmore, V. S., Kandhare, A. D., Kadam, P. P., Khedkar, V. M., Sarkar, D., Bodhankar, S. L., ... & Natu, A. D. (2016). Isolates of *Alpinia officinarum* Hance as COX-2 inhibitors:

- Evidence from anti-inflammatory, antioxidant and molecular docking studies. *International immunopharmacology*, 33, 8-17.
- Hwuang JK., Choi EM., & Lee J. (2005). Antioxidant activity of *Litsea cubeba*. *Fitoterapia* 76: 684-686. doi.org/10.1016/j.fitote.2005.05.007
- Jain, A. N. (2006). Scoring functions for protein-ligand docking. *Current Protein & Peptide Science*, 407-420.
- James C. Phillips, David J. Hardy, Julio D. C. Maia, John E. Stone, Joao V. Ribeiro, Rafael C. Bernardi, Ronak Buch, Giacomo Fiorin, Jerome Henin, Wei Jiang, Ryan McGreevy, Marcelo C. R. Melo, Brian K. Radak, Robert D. Skeel, Abhishek Singharoy, Yi Wang, Benoit Roux, Aleksei Aksimentiev, Zaida Luthey-Schulten, Laxmikant V. Kale, Klaus Schulten, Christophe Chipot, and Emad Tajkhorshid. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *Journal of Chemical Physics*, 153:044130, 2020. doi:10.1063/5.0014475
- Jiménez-Pérez, N. C., & Lorea-Hernández, F. G. (2009). Identity and delimitation of the American species of *Litsea Lam* (Lauraceae): A morphological approach. *Plant Systematics & Evolution*, 283:19–32.
- Kashyap, P., Ram, H., Shukla, D., & Kumar, S. (2020). Scopoletin: Antiamyloidogenic, Anticholinesterase, and Neuroprotective Potential of a Natural Compound Present in *Argyrea speciosa* Roots by In Vitro and In Silico Study. *Neuroscience Insights*, 15, 1-10.
- Knox, A. J., Meegan, M. J., Sobolev, V., Frost, D., Zisterer, D. M., Williams, D. C., & Lloyd, D. G. (2007). Target specific virtual screening: Optimization of an estrogen receptor screening platform. *Journal of Medicinal Chemistry*, 5301-5310.
- Kulagowski, J. J., Blair, W., Bull, R. J., Chang, C., Deshmukh, G., Dyke, H. J., Eigenbrot, C., Ghilardi, N., Gibbons, P., Harrison, T. K., Hewitt, P. R., Liimatta, M., Hurley, C. A., Johnson, A., Johnson, T., Kenny, J. R., Bir Kohli, P., Maxey, R. J., Mendonca, R., ... Zak, M. (2012). Identification of imidazo-pyrrolopyridines as novel and potent JAK1 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(12), 5901–5921. <https://doi.org/10.1021/jm300438j>
- Kumar, V., Abbas, A., & Aster, J. (2013). *Robbins. Patología Humana* (Novena ed.). Barcelona: Elsevier.
- Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. (2005). Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem. Pharmacol.* 69: 395-406.
- Lee, M. Y., Seo, C. S., Lee, J. A., Shim, S., Kim, S. J., Ha, H., Shin, H. K. (2011). *Alpinia katsumadai* H(AYATA) seed extract inhibit LPS-induced inflammation by induction of heme oxygenase-1 in RAW 264.7 cells. *Inflammation*, (In press: doi:10.1007/s10753-011-9370-0).
- Lee, M., & Kim, D. (2012). Large-scale reverse docking profiles and their applications. *BMC Bioinformatics*, S6.
- Lengauer, T., & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*, 402-406.

- López-Sanromán, A., Esplugues, J., & Domènech, E. (2021). Farmacología y seguridad de tofacitinib en colitis ulcerosa. *Gastroenterología y Hepatología*, 44, 39-48.
- Mahattanadula, S., Ridditid, W., Nima, S., Phdoongsombut, N., Ratanasuwend, P., & Kasiwonga, S. (2011). Effects of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 134: 243–250.
- Marvin (version 19.17.0), developed by ChemAxon, <http://www.chemaxon.com/products/marvin/>, 2019.
- Medina-Franco, J.L.(2013).Advances in computation approaches for drug discovery based on natural products. *Revista Latinoamericana de Química*, 41(2), 95-110
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(24), 428-435.
- Meneses, L., & Cuesta, S. (2015). Determinación computacional de la afinidad y eficiencia de enlace de antiinflamatorios no esteroideos inhibidores de la ciclooxigenasa-2. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 36(1-2), 17-25.
- Meng, F., Liu, R., Gao, M., Wang, Y., Yu, X., Xuan, Z., et al. (2011). Pinocembrin attenuates blood-brain barrier injury induced by global cerebral ischemiareperfusion in rats. *Brain Research*, 19(1391): 93–101.
- Mosquera, J. (2020). Artritis idiopática juvenil sistémica. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Pediatría*, 2, 61-75.
- Muller, P., Lena, G., Boilard, E., Bezzine, S., Lambeau, G., Guichard, G., & Rognan, D. (2006). In Silico -Guided Target Identification of a Scaffold-Focused Library: 1,3,5-Triazepan-2,6-diones as Novel Phospholipase A2 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(23), 6768–6778. <https://doi.org/10.1021/jm0606589>
- Munier-Lehmann, H., Vidalain, P. O., Tangy, F., & Janin, Y. L. (2013). On dihydroorotate dehydrogenases and their inhibitors and uses. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(8), 3148–3167. <https://doi.org/10.1021/jm301848w>
- Nathan CF. (1987). Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *Journal Clinical Investigation*. 80: 1550 – 1560
- Organización Mundial de la Salud. (2002). Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional2002-2005. WHO/EDM/TRM/ 2002.1. Ginebra.
- Pacho, M., D’Accorso, N., Damonte, E., & García, C. (2018). Síntesis de nuevas formulaciones para la vehiculización de la curcumina como estrategia antiviral para el tratamiento de las infecciones causadas por el virus Zika. *Ponencia Mendoza*.
- Pearlman, D. S. (1999). Pathophysiology of the inflammatory response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(4 Pt 1), S132–S137. <https://doi.org/S0091674999005801>
- Pettersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., & Ferrin, T. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 1605-1612.
- Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., . . . Singharoy, A. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *Journal of Chemical Physics*, doi:10.1063/5.0014475.
- Quintero E. (2000). Efectos de los AINE sobre la mucosa gastrointestinal. *Revista Española Reumatol*. 27:19-24.

- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ramírez, M., Dranguet, D., & Morales, J. (2020). Actividad antiinflamatoria de plantas medicinales. *Revista Granmense de Desarrollo Local*, 16, 320-332.
- RDKit: Open-source cheminformatics developed by Greg Landrum; <http://www.rdkit.org>, 2018.
- Regalado, A., & Sánchez, L. (2015). Plantas cubanas con efecto antiinflamatorio. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(1), 156-164.
- Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. (5 de julio de 2018). Homepage. Obtenido de The Protein Data Bank: <https://www.rcsb.org>
- Ribeiro D., Freitas M., Tomé S., Silva A., Laufer S., Lima J., Fernandes E. (2014). Flavonoids Inhibit COX-1 and COX-2 Enzymes and Cytokine/Chemokine Production in Human Whole Blood. *Inflammation* DOI: 10.1007/s10753-014-9995-x
- Rollinger, J., Stuppner, H., & Langer, T. (2008). Virtual screening for the discovery of bioactive natural products. *Progress in Drug Research*, 213-249.
- Sala, A., Recio, M. C., Schinella, G. R., Máñez, S., Giner, R. M., Cerdá-Nicolás, M., et al. (2003). Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology*, 461: 53–61.
- Salaria, D., Rolta, R., Sharma, N., Dev, K., Sourirajan, A., & Kumar, V. (2020). In silico and In vitro evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant potential of Cymbopogon citratus from North-western Himalayas. *bioRxiv* .
- Saldaña, M., Torres-Camacho, P., & Arellano, M. (2017). Uso de metotrexato, azatioprina y micofenolato de mofetilo en dermatología. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 15(1), 45-54.
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Drug discovery and development: A computational approach. *Educación Química*, 51-58.
- Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., & Schroeder, M. (2015). PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research*, W443–W447.
- Santiago, D., Pevzner, Y., Durand, A. A., Tran, M., Sherrer, R., Daniel, K. G., . . . Brooks, W. H. (2012). Virtual Target Screening: Validation Using Kinase Inhibitors.
- Schrödinger Release 2020-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.
- Schrödinger, L. (2020). Maestro Release 2020-4. New York, NY.
- Selvam, C., Jachak, S. M., Thilagavathi, R., & Chakraborti, A. K. (2005). Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15(7), 1793-1797.
- Shen, J., Xu, X., Cheng, F., Liu, H., Luo, X., Shen, J., Chen, K., Zhao, W. (2003). Virtual Screening on Natural Products for Discovering Active Compounds and Target Information. *Current Medicinal Chemistry*, 2327-2342
- Sidhu, R. S., Lee, J. Y., Yuan, C., & Smith, W. L. (2010). Comparison of cyclooxygenase-1 crystal structures: Cross-talk between monomers comprising cyclooxygenase-1 homodimers. *Biochemistry*, 49(33), 7069–7079. <https://doi.org/10.1021/bi1003298>
- Simão Da Silva, K. A. B., Klein-Junior, L. C., Cruz, S. M., Cáceres, A., Quintão, N. L. M., Monache, F. D., & Cechinel-Filho, V. (2012). Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic

- evaluation of the condiment laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) and its chemical composition. *Food Chemistry*, 132(4), 1980–1986. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.036>
- Sousa, S., Ribeiro, A., Coimbra, J., Neves, R., Martins, S., Moorthy, N., . . . Ramos, M. J. (2013). Protein-Ligand Docking in the New Millennium – A Retrospective of 10 Years in the Field. *Current Medicinal Chemistry*, 2296-2314.
- The Kanji Foundry Press. (2017). Illustrated Companion to Pharmacology. Obtenido de <http://www.thekanjifoundrypress.com/e.html>
- UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605-12
- Valdés-Izaguirre, L., Arias-Cedeño, Q., Ramírez-Arzuaga, J., & Peña-Fuentes, D. (2018). Actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro de extractos etanólicos de *Jatropha aethiopica* Müell Arg var *inermis*. *Revista Cubana de Química*, 30(3), 440-453.
- Vallverdú, C., Vila, R., Cruz, S., Cáceres, A., & Cañigual, S. (2005). Composition of the essential oil from leaves of *Litsea guatemalensis*. *Flavour and Fragrances Journal*, 20:415–418.
- Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., & Taylor, R. D. (2003). Improved Protein–Ligand Docking Using GOLD. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 609–623.
- Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang Y, Booren AM, Gray JI, DeWitt DL. (1999). Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *Journal Natural Product*. 62: 294-296.
- Wang H. & Liu L. (2010). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Different Parts of *Litsea cubeba*. *Chemistry & Biodiversity*. 7: 229–235. doi.org/10.1002/cbdv.200800349
- Wang, H., Liao, PC., Lin, Chou JC., & Su YC. (2010). Composition and antimicrobial activity of the leaf and twig oils of *Litsea mishaensis* and *L. linii* from Taiwan. *Natural Product Communications*. 5(11):1823-1828.
- Wyss-Conray, T. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nature Medicine*, Vol.12:1005–1015. <https://doi.org/10.1038/nm1484>
- Xu, X., Huang, M., & Zou, X. (2018). Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges. *Biophysics Reports*, 1-16.
- Zambrano-Vázquez, O., Carrasco-Gamboa, A., Aguilar, A., Hernández-Portilla, L., & Jiménez-Arellanes, M. (2017). Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana del extracto orgánico de *Cnidocolus tehuacanensis* Breckon y su fraccionamiento químico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(3), 56-66.
- Zappia, C., Granja-Galeano, G., Fernández, N., Shayo, C., Davio, C., Fitzsimons, C., & Monczor, F. (2015). Effects of histamine H1 receptor signaling on glucocorticoid receptor activity. Role of canonical and non-canonical pathways. *Scientific Reports*, 5(17476).
- Zhang, Q., Li, R., Liu, J., Peng, W., Gao, Y., Wu, C., & Pu, X. (2019). In silico screening of anti-inflammatory constituents with good drug-like properties from twigs of *Cinnamomum*

- cassia based on molecular docking and network pharmacology. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* October, 18(10), 2125-2131.
- Zhaoa, X.-Y., Wanga, G., Wanga, Y., Tiana, X.-G., Zhaoc, J.-C., Huoa, X.-K., . . . Wang, X. (2018). Chemical constituents from *Alisma plantago-aquatica* subsp. *orientale* (Sam.) Sam and their anti-inflammatory and antioxidant activities. *Natural Product Research*, 32(23), 2749-2755.
- Zoete, V., Grosdidier, A., & Michielin, O. (2009). Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. *Journal of cellular and molecular medicine*, 238-248.

Presentación del proyecto y resultados parciales, noviembre 2020
Segundo encuentro científico
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia



Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Lucrecia Margarita Peralta <u>Azmitia</u> de Madriz	
María Nereida Marroquín <u>Tintí</u>	
Lesbia Mengala Guerra Urizar	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Allan Ronaldo Vásquez Bolaños	Investigador	2012 0126	X		
Otto Roberto Polanco Morán	Auxiliar de investigación	2020 1090	X		

Guatemala 26 de febrero de 2021



Licenciada Lucrecia Margarita Peralta de Madriz, M.A
Coordinadora
Proyecto de Investigación



Ing. Liuba María Cabrera Ovalle de Villagrán
Coordinadora
Programa Universitario de Investigación



Ing. MARN Julio Rufino Salazar Pérez
Coordinador General de Programas
Digi USAC

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas