



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

LABORATORIO DE SIMULACIONES COMPUTACIONALES

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO  
FARMACOBIOLOGO

ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE UN DERIVADO DE TIMOL  
COMO LIGANDO DE EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS O  
ANALGESICOS EXTRAIDO DE LA PLANTA *Ageratina glabrata*,  
*Asteraceae* (SIN. *Eupatorium glabratum* Kunth)

PRESENTA

p.Q.F.B. JORDAN EDILBERTO RUIZ CASTELAN

DIRECTOR DE TESIS  
DR. THOMAS R. F. SCIOR JUNG

FECHA

JUNIO 2015

## INDICE

	Pág.
1. Introducción	1
1.1. Inflamación	1
1.2. Inflamación aguda	2
1.2.1. Estímulos para la inflamación	3
1.2.2. Reconocimiento de microbios, células muertas y sustancias extrañas	3
1.2.3. Reclutamiento leucocitario	5
1.2.4. Activación de leucocitos	7
1.3. Inflamación crónica	9
1.3.1. Células y mediadores de la inflamación crónica	11
1.3.2. Macrófagos	11
1.3.3. Linfocitos	13
1.3.4. Otras células	14
1.3.5. Reparación de los tejidos	15
1.4. La planta de Interés	16
1.5. Fundamento Fitoquímico	17
1.6. Terpenos	21
1.6.1. Síntesis de Terpenos	21
1.6.2. Síntesis en el cloroplasto	21
1.6.3. Síntesis en el citoplasma	22
1.7. Flavonoides	25
1.7.1. Flavonoides en el sistema nervioso central	25
1.7.2. Flavonoides en la inflamación	26
1.8. El monoterpeno a Estudiar	26
1.9. Blancos Biomoleculares a Emplear	27
1.10. Receptor Opioide	30
1.10.1. Receptor opioide $\mu$	30
1.10.2. Función clásica del receptor opioide	32
1.11. Ciclooxygenasas	33
1.11.1. Enzima ciclooxygenasa 1 (COX1) constitutiva expresada	35
1.11.2. Enzima ciclooxygenasa 2 (COX2) inducible	36
1.12. Receptor de Estrógenos	37

1.12.1. Función de los receptores de estrógenos en la respuesta inflamatoria	39
1.12.2. Receptor de estrógenos $\alpha$	41
1.12.3. Receptor de estrógenos $\beta$	41
2. Herramienta a usar denominada acoplamiento ligando-receptor ( <i>Docking</i> )	43
3. Estudio Relación Estructura-Actividad (SAR)	44
4. Justificación	45
5. Hipótesis	48
6. Objetivos general	48
6.1. Objetivos particulares	48
7. Diagrama de trabajo	49
8. Metodología	50
9. Resultados	51
9.1. Estudio de tipo SAR ( <i>Structure-Activity Relationship</i> ) de los ligandos presentados	51
9.2. Acoplamiento molecular ligando-receptor ( <i>Docking</i> )	55
9.2.1. Receptor opioide $\mu$	56
9.2.2. Enzima ciclooxigenasa 1 (COX1)	58
9.2.3. Enzima ciclooxigenasa 2 (COX2)	60
9.2.4. Receptor de estrógenos $\alpha$ (ER $\alpha$ )	62
9.2.5. Receptor de estrógenos $\beta$ (ER $\beta$ )	64
9.3. Tablas de energías de interacción	66
10. Discusión de resultados	70
11. Conclusión	72
12. Referencias	73

## GLOSARIO Y ABREVIATURAS

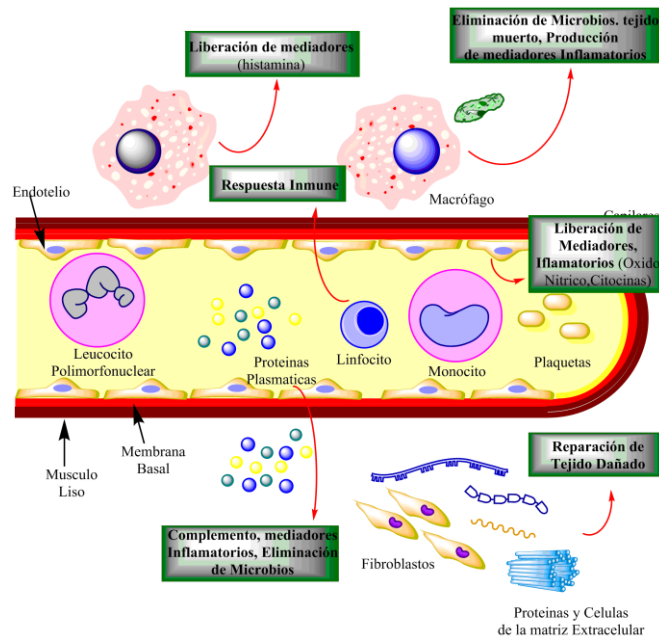
**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.  
**AINES:** Analgésico antiinflamatorio no esteroideo  
**ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero.  
**ATP:** Adenina Trifosfato.  
**BOTIT:** 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi-isobutirato de timilo.  
**C (Cys):** Aminoácido cisteína  
**Cataplasmas:** Vía de administración tópica.  
**COX1:** Enzima ciclooxigenasa 1 o constitutiva.  
**COX2:** Enzima ciclooxigenasa 2 o inducible.  
**DADLE:** [d-Ala2,d-Leu5]-enkephalin.  
**DALA:** [d-Ala2]-Met5-enkephalinamide.  
**DAMGO:** [D-Ala2,MePhe4,Gly(ol)5]enkephalin.  
**DBD:** Dominio de Unión al ADN (*DNA Binding Domin*).  
 **$\Delta G$ :** Energía Libre de Gibbs.  
**Docking:** Acoplamiento molecular.  
**E (Glu):** Aminoácido Ácido glutámico  
**ECM:** proteínas de la membrana extracelular  
**ER:** Receptor de Estrógenos.  
**ER $\alpha$ :** Receptor de Estrógenos alfa.  
**ER $\beta$ :** Receptor de Estrógenos beta.  
**F (Phe):** Aminoácido fenilalanina  
**G (Gly):** Aminoácido glicina  
**H (His):** Aminoácido histidina  
**HSP90:** Proteínas de choque térmico.  
**HSP70:** Proteínas de choque térmico.  
**I (Ile):** Aminoácido isoleucina  
**IL:** Interleucina  
**INF $\gamma$ :** Interferón gama  
**K (Lys):** Aminoácido lisina  
**Kcal/mol:** kilocalorías / mol  
**L (Leu):** Aminoácido leucina  
**LBD:** Dominio de Unión al Ligando (*Ligand Binding Domin*).  
**Ligando:** Molécula que activa una señal cada vez que se une al sitio activo de una proteína.  
**M (Met):** Aminoácido metionina  
**m.s.n.m.:** Metros sobre el nivel del mar.  
**P (Pro):** Aminoácido prolina  
**PG:** Prostaglandina.  
**R (Arg):** Aminoácido arginina  
**S (Ser):** Aminoácido serina  
**TFB:** Proteína chaperona  
**TNF $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral alfa.  
**TXA $_2$ :** Tromboxano A $_2$ .  
**TXB $_2$ :** Tromboxano B $_2$ .  
**V (Val):** Aminoácido valina  
**W (Trp):** Aminoácido triptófano  
**Y (Tyr):** Aminoácido tirosina

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Inflamación

La supervivencia de todos los organismos requiere que eliminen invasores extraños, como agentes infecciosos, y repara el daño a los tejidos. Esas funciones son mediadas por una reacción compleja llamada inflamación. La inflamación es una respuesta protectora que involucra células, riego sanguíneo, proteínas y otros mediadores que estos intentan eliminar la causa inicial del daño celular, así como también las células necróticas y el tejido resultante del daño original, y comenzar con el proceso de reparación (véase **Figura 1**). Este proceso logra su misión protectora, pero primero diluye, destruye o de lo contrario actúa neutralizando agentes (microbios, toxinas). Así la inflamación ayuda a limpiar infecciones y otros estímulos nocivos, la reacción inflamatoria y el subsecuente proceso de reparar pueden ellos mismos causar un considerable daño. Las células y moléculas de defensa, incluyen leucocitos y proteínas del plasma, que normalmente circulan en la sangre, y tienen como objetivo, dentro de la reacción inflamatoria, llegar y reclutar más células al sitio de daño, las células y proteínas que se encuentran en del tejido vascular y las proteínas de la matriz extracelular (ECM) también participan envueltas en los procesos de inflamación y reparación.

La inflamación puede ser crónica o aguda;



**Figura 1.** Representación de los componentes que intervienen en la inflamación aguda y crónica, y sus principales funciones [tomada de Kumar V, *et al.*, 2013]

## 1.2. Inflamación aguda

Este tipo de reacción inflamatoria es rápida y de corta duración, esta puede durar desde unos pocos minutos hasta unos días, y es caracterizada por exudación de fluido y proteínas plasmáticas así como también una acumulación predominante de neutrófilos. Dentro de esta, los leucocitos y las proteínas plasmáticas son los que responden más rápido en los sitio de daño. Se presentan dos cambios mayoritarios:

- **Cambios vasculares:** alteraciones en el calibre de las venas resultando en el incremento del flujo vascular (vasodilatación) y cambio en la pared venosa que permite a las proteínas plasmáticas terminar con la circulación (aumento en la permeabilidad vascular). En adición, la activación de las células endoteliales como resultando en el incremento de la adhesión de los leucocitos y migración de estos a través de la pared vascular.
- **Eventos celulares:** la migración de los leucocitos desde la circulación y acumulación en el foco de daño (reclutamiento celular), seguido de la activación de los leucocitos, permitiendo que se eliminen los causantes del

daño. Los principales leucocitos que acuden en la inflamación aguda son los neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares)

### 1.2.1. Estímulos para la inflamación

Las reacciones inflamatorias pueden ser causadas por una variedad de estímulos

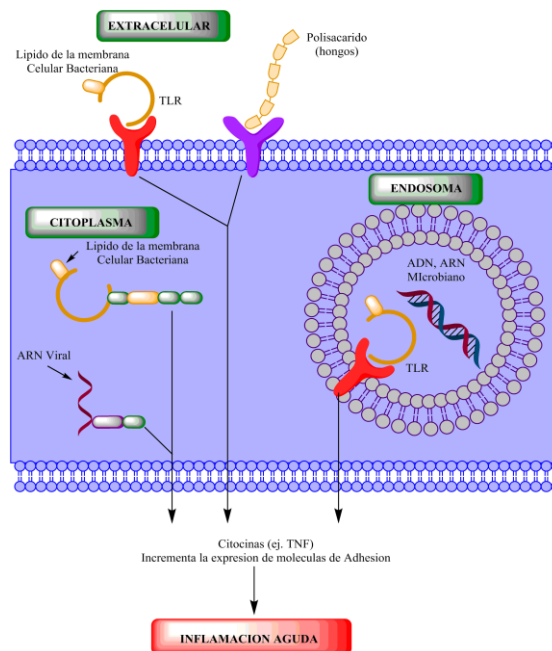
- Infecciones (bacteriana, fúngica, viral, parasítica) es entre las causas médicas más comunes e importantes de la inflamación.
- Traumas (cerrado y penetrante) y varios agentes físicos y químicos (daños térmicos, toxicidad causada por ambientes químicos) que dañan a las células causando reacciones inflamatorias.
- Necrosis epitelial (por cualquier causa), incluyendo isquemia y daños químicos y físicos.
- Cuerpos extraños (suturas, depósitos cristalinos, astillas, suciedad)
- Reacciones inmunitarias (también llamadas reacciones de hipersensibilidad) aumentado por sustancias del medio ambiente. Porque el estímulo de esas respuestas inflamatorias son persistentes, con duración de una inflamación crónica.

### 1.2.2. Reconocimiento de microbios, células muertas y sustancias extrañas

Una cuestión fundamental para la activación de la respuesta inflamatoria es ¿cómo las células reconocen agentes potencialmente dañinos?. Se postula, que los microbios y células muertas pueden provocar alguna especie de “señales peligro” que las células (macrófagos, leucocitos, linfocitos, células NK) logran distinguir de las células normales y movilizar una respuesta. Ahora está establecido que fagocitos, células dendríticas, células endoteliales y la mayor parte de las células expresan un receptor que está diseñado para interactuar con patógenos infecciosos y sustancias relacionadas con células muertas. Este tipo de receptor es llamado “receptores de patrón de reconocimiento” (*pattern recognition receptors*), existen dos tipos:

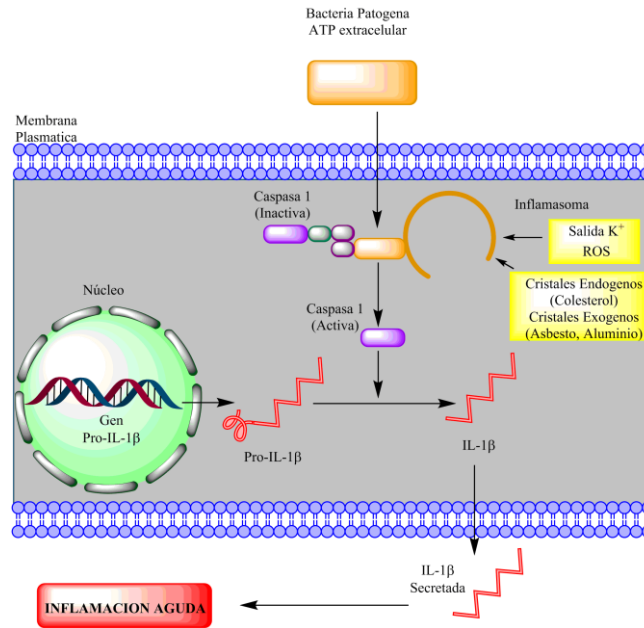
- Receptores tipo Toll: son sensores microbianos, que fueron llamados Toll

gracias a su descubridor. Estos reconocen productos bacterianos (endotoxinas y ADN bacteriano), virus (cadenas de ARN). Estos receptores están localizados en las membranas plasmáticas y endosomas. Estos receptores además activan factores de transcripción, estos factores activan mediadores de inflamación, citocinas antivirales, y proteínas que promueven la activación de linfocitos, y siempre potencian la respuesta inmune (véase **Figura 2**).



**Figura 2.** Representación de los receptores tipo Toll que se encuentran en la membrana celular y en el endosoma que reconocen productos diferentes de microbios, produciendo proteínas que intervienen en la inflamación [tomada de Kumar V, *et al.*, 2013].

- El inflamasoma, es un complejo citoplasmático multi-protéico que reconoce productos de células muertas (ácido úrico y ATP extracelular). Cuando este se activa, da la activación de una enzima llamada caspasa-1. Esta caspasa es un precursor en la formación de la interleucina inflamatoria  $1\beta$ , esta es importante en el reclutamiento de leucocitos (véase **Figura 3**).



**Figura 3.** Representación del complejo proteico del inflammasoma, reconoce productos de células muertas y algunos microbios, también es un inductor en la secreción de IL-1[tomada de Kumar V, *et al.*, 2013].

### 1.2.3. Reclutamiento leucocitario

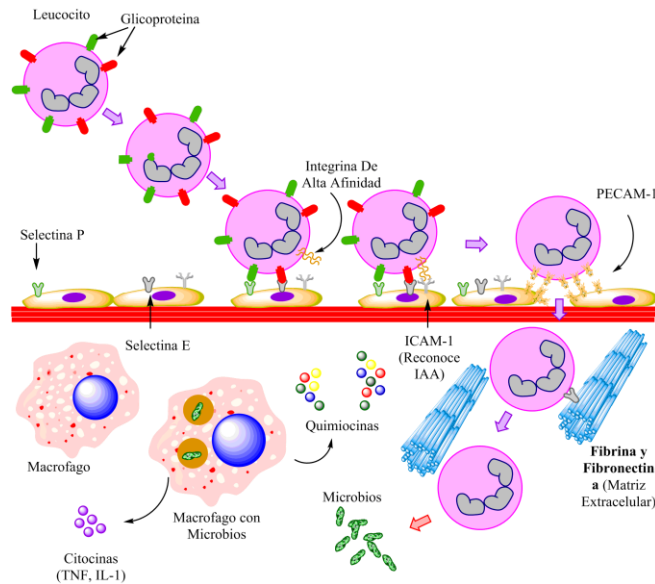
Los leucocitos normalmente fluyen rápidamente en la sangre, y en una acción inflamatoria ellos se paran y buscan el sitio en donde está el daño tisular, lo cual es típicamente fuera de las venas y arterias. La secuencia de eventos en el reclutamiento de leucocitos desde el lumen vascular al espacio extravascular consiste en 4 pasos:

1. Migración y paso a través de las paredes vasculares: El flujo de células en la sangre está condicionada a que estas pueden recorrer los capilares, las venas y las arterias del cuerpo humano, los glóbulos rojos son los que tienen una mayor facilidad de moverse a través de los capilares, los leucocitos y linfocitos (glóbulos blancos) tienen menos posibilidad de pasar por estos. El único modo de que los glóbulos blancos puedan pasar hasta los lugares en donde solo hay capilares venosos o arteriales es atravesando la pared vascular. Esto sucede en dos fases: acumulación de glóbulos blancos en el área más cercana al sitio afectado, esto es denominado marginación, la segunda fase comienza con la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, estas

moléculas de adhesión son las llamadas *selectinas*, estas moléculas lo que hacen es interactuar con sustancias en la superficie de los leucocitos y de este modo se realiza el proceso de pasar a través de las paredes vasculares. Hay diferentes tipos de selectinas así como el lugar de su expresión, la selectina E se expresa en células endoteliales, la selectina P se presenta en plaquetas y el endotelio, por último la selectina L que se encuentra en la superficie de los leucocitos. Las selectinas E y L son expresadas principalmente cuando están circundando la interleucina 1 y el TNF.

2. Adhesión: Este proceso es gracias a la expresión de las selectinas antes mencionadas, y comienza con la interacción de glicoproteínas expresadas en la membrana de los leucocitos con las selectinas, también este proceso esta mediado por proteínas denominadas “integrinas” que se encuentran en la superficie de los glóbulos blancos, interactuando con receptores (ICAM-1: *intracelular adhesion molecule-1*) en las células endoteliales.
3. Transmigración: Después de que los leucocitos tuvieron el proceso de adhesión, el siguiente paso es el pasar a través de la pared vascular, este proceso se realiza en la unión entre célula y célula, este proceso se llama diapédesis. La migración de los leucocitos esta mediada por quimiocinas producidas en los tejidos extravasculares, y moviéndose de acuerdo al gradiente químico. La proteína que ayuda al paso entre las uniones entre las células es la molécula de adhesión celular de las plaquetas con el endotelio 1 (PECAM-1: *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*).
4. Quimiotaxis: Luego del proceso de transmigración, los leucocitos se mueven al sitio de daño o infección a través de gradientes químicos, este proceso es llamado quimiotaxis. Las sustancias que intervienen en este proceso son (véase **Figura 4**):
  - Productos bacterianos, particularmente péptidos como el residuo N-formil-metionina terminal.
  - Componentes del complemento (proteínas que reconocen porciones de la pared bacteriana, activando a macrófagos para realizar la fagocitosis.

- Metabolitos de la ruta del ácido araquidónico.



**Figura 4.** Representación del reclutamiento leucocitario, y su paso a través de la pared de los vasos sanguíneos, este paso es mediado por proteínas que son expresadas por las células del endotelio (PECAM-1: molécula de adhesión celular de las plaquetas con el endotelio; TNF: factor de necrosis tumoral; IL-1: Interleucina; IAA: Metabolitos del Ácido Araquidónico; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular) [tomada de Kumar V, *et al.*, 2013].

#### 1.2.4. Activación de leucocitos

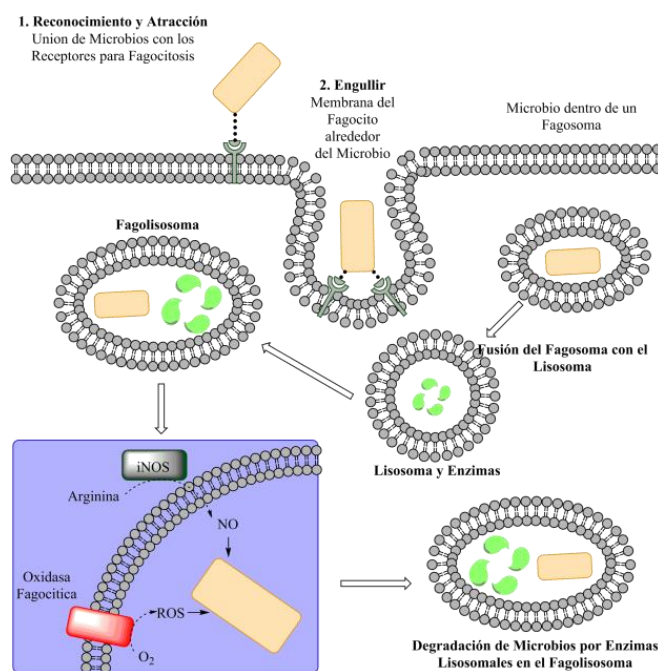
Una vez que los leucocitos han sido reclutados al sitio de infección o el tejido en necrosis, estos deben ser activados para que lleven a cabo sus funciones. Son activados por la estimulación de microbios, productos de células necróticas, y varios mediadores. Los leucocitos usan varios receptores que censan la presencia de microbios, células muertas, y sustancias extrañas. Uniéndose a estos receptores celulares induce un número de respuestas en leucocitos que son parte de unas funciones normales de defensa y son agrupados bajo el término “activación leucocitaria”. La activación de leucocitos resulta en la unión de las siguientes funciones:

- Fagocitosis en particular
- Destrucción intracelular de microorganismos fagocitados y células muertas por

sustancias que se producen en el fagosoma, incluyendo especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y enzimas lisosomales.

- Liberación de sustancias que destruyen microorganismos y tejidos muertos, son sustancias parecidas a las que se encuentran en las vesículas fagocíticas. Un descubrimiento reciente, es el mecanismo mediante el cual los neutrófilos destruyen microorganismos extracelulares, es la formación extracelular “traps”.
- Producción de mediadores, incluyendo los mecanismos del ácido araquidónico y citocinas, que amplifican la reacción de inflamación, para el reclutamiento y activación de más leucocitos.

**Fagocitosis.** La fagocitosis consiste en tres pasos (véase **Figura 5**): 1. Reconocimiento y ataque de la partícula para el leucocito que se activa; 2. Introducción de la sustancia extraña, con una subsecuente formación de la vacuola fagocítica; y 3. Muerte o degradación del material ingerido.



**Figura 5.** Representación de la fagocitosis de un leucocito a una bacteria [tomada de Kumar V, *et al.*, 2013].

Los leucocitos se unen e ingieren microorganismos y células muertas al

interaccionar con los receptores específicos. Algunos de esos receptores reconocen componentes de microbios y células muertas, y otros receptores reconocen proteínas, llamadas “opsoninas”, que se unen a los microorganismos y los marcan, haciéndolos blanco de la fagocitosis (proceso llamado opsonización). Las opsoninas más importantes son anticuerpos de la inmunoglobulina G (IgG) que se unen a los antígenos de la superficie microbiana, activan a proteínas del complemento C3, y se unen a colectinas (lectinas que están unidas a carbohidratos presentes en el plasma), estas se unen a grupos de azúcar en la pared microbiana. Las opsoninas están presentes en la sangre cuando un microorganismo entra o produce una respuesta. Los leucocitos expresan receptores para opsoninas que facilitan una fagocitosis rápida contra microorganismos. Estos receptores incluyen el receptor Fc para IgG (llamado Fc $\gamma$ RI), receptores del complemento 1 y 3 (CR1 y CR3), y para colectinas el receptor C1q [Kumar V, *et al.*, 2013].

### **1.3. Inflamación crónica**

Esta reacción inflamatoria es más duradera, llegando a ser de unos días hasta años, y este es caracterizado por el flujo y proliferación vascular de linfocitos y macrófagos, y fibrosis. Es una inflamación de duración prolongada (semanas o años) en la que continua la inflamación, daño tisular, e aumento de calor. En contraste con la inflamación aguda, la cual es distinguida por cambios vasculares, edema, e infiltración predominante de neutrófilos, la inflamación crónica está caracterizada por un conjunto de reacciones diferentes:

- Infiltración con células mononucleares, incluyendo macrófagos, linfocitos, y células plasmáticas.
- Destrucción de tejido, ampliamente inducido por el producto de células inflamatorias.
- Reparación, envolviendo proliferación de nuevos vasos (angiogénesis) y fibrosis.

La inflamación aguda puede progresar a inflamación crónica, esto es causado por

la persistencia del agente dañino o porque la interferencia con los procesos normales sanación. Algunas formas de daño (reacciones inmunológicas, algunas infecciones virales) pueden desencadenar una respuesta inflamatoria crónica fuera del foco.

La inflamación crónica puede surgir en los siguientes escenarios:

1. Infecciones persistentes por microorganismos que son difícil de erradicar, algunos virus y hongos, todos tienden a establecer infecciones persistentes y activar una respuesta mediada por linfocitos T, llamada hipersensibilidad retrasada.
2. Enfermedades inflamatorias mediadas por la inmunidad (enfermedades de hipersensibilidad). Estas son causadas por un incremento del sistema inmune. Bajo ciertas condiciones, el desarrollo de reacciones inmunitarias aumentan la afección del paciente, llevándolo hacia una enfermedad autoinmune. En algunas enfermedades los auto-antígenos pueden evocar una reacción inmune por ellos mismos, que resulta en un daño del tejido, y esto provoca una respuesta inflamatoria. La autoinmunidad juega un importante papel en varias enfermedades inflamatorias crónicas, como en la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, y psoriasis. La respuesta inmune que comúnmente está en contra de sustancias ambientales, puede causar enfermedades de alérgicas, como el asma bronquial.
3. Exposición prolongada a agentes tóxicos. Ejemplos son materiales exógenos no degradables como son partículas de sílice (inhaladas), esta puede producir una inflamación crónica en los pulmones. Y agentes endógenos como cristales de colesterol, los cuales pueden contribuir la aterosclerosis.
4. Formas benignas de inflamaciones crónicas pueden ser importantes en la patogénesis de varias enfermedades que no están dentro del pensamiento convencional de una enfermedad inflamatoria. Como enfermedades aterosclerosis, síndrome metabólico asociado a diabetes tipo 2, y algunos tipos de cáncer, en la cual, las reacciones de desarrollo promueven su crecimiento. También incluyendo desordenes neurodegenerativos enfermedad de Alzheimer.

### 1.3.1. Células y mediadores de la inflamación crónica

La combinación de inflamación repetida y prolongada, fibrosis y destrucción del tejido que caracterizan la inflamación crónica envuelven interacciones complejas entre varias poblaciones de células y la secreción de sus mediadores.

### 1.3.2. Macrófagos

Los macrófagos son las células predominantes en la inflamación crónica, son células que se encuentran en el tejido, estas se derivan de los monocitos que andan en el flujo sanguíneo y que migran a través de la pared de los vasos sanguíneos. Los macrófagos están normalmente esparcidos en el tejido conectivo y se pueden encontrar también en órganos, como el hígado (donde son llamados células Kuffer), bazo y nódulos linfáticos (donde son llamados histiocitos), sistema nervioso central (células de la microglia), y pulmones (macrófagos alveolares). Estas células juntas constituyen lo que es llamado “sistema fagocítico mononuclear”, también conocido por el viejo nombre de sistema retículo-endotelial. En todos los tejidos, los macrófagos actúan como filtros para partículas de tierra, microbios y células viejas, así como también son las células efectoras en eliminar microbios en respuestas inmunes.

Los monocitos surgen de precursores que están en medula ósea, y circulan en la sangre solo por un día. Bajo la influencia de moléculas de adhesión y quimiocinas, ellos migran al sitio de daño con 24 a 48 horas después de comenzar la respuesta inflamatoria aguda. Cuando los monocitos alcanzan el tejido extravascular, los monocitos se transforman en macrófagos, estos tienen mayor vida y son mejores en realizar la fagocitosis que los monocitos que andan en la sangre.

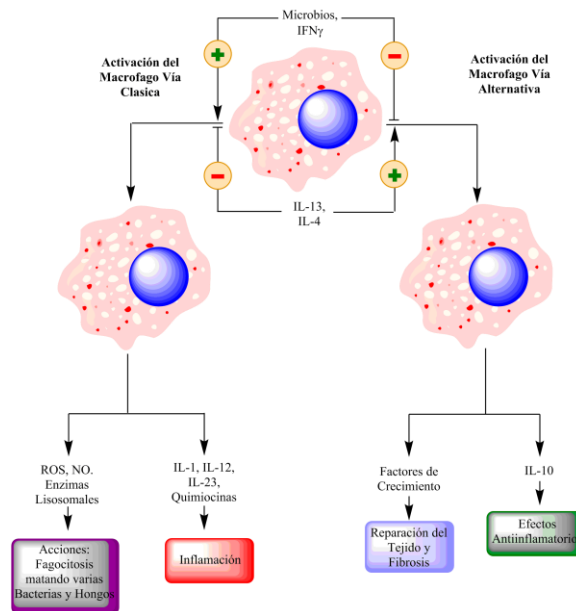
Los macrófagos son activados por diversos estímulos. Las dos vías de activación de los macrófagos son la vía alternativa y la vía clásica.

- Vía clásica de activación es inducida por productos microbianos como

endotoxinas, señales derivadas de células T, importante la citocina  $IFN\gamma$ , y por sustancias extrañas, incluyendo cristales. Clásicamente los macrófagos activados producen enzimas lisosomales, NO y ROS, todas tienen la habilidad de matar organismos ingeridos, y secretar citocinas que estimulan la inflamación. Los macrófagos son importantes contra un sinnúmero de microbios ingeridos y en muchas de las reacciones inflamatorias crónicas.

- Vía alternativa de activación es inducida por citocinas a parte de  $IFN\gamma$ , como IL-4 e IL-13, estas producidas por linfocitos T y otras células, incluyendo mastocitos y eosinófilos. Alternativamente, la activación de los macrófagos no es llevada por los residuos microbianos, en su lugar, su rol principal es el de reparación. Ellos secretan factores de crecimiento que promueven la angiogénesis, activación de fibroblastos y estimular la síntesis de colágeno.

Los macrófagos tienen varios papeles en la defensa y respuesta inflamatoria (véase **Figura 6**).



**Figura 6.** Representación de las vías de activación de los macrófagos, teniendo dos vías para activarlos. La vía clásica, que da como resultado la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) que sirven para matar a los microbios, en conjunto con las enzimas lisosomales, NO (óxido nítrico) que ayuda a la muerte de las bacterias y a realizar una dilatación en los vasos sanguíneos. Interleucinas que ayudan a la quimiotaxis y la vía alternativa que producen factores de crecimiento que ayudan a la reparación de los tejidos en el lugar de daño [tomada de Kumar V, *et al.*, 2013].

- Macrófagos, son las células más importantes en la realización de la fagocitosis, antes de neutrófilos, gracias a la activación por los linfocitos T.
- Los macrófagos son los que inician el proceso de reparación de tejido, están envueltos en la formación de cicatrices y fibrosis.
- Los macrófagos secretan mediadores de inflamación, como citocinas (TNF, IL-1, quimiocinas y otras) y eicosanoides. Estas células son las principales en la iniciación y propagación de todas las respuestas inflamatorias.
- Los macrófagos muestran antígenos para los linfocitos T y así responder a señales de células T, esto da como resultado la defensa contra varios microbios.

### 1.3.3. Linfocitos

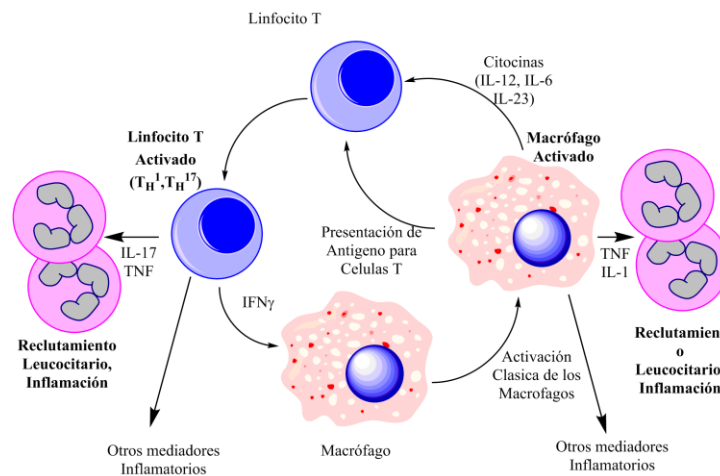
Linfocitos son movilizados por estímulos inmunes específicos (infecciones), así como también en inflamación que no está mediada por la inmunidad (conjunto de necrosis isquémica y trauma). Son los mayores controladores de inflamación autoinmune y otras enfermedades crónicas. Algunos linfocitos migran a los sitios de inflamación usando las mismas moléculas de adhesión y quimiocinas que reclutan otros leucocitos. En los tejidos, los linfocitos B pueden desarrollar células plasmáticas, las cuales secretan anticuerpos, ya activados los linfocitos T secretan citocinas.

Dentro los linfocitos hay tres subtipos de los linfocitos T *helper*, estos secretan diferentes citocinas:

- $T_H^1$  célula que produce el  $INF\gamma$ , los cuales activan a los macrófagos dentro de la vía clásica.
- $T_H^2$  célula que secreta IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales activan y reclutan eosinófilos, los cuales son los responsables de la activación de los macrófagos por la vía alternativa.
- $T_H^{17}$  células que secretan IL-17 y otras citocinas que están envueltas en la secreción de quimiocinas, estas son responsables del reclutamiento de neutrófilos y monocitos dentro de la reacción inflamatoria.

Los linfocitos  $T_H^1$  y  $T_H^{17}$  están envueltos en la defensa contra varios tipos de bacterias y virus, así como también dentro de enfermedades autoinmunes. Las células  $T_H^2$  están envueltas en la defensa contra enfermedades parasitarias y alérgicas.

Linfocitos y macrófagos interactúan en una forma bidireccional, en esas interacciones juegan un rol importante en la propagación de la inflamación crónica, los macrófagos muestran antígenos para las células T, las cuales se expresan en la membrana (llamados co-estimuladores), y producen citocinas (IL-6, IL-12 y IL-23) que estimulan la respuesta de las células T (véase **Figura 7**).



**Figura 7.** Representación de la interacción entre linfocitos y macrófagos en la inflamación crónica, la activación y estimulación de alguno de estas dos tipos de células da la producción de mediadores inflamatorios (IFN $\gamma$ : interferón gama; IL: interleucinas; TNF: factor de necrosis tumoral) [tomada de Kumar V, *et al.*, 2013].

#### 1.3.4. Otras células

Los eosinófilos son característicamente encontrados en los sitios de inflamación causados por infecciones parasitarias y enfermedades alérgicas. El reclutamiento de estas células está controlado por las moléculas de adhesión que usan los neutrófilos (selectinas) y por quimiocinas específicas.

Los mastocitos son células que vigilan y están ampliamente distribuidas a través

de todo el tejido conectivo. Estas pueden participar tanto en las reacciones inflamatorias agudas como en las crónicas y en enfermedades alérgicas. Estas actúan en las enfermedades de alergias porque presentan proteínas en su membrana que reconocen rápidamente sustancias del ambiente, metabolitos del ácido araquidónico e histamina, haciendo que haya cambios vasculares. Los mastocitos pueden también elaborar citocinas como el TNF y quimiocinas que juegan un rol benéfico en combatir infecciones.

### 1.3.5. Reparación de los tejidos

Una fase crítica para la supervivencia de un organismo es la habilidad para reparar el daño causado por tóxico e inflamación. La respuesta inflamatoria a microorganismos y tejidos dañados no solo sirve para eliminar estos daños, si no también, sirve para la activación del proceso de reparo. El reparo, algunas veces llamado curación, refiere a la restauración de la arquitectura y función del tejido después de un daño. Esto ocurre en dos tipos de reacciones: la regeneración del tejido dañado y la formación de cicatrices por la deposición de tejido conectivo.

- Regeneración. En algunos tejidos es también el remplazo de las células dañadas y el regreso al estado normal; este proceso es llamado regeneración. Esta ocurre por una proliferación residual de células que retienen la capacidad de dividirse, y por el remplazo por el tallo celular. Esto es la respuesta típica al daño en donde la división de células es rápida como piel e intestino, y órganos parenquimatosos como el hígado.
- Formación de la cicatriz. Si el tejido dañado es incapaz de regenerarse, o si las estructuras de soporte del tejido son severamente dañadas, ocurre reparo poniendo tejido conectivo debajo, un proceso que resulta en la formación de la cicatriz. A través de la cicatriz fibrosa no se puede regresar la función por la pérdida de células parenquimales, esto provee estabilidad estructural.

Después de varios tipos de daños, la formación de cicatrices y la regeneración contribuye en varios grados al último reparo. Ambos procesos envuelven la

proliferación de varias células, el cierre de las interacciones entre células y a la matriz extracelular (ECM).

#### 1.4. LA PLANTA DE INTERES

La planta *Ageratina glabrata* es conocida como chamizo blanco o hierba del golpe, está ampliamente distribuida en el territorio de México, ha sido utilizada para mitigar dolores de extremidades, causado por traumatismos usando cataplasmas que posteriormente aplicaban en la parte afectada.

La planta es un arbusto ramoso de 1.5 m, llegando a alcanzar los 2 m de altura, erecto, de tallos estriados hojosos hasta la inflorescencia y hojas romboideo-oblongas con distribución opuesta de las flores blanquecinas-rosadas (véase **Figura 8**).



**Figura 8.**A) *Eupatorium mairretanum* detrás de la persona (mostrando altura de los arbustos del genero *Eupatorium*), Tomada por José Vázquez Instituto de Biología, UNAM [Vázquez, 2010]. B) *Eupatorium glabratum* tomada de un herbario de la Universidad del Estado de Arizona [Fertig, W, ASU, ASU0017426]. C) Inflorescencia de *Eupatorium glabratum* [García G, et al., 2011]. D) Posición de las hojas en alrededor de la planta de *Eupatorium glabratum* [García G, et al., 2011].

## 1.5. FUNDAMENTO FITOQUÍMICO

Todos los seres vivos comparten biomoléculas (polímeros y monómeros) como: proteínas, enzimas, aminoácidos, lípidos, polisacáridos, nucleótidos. [Sánchez G, 2003]

1. Carbohidratos (azúcares): monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos. El almidón y la celulosa que son polisacáridos de glucosa, estos presentan enlaces alfa y beta respectivamente. Los seres humanos solo podemos metabolizar la primera molécula puesto que presentamos la enzima alfa amilasa.
2. Grasas: ésteres de glicerina con ácidos grasos
3. Proteínas: aminoácidos, dipéptidos, oligopéptidos, polipéptidos. Muchos aminoácidos provienen de la biosíntesis de otros aminoácidos, estos son conocidos como aminoácidos esenciales.

En general, los seres vivos carecen de la biosíntesis de sustancias esenciales, lo que necesitan es la incorporación de estas mediante la alimentación para poder subsistir. Así mismo existen sustancias que solo pueden ser sintetizadas por plantas o microorganismos que son esenciales para el ser humano, tales como vitaminas y ciertos ácidos poli-insaturados. Los minerales y las sales no se biosintetizan, pero son esenciales ya que se deben consumir, y de no hacerlo da como resultado las enfermedades o muertes de los individuos, porque muy a menudo estas sales o minerales son cofactores de enzimas, y también son útiles en la regulación hormonal o celular: homeostasis, osmolaridad.

La incorporación de sustancias esenciales, desde aminoácidos como vitaminas se realizan directamente por el consumo de plantas, o indirectamente por el consumo de animales que los han consumido. Tanto los animales como en los vegetales, necesitan de energía para sus procesos vitales, esta energía proviene de una cadena de oxidaciones y reducciones, y que dan como resultado la producción de

sustancias (metabolitos), que estas son necesarias para el crecimiento, reproducción del organismo [Sánchez G, 2003].

El metabolismo se divide en anabolismo (asimilación, construcción de materia) y catabolismo (desasimilación, destrucción, eliminación de deshechos), estos procesos determinan los mecanismos que son empleados por el organismo, este tipo de procesos hace modificaciones entre un organismo y otro, en particular se refiere a sustancias metabolizables (metabolitos primarios), de este modo se manifiesta el parentesco entre plantas representado por similitudes morfológicas y fisiológicas, incluyendo la presencia de metabolitos secundarios en diversas plantas.

Metabolitos primarios:

Las plantas, gracias a la clorofila, son autótrofas (se alimenta por si solas gracias a la fotosíntesis), no tiene movilidad, carecen de eliminación o excreción de sustancias, dando como resultado la acumulación de sustancias orgánicas como los alcaloides.

Dentro de los metabolitos primarios tenemos: sacáridos (monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos) como por ejemplo: celulosa, mucilago, grasas: (ácidos grasos); proteínas: aminoácidos; nucleótidos: ADN, ARN; ácidos frúcticos: ácido mevalónico, ácido cítrico (véase **Figura 9**).

Funciones de los metabolitos primarios

- Fuente de energía y crecimiento
- Almacenamiento de energía
- Garantiza la fecundación y reproducción por insectos

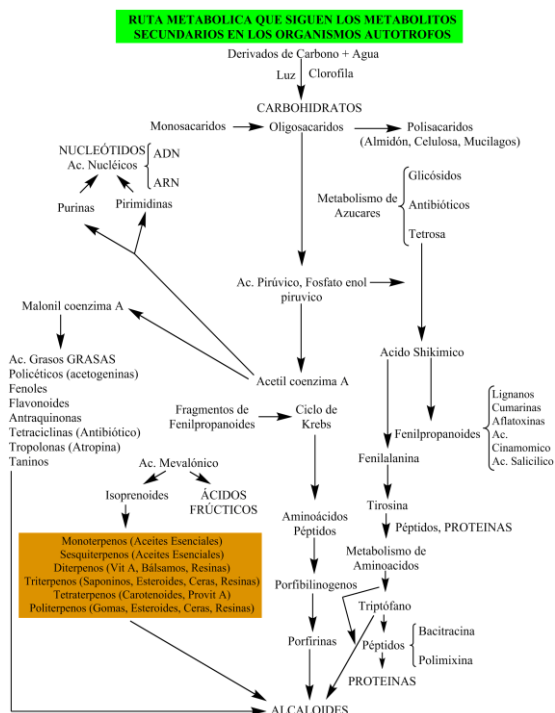
Metabolitos secundarios:

El mecanismo para la biosíntesis de metabolitos secundarios todas las plantas los comparten. El metabolito secundario es el producto que hace terapéuticamente utilizable a una planta, ya sea por un uso tradicional y/o sea analizado

científicamente la composición química, es decir, se ha llevado a cabo, una extracción, una identificación, un aislamiento de sus principios bioactivos, así mismo como sus pruebas farmacológicas para identificarlos como fitofármacos. Ahora bien, al aislar y realizar estos procedimientos antes mencionados, hay riesgos de que se pierda el efecto terapéutico de dicho extracto, ya que un efecto farmacológico no se puede atribuir a uno o algunos componentes, sino que puede deberse a un efecto sinérgico. Esta potenciación de tipo farmacocinética, de dos o más principios activos se conoce también en el caso de los fármacos sintéticos (xenobióticos); sin embargo, en el caso de los extractos vegetales, la relación entre las sustancias, las estructuras químicas y el efecto farmacológico no siempre se conocen (véase **Figura 9**).

Los metabolitos secundarios se asocian a diferentes funciones como:

- Protección contra depredadores
- Surgen como una vía alterna a la falta de vías de eliminación
- Son la acumulación de rutas metabólicas terminales
- Búsqueda de ventajas de evolución por la biosíntesis
- Protección ante ataques microbianos



**Figura 9.** Rutas metabólicas en las plantas, metabolitos primarios: sacáridos, grasas, proteínas, nucleótidos. Metabolitos secundarios: fenilpropanoides, isoprenoides, policetidos (acetogeninas), péptidos (polimixina o bacitracina) [Sánchez G, 2003], en este trabajo de tesis, se hizo un estudio de un ligando que es un terpeno (que está en la clasificación del cuadro naranja), este ligando siendo un monoterpeneo.

Desde los años 70's se han iniciado estudios fitoquímicos del género *Ageratina* encontrándose más de 100 compuestos esenciales de las especies de *Eupatorium* entre ellos monoterpeneos, alcaloides, flavonoides pirrolizidínicos, lactonas terpenicas y diterpenoides, aceites esenciales y otros compuestos. La enorme diferencia en la composición química de los extractos de cada una de las especies de *Eupatorium* se debe a las condiciones de los sitios de recolección de las plantas, aunque muchas especies comparten compuestos similares dentro del mismo género e incluso de la misma familia *Asteraceae* [García G, *et al.*, 2011].

Dentro de los efectos que causa esta planta son: diuresis, una acción antihelmíntica, un efecto antiinflamatorio, y también presenta una actividad antimicrobiana pero solo de uso tópico. Los efectos adversos que presenta son vómitos y también causa un efecto purgante.

El estatus legal de esta planta, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud tiene la clasificación de medicamento que no requiere receta médica para su venta o consumo.

## 1.6. TERPENOS

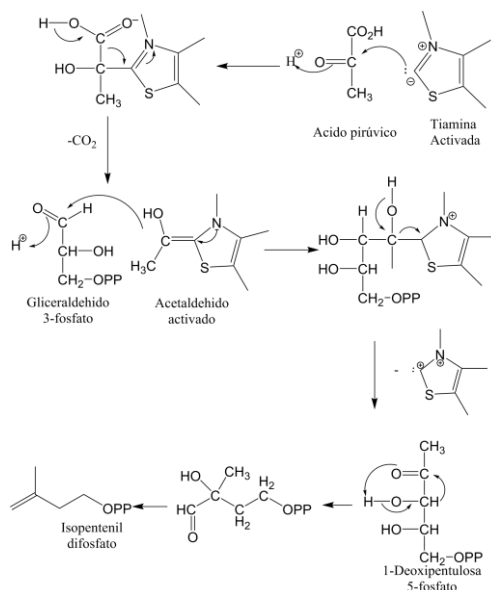
Dentro de las sustancias que sintetiza esta planta tenemos a los terpenos que son la parte fundamental de esta investigación. Los terpenos son un gran grupo de compuestos naturales con una cifra de alrededor de 30000 moléculas identificadas que están formados por estructuras de carbono y están distribuidas en diferentes categorías, éstas de acuerdo a la cantidad de átomos de carbono en su estructura química, son: monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}$ ) y politerpenos (más de 40 átomos de carbono). Estos están involucrados en todos los fenómenos o acciones que suceden alrededor de la planta como crecer, desarrollarse, reproducirse y como sustancias de defensa. Un ejemplo muy conocido de los terpenos es el fitol, que está ampliamente distribuido en las plantas y es la cadena principal para la formación de la clorofila [Crocoll C, 2011].

### 1.6.1. Síntesis de terpenos

La síntesis de los terpenos se lleva a cabo en dos sitios dentro de la planta, en el citoplasma y en el cloroplasto, la diferencia en la formación de estos dos sitios es la molécula o precursor con la que comienza la síntesis [Ai-Xia, *et al.*, 2007].

### 1.6.2. Síntesis en el cloroplasto

La síntesis en el cloroplasto tiene como precursor el gliceraldehído 3 fosfato junto con el piruvato y tiamina activada. Al reaccionar la tiamina activada con el piruvato dan como resultado la formación de un acetaldehído activado que a su vez este reacciona con el gliceraldehído 3 fosfato. Al llevarse a cabo esta reacción se forma el l-deoxipentulosa-5-fosfato, al tener cinco carbonos en su estructura y que este a su vez es precursor del isopentenil difosfato (véase **Figura 10**).

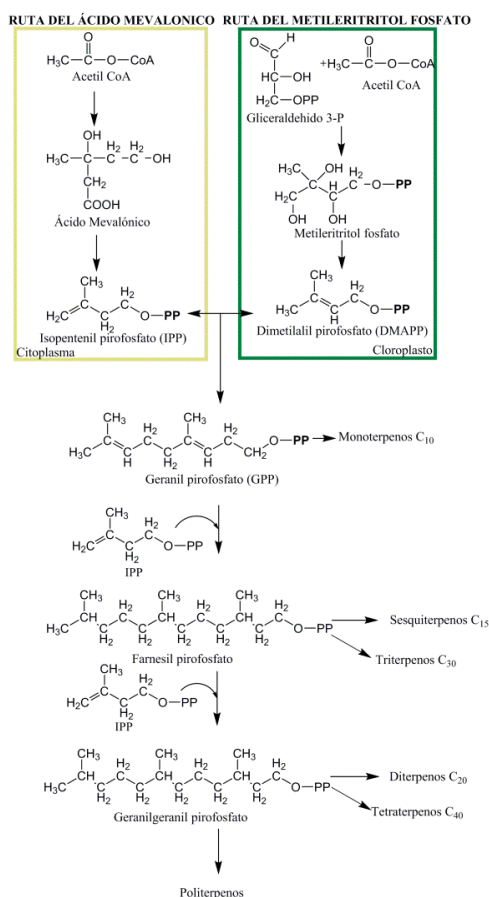


**Figura 10.** Representación de las reacciones y reordenamientos para la formación del isopentenil difosfato. Llevándose a cabo por la reacción del piruvato con tiamina difosfato, teniendo como producto la formación del acetaldehído activado, este último reacciona con el gliceraldehído 3 fosfato dando como producto de reacción el 1-deoxipentulosa-5-fosfato que este es un precursor del isopentenil difosfato [Breitmaier E, 2006].

### 1.6.3. Síntesis en el citoplasma

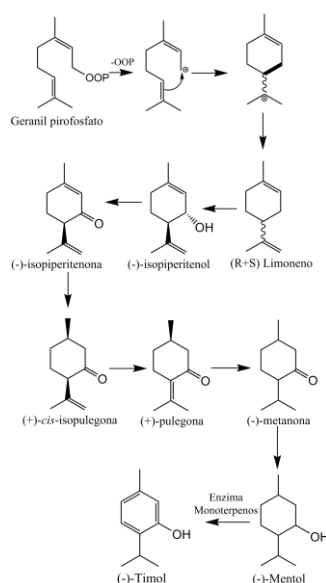
La aceti-coenzima A, es conocida como un ácido acético activado, es el precursor biogénico de terpenos. Llevándose una reacción similar a la condensación de CLAISEN (reacción entre un o dos ésteres y una cetona en presencia de una base fuerte, que da como producto a un  $\beta$ -cetoéster o una  $\beta$ -dicetona que se unen mediante un enlace sencillo carbono-carbono), dos equivalentes de acetil-CoA uniéndose a acetoacetil coenzima A, que representa un análogo biológico de acetoacetato. Resultado de una reacción aldólica de acetoacetil-CoA reacciona con otro equivalente de acetil-CoA, gracias a un carbono nucleofílico obtenido del  $\beta$ -hidroxi- $\beta$  metilglutaril-CoA (HMG CoA). Seguido por una reducción enzimática con adenina dihidronicotinamidinucleótido ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ) que está presente en el agua, formando (R)-ácido mevalónico. La fosforilación del ácido mevalónico proporciona el difosfato de ácido mevalónico que es descarboxilado y deshidratado a isopentenil pirofosfato (IPP). Una última isomerización se lleva a cabo en presencia de una isomerasa, que transfiere grupos SH a  $\gamma,\gamma$ -dimetilalil

pirofosfato. El grupo CH<sub>2</sub> electrofílico de  $\gamma,\gamma$ -dimetilalil pirofosfato y el grupo metileno nucleofílico del isopentenil pirofosfato se une a geranil pirofosfato, un monoterpeno. La reacción subsecuente de geranil difosfato con un equivalente de isopentenil difosfato produce farnesil difosfato que es un sesquiterpeno [Breitmaier, 2006] (véase **Figura 11**).



**Figura 11.** Representación gráfica de la síntesis de terpenos. La formación se realiza en dos sitios, el primero es en el citoplasma, tiene como precursor a acetil Co-A y al gliceraldehído 3 P, formándose el isopentenil pirofosfato (IPP) como producto final. El segundo lugar es el cloroplasto en donde tiene como precursores el gliceraldehído 3P y el piruvato, y su producto final es dimetilalil pirofosfato (DMAPP), que este es una molécula similar al isopentenil pirofosfato. Después, reaccionado dos moléculas de IPP o DMAPP dan como resultado la formación de geranil difosfato que es el precursor de los monoterpenos, subsecuentemente al geranil pirofosfato se otra molécula de IPP dando como producto el farnesil pirofosfato precursor de los sesquiterpenos y triterpenos. Después se da la formación de geranilgeranil difosfato que es el precursor de di, tetra, y politerpenos [Breitmaier E, 2006; Avalos A, *et al.*, 2009].

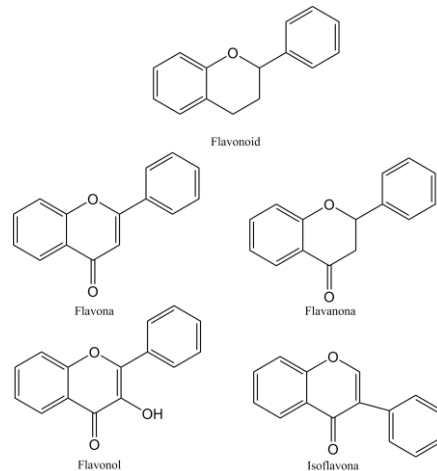
Geranilgeranil pirofosfato es un diterpeno (C20) emerge del ataque nucleofílico de isopentenil pirofosfato con farnesil pirofosfato que es un electrofílico (ver imagen 3). La formación de sesquiterpenos (C25) envuelve una unión adicional de isopentenil pirofosfato (C5) con geranilgeranil pirofosfato (C20). Una conexión de dos equivalentes de farnesil pirofosfato da como resultado un escualeno que es un triterpeno (C30). Similarmente como los carotenoides 16-trans-fitoeno originado de la dimerización de geranilgeranil pirofosfato. La biogénesis de terpenos cíclicos se asume que está envuelta en iones carbenio como intermediarios, pero la evidencia para *in vivo* que es obtenido en algunos casos específicos. En el simples caso de monoterpenos monocíclicos como el limoneno es catión alílico queda después de la separación del anión cíclico del pirofosfato al catión ciclohexil que es desprotonado a (R)- o (S)-limoneno [Breitmaier E, 2006] (véase **Figura 12**).



**Figura 12.** Representación de las reacciones para la formación de limoneno y mentol a partir de geranil pirofosfato [Breitmaier E, 2006].

## 1.7. FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos fenólicos (véase **Figura 13**) de bajo peso molecular, son metabolitos secundarios de frutas, vegetales, flores, y así mismo se encuentran en el té y el vino tinto.



**Figura 13.** Representación de algunos flavonoides, estos compuestos son de bajo peso molecular y son metabolitos secundarios [Romano B, *et al.*, 2013].

### 1.7.1. Flavonoides en el sistema nervioso central

Los flavonoides son de gran influencia en la actividad del sistema nervioso central (SNC), actúan uniéndose al GABA-A como las benzodiazepinas, resultando es sedación, también tienen el efecto ansiolítico y anticonvulsivo, actuando como un inhibidor de la monoamino oxidasa A o B, por último presentan efectos como anti-depresivos o anti-parkinsonianos [Romano B, *et al* 2013].

El efecto más conocido de los flavonoides es el de neuroprotector en células animales, atenuando los procesos de estrés oxidativo, excitotoxicidad, muerte neuronal apoptótica y regulación en la cascada de señalización de enzimas cinasas. Algunos flavonoides extraídos de *Sophora flavescens* o *Peltiphyllum peltatum*, están siendo usados como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, que es un blanco biomolecular clave en la terapia de la enfermedad de Alzheimer. Estos compuestos también inhiben procesos neuroinflamatorios, lo que contribuye en los desórdenes neurodegenerativos. Por ejemplo, hay estudios que mostraron que metilalpinumisoflavona, aislada de *Cudrania tricuspidata* suprimió la

producción de mediadores proinflamatorios decreciendo la señalización de NFκB y la fosforilación de MAPKs.

Baicaleina, un flavonoide extraído de *Scutellaria baicalensis*, es conocido por su protección contra daño en el tejido neuronal y facilita estudio del comportamiento cognitivo. Varios estudios han encontrado que baicaleina reduce infartación del cerebro, que puede derivar en una isquemia cerebral.

#### 1.7.2. Flavonoides en la inflamación

Los flavonoides muestran un remarcable papel en las acciones bioquímicas y farmacológicas de los efectos anti-inflamatorios y modulación del sistema inmune. Las acciones de los flavonoides incluyen, actividad antioxidante, inhibición en la generación de enzimas que metabolizan los eicosanoides, reducción en la producción de moléculas proinflamatorias, así como también modulación de la expresión de genes proinflamatorios. Estas moléculas también modulan la función de células como linfocitos, células *natural killer* (células NK), monocitos, mastocitos y macrófagos.

Recientemente, se ha encontrado que el flavonoliciarin, el mayor ingrediente de la planta *Herbae pimedii*, usada en la artritis reumatoide, induce la expresión del receptor tipo Toll en macrófagos. Icarin también modula los niveles de moléculas que envuelven la diferenciación mieloide (factor 88, TNFα, IL-6).

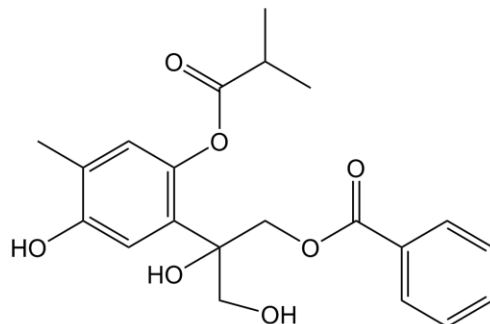
A grandes palabras, los flavonoides ayudan en varias de las enfermedades de hoy en día, por ejemplo, la diabetes, cáncer, problemas en el aparato respiratorio, deslipidemia y obesidad [Romano B, *et al.*, 2013].

### 1.8. EL MONOTERPENO A ESTUDIAR

La molécula a estudiar se obtuvo de la planta *Ageratina glabrata* (antes *Eupatorium glabratum*), fue recolectada el 4 de enero de 2006 en el km 191 de la vía México-Morelia No. 15, en el municipio de San José de la Cumbre, municipio perteneciente al estado de Michoacán, con coordenadas 19°40'859" norte, 100°50'423" oeste y 2,234 metros sobre el nivel del mar.

Después de la identificación dada por el Instituto de Ecología de Pátzcuaro Michoacán, se separaron por órganos (hojas, tallos, flor, raíz), estos se secaron por 10 días a temperatura ambiente, usando 200g de hojas que fueron maceradas con diclorometano, obteniéndose 20 gr del extracto. Posteriormente se identificó la estructura por medio de espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Encontrando un monoterpeno derivado de timol (10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi-isobutirato de timilo) (BOTIT) que es de interés puesto que tiene un efecto analgésico, este efecto fue puesto a prueba en un modelo de dolor (García G, *et al.*, 2008) (véase **Figura 14**).



**Figura 14.** Representación de la estructura química del 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi-isobutirato de timilo monoterpeno derivado de timol (BOTIT) [García G, *et al.*, 2011].

Esta estructura se va a poner a prueba con diferentes blancos biomoleculares, son: el receptor opioide  $\mu$ , las enzimas ciclooxigenasa 1 y 2, el receptor nuclear de estrógenos.

### 1.9. BLANCOS BIOMOLECULARES A EMPLEAR

Los blancos biomoleculares que van a ser utilizados son el receptor opioide  $\mu$  (**tabla 1**), Ciclooxigenasas 1 y 2 (**tabla 2** y **3**, respectivamente), receptor a estrógenos (**tabla 4** y **5**) que son tomados de la página de PDB [Berman H, *et al.*, 2000], los cuales servirán para poner a prueba la actividad antiinflamatoria del derivado de timol de interés y son presentados abajo.

**Tabla 1.** Receptor opioide  $\mu$ 

Código PDB; Año; R. Resolución;	Título de la estructura	Componentes moleculares, con cadenas, ligandos y especie	Referencia
4DKL; 2012; R: 2.8	Crystal structure of the mu- opioid receptor bound to a morphinan antagonist	Mu-typeopioid receptor y lysozymechimera= $\mu$ ; Chain A; Ligandos: $\beta$ -funaltrexamina ( $\beta$ -FNA, Derivado de morfina) <i>Mus musculus</i> y Enterobacter T4	[Manglik A, <i>et al.</i> , 2012].

\**Mus musculus*: nombre científico del ratón.

**Tabla 2.** Enzima Ciclooxygenasa 1

Código PDB Año R. Resolución	Título de la estructura	Componentes moleculares, con cadenas, ligandos y especie	Referencia
4O1Z 2014 R=2.40	Crystal Structure of Ovine Cyclooxygenase-1 Complex with Meloxicam	Prostaglandin GH synthase-1 = COX1 Chain: A, B. Ligandos: Meloxicam <i>Ovisaries</i>	[Xu S, <i>et al.</i> , 2014].

\**Ovis aries*: nombre científica de la oveja

**Tabla 3. Enzima Ciclooxygenasa 2**

Código PDB; Año; R. Resolución;	Título de la estructura	Componentes moleculares, con cadenas, ligandos y especie	Referencia
4M11; 2014; R= 2.45	Crystal Structure of Murine Cyclooxygenase-2 Complex with Meloxicam	Protein (prostaglandin h2 synthase-2) = COX2 Chain: A, B, C, D. Ligandos: Meloxicam <i>Mus musculus</i>	[Xu S, <i>et al.</i> , 2014].

\**Mus musculus*: nombre científico del ratón.

**Tabla 4. Receptor de estrógenos  $\alpha$** 

Código PDB; Año; R. Resolución;	Título de la estructura	Componentes moleculares, con cadenas, ligandos y especie	Referencia
3DT3; 2008; R= 2.4	Human Estrogen receptor alpha LBD with GW368	Estrogen receptor $\alpha$ (RE $\alpha$ ) Chain: A, B. Ligandos: GW368 5-(4-hydroxyphenoxy)-6-(3-hydroxyphenyl)-7-methylnaphthalen-2-ol; <i>Homo sapiens</i>	[Fang J, <i>et al.</i> , 2008].

\**Homo sapiens*: nombre científico del humano.

**Tabla 5.** Receptor de estrógenos $\beta$

Código PDB; Año; R. Resolución;	Título de la estructura	Componentes moleculares, con cadenas, ligandos y especie	Referencia
2JJ3; 2008; R= 2.28	Estrogen receptor beta ligand binding domain in complex with a benzopyran agonist	Estrogen Receptor $\beta$ (RE $\beta$ ) Chain: A, B. Ligandos: (3as,4r,9br)-4-(4-hydroxyphenyl)-6-(methoxymethyl)-1,2,3,3a,4,9b-hexahydrocyclopenta[c]chromen-8-ol <i>Homo sapiens</i>	[Norman B, <i>et al.</i> , 2007].

### 1.10. RECEPTOR OPIOIDE

Estos receptores fueron los primeros en ser empleados en el tratamiento de dolores, para mitigarlos se usaban al opio el cual contiene altas concentraciones de morfina y codeína. Después de varios años se dio la clasificación clásica de los receptores opioides ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ) que realizó alrededor de 1970.

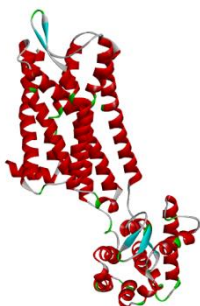
Hoy en día se sabe que el receptor relacionado con la supresión del dolor es el receptor opioide  $\mu$ , el cual es muy estudiado para buscar nuevas formas de terapia para los pacientes con cáncer [Pasternak G, *et al.*, 2013]. Los receptores opioides constan de siete dominios transmembranales y están acoplados a una proteína  $G_i$ , también presentan un residuo amino-terminal que es extracelular a modo contrario del residuo carboxilo-terminal que es intracelular.

#### 1.10.1. RECEPTOR OPIOIDE $\mu$

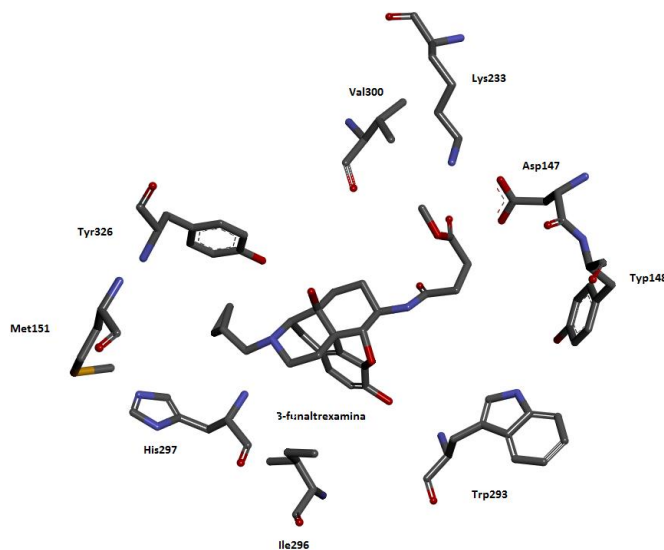
El receptor opioide  $\mu$  contiene 398 aminoácidos (véase **Figura 15**), consta de 7

dominios transmembranales que están conectados por 3 bucles extracelulares y 3 bucles intracelulares. En su sitio de unión hay 14 aminoácidos, de los cuales 9 interaccionan con el ligando directamente (véase **Figura 16**).

Este receptor está distribuido dentro del cuerpo (cerebro, medula espinal, linfocitos) y está ampliamente estudiado para la minimización del dolor del cual se ha estudiado su afinidad a diferentes sustancias.

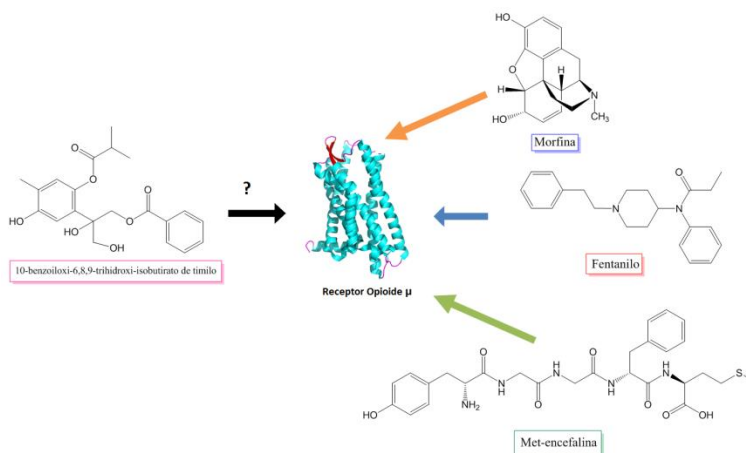


**Figura 15.** Representación de listón del receptor opioide  $\mu$ , la cual se ha realizado con el programa *Discovery studio* 4.0 [Accelry Software Inc., 2013] y la información aminoacídica de la enzima [Manglik A, *et al.*, 2012].



**Figura 16.** Aminoácidos que interaccionan en el sitio de unión del receptor opioide  $\mu$  [Manglik A, *et al.*, 2012], se ha realizado con el programa *Discovery studio* 4.0 [Accelry Software Inc., 2013].

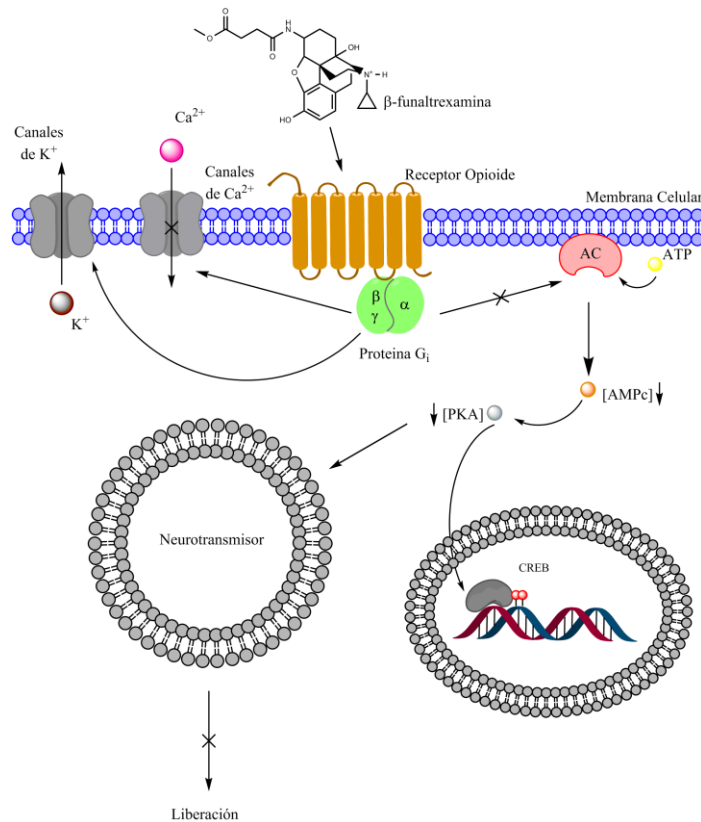
Las sustancias que estimulan al receptor opioide  $\mu$  son: endógenas encefalinas: [D-Ala2,MePhe4,Gly(ol)5]enkephalin [DAMGO], y análogos de encefalinas como: [d-Ala2]-Met5-enkephalinamide [DALA] y [d-Ala2,d-Leu5]-enkephalin [DADLE] y exógenas morfina, codeína, metadona, fentanil, oxicodona (véase **Figura 17**).



**Figura 17.** Presentación de ligandos que se unen con mayor afinidad al receptor opioide  $\mu$  del lado derecho, observando que presentan átomos que pueden formar interacciones muy fuertes (nitrógeno y azufre), y nuestro ligando BOTIT del lado izquierdo

### 1.10.2. FUNCIÓN CLÁSICA DEL RECEPTOR OPIOIDE

Los receptores opioides son miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G, en caso especial a una proteína G inhibitoria. Uno de los mecanismos de acción de los receptores opioides es la inhibición de la adenilato ciclasa, esta es la encargada de la ciclación del AMP (adenina monofosfato) a AMPc (adenina monofosfato cíclico). Otra de las acciones de los receptores opioides es la inhibición de los receptores de calcio voltaje sensibles, dando como resultado la no entrada de iones calcio, y del mismo modo también la activación de los canales de potasio voltaje sensibles, que tienen como función fundamental la salida de iones potasio de la neurona presináptica, lo que causa que la neurona no libere neurotransmisor (véase **Figura 18**) [Pasternak G, *et al.*, 2013].



**Figura 18.** Esquema del mecanismo de acción de los receptores opioides, dentro de las cuales son inhibición de la adenilato ciclasa, no ciclando el AMP. Inhibición de los canales de calcio voltaje sensibles, no permitiendo la entrada de calcio a la neurona. También la activación de los canales de potasio voltaje sensibles que dan como resultado la salida de potasio de la neurona. Y todo esto en conjunto no permite la liberación del neurotransmisor.

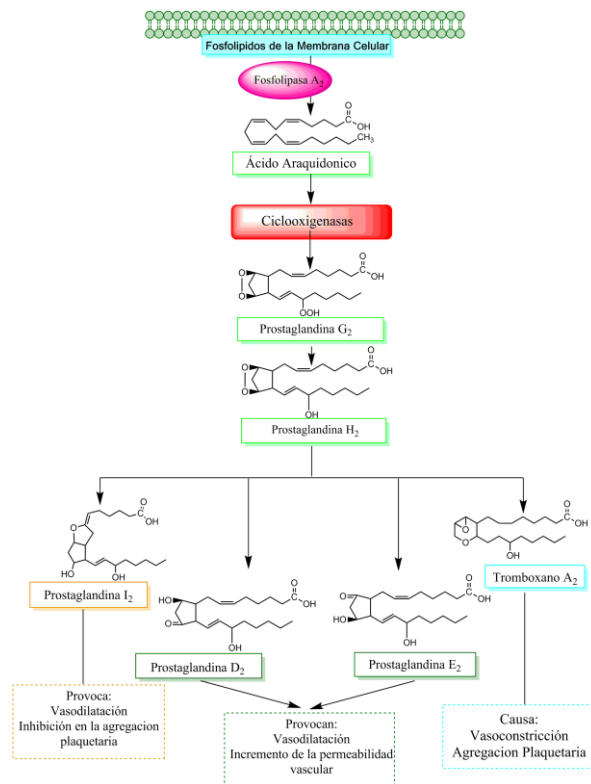
### 1.11. CICLOOXIGENASAS

Las ciclooxigenasas son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas entre los mamíferos, estas son las responsables de la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir de ácido araquidónico. Existen tres tipos de ciclooxigenasa: COX-1, COX-2 y COX-3 [Claria J, 2003], del mismo modo estas enzimas reciben diferentes nombres como Prostaglandinendopeptidasa sintasa, Prostaglandin G/H sintasa y PGH sintasa.

Estas enzimas se encuentran unidas a la membrana y son responsables de catalizar dos pasos en la formación de prostaglandinas (PG) y tromboxanos (Tx). La reacción primera reacción que se lleva a cabo es una ciclooxigenación y

peroxidación, lo cual es ciclar y adicionar dos moléculas de oxígeno al ácido araquidónico formando prostaglandina G<sub>2</sub>hidróxido (PGG<sub>2</sub> hidróxido). Reacciones posteriores, las ciclooxigenasas quitan un oxígeno, identificado como OOH, dentro de la PPG<sub>2</sub> dando la formación de un grupo hidroxilo (OH) en la misma posición, que forma la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), esta es un importante intermediario para la formación de las demás prostaglandinas, (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> PGI<sub>2</sub>) y tromboxanos (véase **Figura 19**) [Smith W, *et al.*, 2002].

En el proceso inflamatorio, los metabolitos de la vía de las ciclooxigenasas que incluyen a la prostaglandina E (PGE<sub>2</sub>), D (PGD<sub>2</sub>), F (PGF<sub>2α</sub>), I (PGI<sub>2</sub>) llamada también prostaciclina y el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), este último se produce mayoritariamente en las plaquetas gracias a que se expresa la enzima tromboxano sintasa. El tromboxano A<sub>2</sub> es un agente vasoconstrictor y agregante plaquetario, de modo contrario en las células endoteliales se expresa la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria. Las prostaglandinas E (PGE<sub>2</sub>), D (PGD<sub>2</sub>), F (PGF<sub>2α</sub>) causan vasodilatación y potencian la formación de edema. Por último la prostaglandinas E (PGE<sub>2</sub>) aumenta la sensibilidad al dolor, e interaccionando con otras citocinas causan fiebre. Los analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) tienen como función el bloquear la enzima COX. Al usar AINES que inhiben a COX-1 tiene como efecto secundario la deficiencia en la producción de mucosa protectora en el estómago, causando problemas gástricos. Los otros AINES que actúan en la COX-2 tiene propiedades antiinflamatorias porque inhiben la formación de prostaglandinas E, D e I, lo que como efecto secundario y a tratamientos largos conlleva un riesgo, porque al inhibir la formación de la prostaglandina I<sub>2</sub> aumentan las posibilidades de riesgos trombóticos [Vitale P, *et al.*, 2013; Kumar V, *et al.*, 2013].

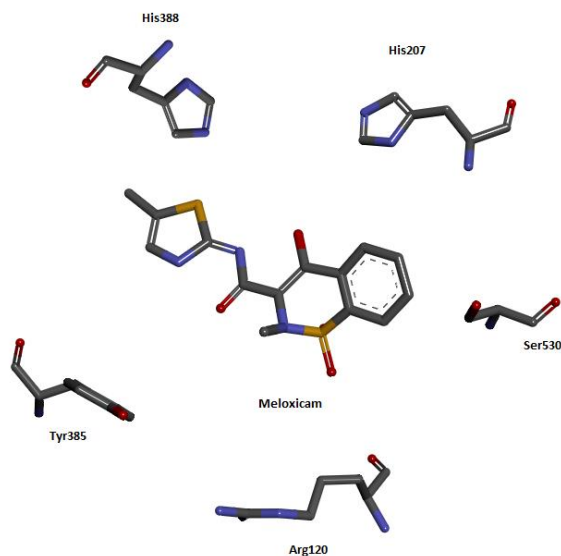


**Figura 19.** Representación de las funciones de prostaglandinas y tromboxanos biosintetizados a partir de COX-1 y COX-2 [tomado de Kumar V, *et al.*, 2013].

Hasta 1990 se propuso que estas enzimas también estaban presentes en células humanas, las cuales se denominaron COX-1 expresada y COX-2 inducible.

### 1.11.1. ENZIMA CICLOOXIGENASA 1 (COX-1) CONSTITUVA EXPRESADA

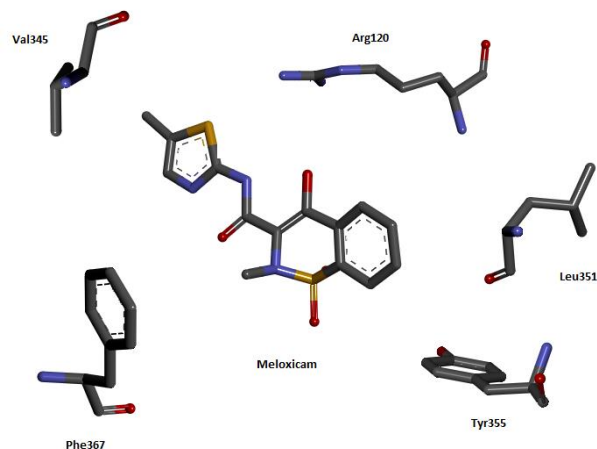
Esta enzima consta de 576 aminoácidos y se expresa en la totalidad de tejidos, especialmente plaquetas, células endoteliales, tracto gastrointestinal, túbulos colectores, y también en el sistema microvascular renal. Cuando se estimula, la expresión aumenta de dos a cuatro veces, es responsable de la regulación del flujo sanguíneo renal, excreción de sodio y protección de la mucosa gástrica [Salido M, *et al.*, 2001; Vitale P, *et al.*, 2013]. Los residuos aminoácidos que se encuentran en el sitio activo de esta enzima y de este modo interaccionan con los fármacos tenemos a: His 207, Arg 120, Ser 530, Tyr 385, His 388 (véase **Figura 20**) [Smith W, *et al.*, 2002].



**Figura 20.** Representación de la interacción de los aminoácidos en el sitio de unión con el ligando [Smith W, *et al.*, 2002] de la enzima ciclooxigenasa 1, se ha realizado con el programa *Discovery studio 4.0* [Accelry Software Inc., 2013].

#### 1.11.2. ENZIMA CICLOOXIGENASA 2 (COX-2) INDUCIBLE

Enzima que consta de 604 aminoácidos, la mayoría de veces es indetectable en la mayoría de tejidos en situación basal, esta aumenta entre 10 y 80 veces en presencia de citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento o endotoxinas. Se ha podido comprobar que esta no solo participa en la mediación de la inflamación sino también en funciones reguladoras. Hay veces que en situaciones aparece en riñón, cerebro (células endoteliales y neuronas corticales excitadoras), mucosa del colon, osteoclastos y algunas neoplasias [Salido M, *et al.*, 2001]. Dentro de los residuos aminoacídicos que se encuentran en el sitio activo y que de este modo interactúan con el fármaco son: Tyr 355, Arg 120, Leu 351, Phe 367, Val 345 (véase **Figura 21**) [Wang L, *et al.*, 2010].

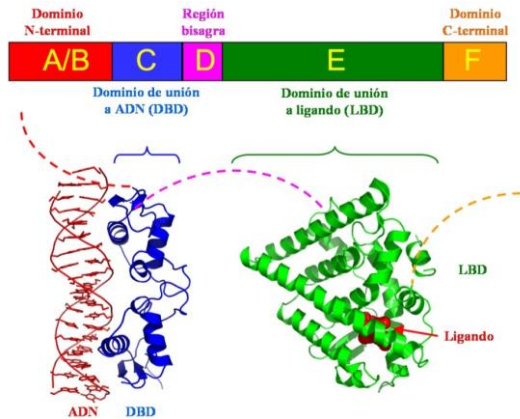


**Figura 21.** Representación de la interacción de los aminoácidos en el sitio de unión con el ligando [Wang L, *et al.*, 2010] de la enzima ciclooxygenasa 2, se ha realizado con el programa *Discovery studio* 4.0 [Accelry Software Inc., 2013].

### 1.12. RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

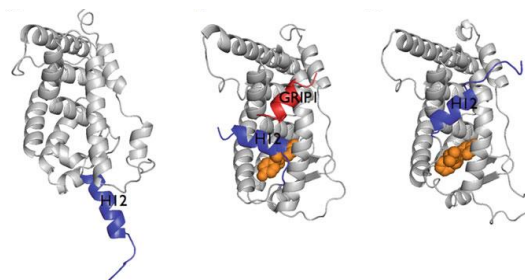
El receptor de estrógenos (ER) pertenece a una superfamilia de receptores nucleares que como su nombre lo dice mayoritariamente se encuentran en el núcleo, los cuales regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión al ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas o patológicas.

Estos receptores poseen unos dominios de unión que comparten directamente con los demás receptores nucleares que son el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD), entre estos dos dominios existe una región denominada bisagra la cual ayuda otorgando flexibilidad al receptor para la unión al ADN (véase **Figura 22**) [Noriega M, *et al.*, 2008; Pardee K, *et al.*, 2011].



**Figura 22.** Representación de cómo es la distribución conforme a las regiones dentro de la cadena que conforma al receptor de estrógenos, mostrando la localización de los dominios de unión y la región de bisagra [Noriega M, *et al.*, 2008].

El receptor de estrógenos, en ausencia de ligando, se encuentra mayoritariamente en el núcleo, en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico como Hsp90 y Hsp70. Cuando se une a un estrógeno, el ER se activa, dissociándose de las proteínas de choque térmico, y sufre varios cambios conformacionales para lograr la unión con sus elementos de respuesta sobre el DNA en las regiones reguladoras de genes blanco. Los receptores unidos al DNA reclutan a los factores basales de transcripción y la RNA polimerasa II por medio de su interacción directa o por medio de proteínas intermediarias. El conjunto ER-coactivador regula el acceso a la cromatina y estabilizan el complejo de preiniciación transcripcional (véase **Figura 23**).



**Figura 23.** Unión de un correpresor al receptor de estrógenos (GRIP I rojo), esta unión hace que el receptor sea más estable al entrar al núcleo, así mismo el movimiento de la hélice 12 (H12 morada) protege y cierra el sitio de unión junto con el ligando (color naranja) [Pardee K, *et al.*, 2011].

La transcripción de muchos genes se incrementa en presencia de estradiol, sin embargo la transcripción de otros es inhibida. En su mayoría, los genes regulados positivamente están involucrados en proliferación celular (véase **Figura 24**) [Noriega M, *et al.*, 2008], progresión del ciclo celular, mientras que aquellos que son regulados negativamente tienen que ver con apoptosis,

#### 1.12.1. FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

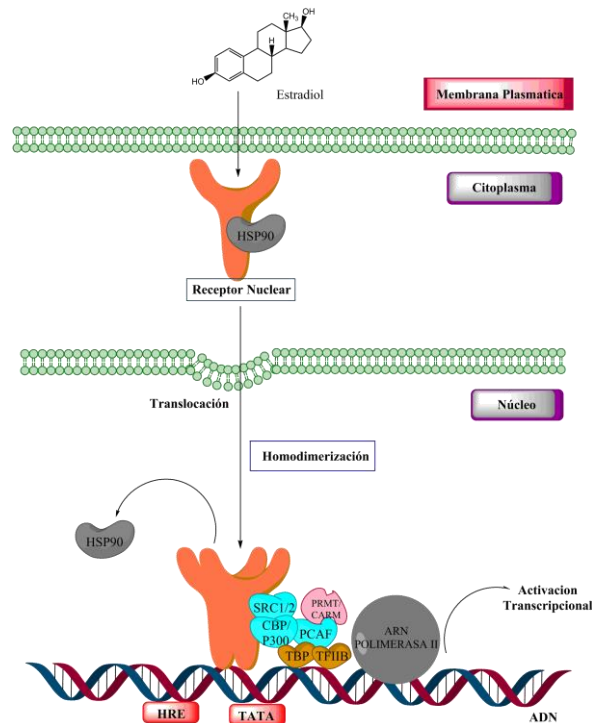
En el proceso inflamatorio, estos receptores tienen la función de regulación antiproliferativa, inhibición en la síntesis de NO, bloquea la expresión de moléculas de adhesión endotelial provocando que no haya paso de leucocitos a través de la pared endotelial, provoca la disminución en la producción de mediadores proinflamatorios (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1), cuando la producción de estradiol se inhibe, hay una inducción en la producción de iNOS, dando paso a un efecto inflamatorio, esto se ha demostrado en varios sistemas biológicos y celulares, sugiriendo que este es el rol primario de la vía del receptor de estrógenos.

La microglía, que juega un rol de defensa y reparo en el sistema nervioso central. En respuesta al daño cerebral o cambios inmunológicos, la microglía comienza a activarse haciendo cambios en su morfología, expresan antígenos de superficie y comienzan con la producción de mediadores inmunológicos. La precisa activación y función de la microglía, responde ante un estímulo induciendo fagocitosis como respuesta a evitar el daño neuronal, removiendo agentes externos y promueve el reparo tisular, siendo este un evento muy importante en la terminación del daño inflamatorio.

Por otro lado, si la activación de la microglía permanece activada, produce efectos negativos en las neuronas, de un modo tal que es un marcador en varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, demencia debido a SIDA, enfermedad de Huntington, enfermedad de Sandhoff, sugiriendo un potencial

citotóxico. Estas enfermedades han sido vistas cuando hay una reacción inflamatoria persistente (reacción inflamatoria crónica), lo que deriva en una reactivación de la microglia, y puede contribuir en los procesos de pérdida neuronal observados en estas enfermedades crónicas

Recientemente, grupos de investigadores han observado que el estradiol tiene una fuerte influencia en la actividad de la microglia. El estrógeno activa la microglia, que esto es inducido por el lipopolisacárido de la bacteria. Debido a esto se ha reportado las altas concentraciones de  $Er\alpha$  y  $Er\beta$  en la microglia (macrófagos y monoblastoides), esto ha sido revisado por estudios inmunocitoquímicos [Maggi A, 2002].

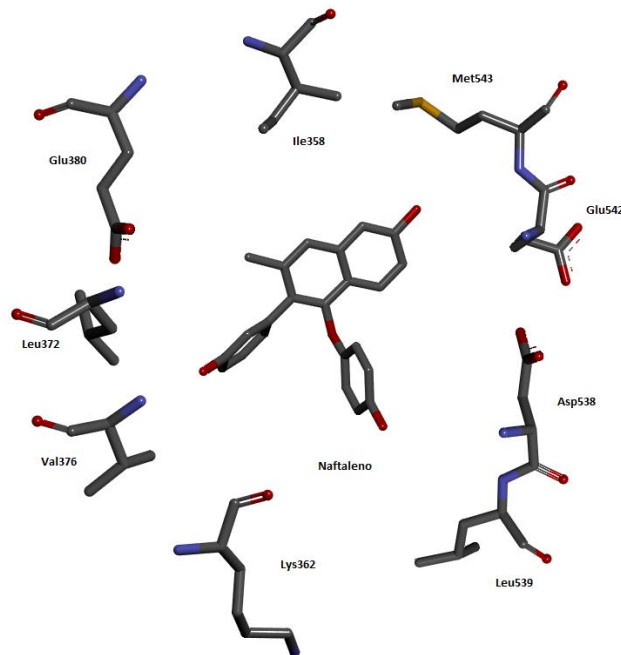


**Figura 24.** Activación del receptor de estrógenos (NR, *nuclear receptor*), comienza con la entrada del ligando a través de la membrana plasmática, uniéndose al receptor y activándolo, al activarlo las proteínas de choque térmico (HSP90) se separan del receptor. Sucesivamente el receptor se transloca al núcleo, al cual se le unen proteínas chaperonas (SRC1/2, PCAF, PRMT/CARM, CBP/p300), al unirse al ADN se unen TBP y TFIIB las cuales hacen más estable y sensible la unión del receptor de estrógenos, al final se une la ARN polimerasa II que realizara la formación de proteínas pro-inflamatorias y proliferación celular [Noriega M, *et al.*, 2008].

Hay dos tipos de receptores  $ER_{\alpha}$  y  $ER_{\beta}$ , de los cuales el receptor.

### 1.12.2. RECEPTOR DE ESTRÓGENOS $\alpha$

$ER_{\alpha}$  está formado por una sola cadena y consta de 565 aminoácidos [Noriega M, *et al* 2008], se localiza en útero, hígado, vagina, tejido óseo, eje hipotálamo-pituitaria y en los tumores de cáncer de mama [Dalsgaard J, 2005; Curtis S, 2002]. Este receptor los residuos aminoacídicos que interaccionan con el ligando son: Gly 375, Leu 372, Val 376, Glu 380, Met 543, Glu 542, Leu 539, Asp 538, Ile 358, Lys 362 (véase **Figura 25**) [Kushner P, 2000].

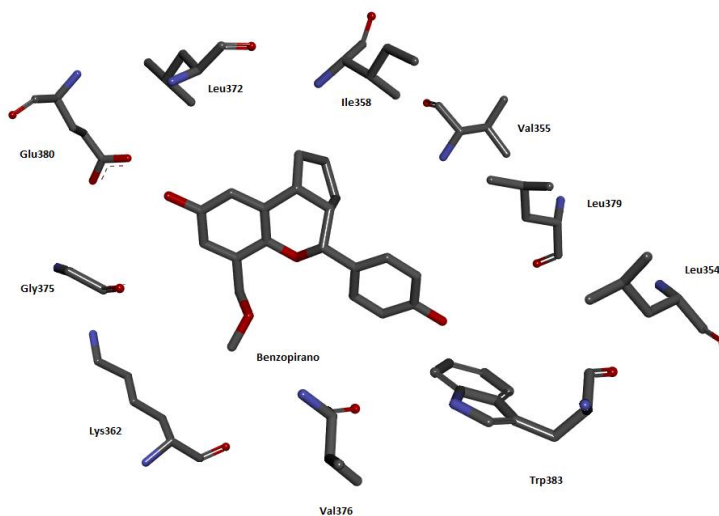


**Figura 25.** Representación de la interacción de los aminoácidos en el sitio de unión con el ligando [Kushner P, 2000] en el receptor de estrógenos alfa, se ha realizado con el programa *Discovery studio 4.0* [Accelry Software Inc., 2013].

### 1.12.3. RECEPTOR DE ESTRÓGENOS $\beta$

El  $ER_{\beta}$  está formado por una sola cadena y lo constituyen 530 aminoácidos [Noriega M, *et al.*, 2008], se localiza en próstata, ovario y algunas partes de cerebro. De este modo se pone en manifiesto la reacción de los cuerpos femenino y masculino cuando están expuestos naturalmente a estrógenos [Dalsgaard J,

2005; Curtis S, 2002]. Los residuos aminoacídicos que se encuentran en sus sitio activo e interaccionan con el ligando son: Gly 375, Leu 372, Leu 379, Val 376, Glu 380, Trp 383, Leu 354, Val 355, Ile 358, Lys 362 (véase **Figura 26**) [Kushner P, 2000].



**Figura 26.** Representación de la interacción de los aminoácidos en el sitio de unión con el ligando [Kushner P, 2000] en el receptor de estrógenos alfa, se ha realizado con el programa *Discovery studio 4.0* [Accelry Software Inc., 2013].

## 2. HERRAMIENTA A USAR DENOMINADA ACOPLAMIENTO LIGANDO-RECEPTOR (*DOCKING*)

El método *docking* se usa para analizar la unión del ligando (fármaco) con un blanco biomolecular (receptores, enzimas, canales, proteínas) [Matthias R. *et al.*, 2013], así como el sitio de unión, la orientación y posición que el ligando toma al unirse con el sitio activo del blanco, así como dilucidar los aminoácidos que hacen posible esta interacción entre ligando-receptor.

En el *docking* hay términos que se deben de conocer:

El lugar de interacción entre el ligando con su receptor se llama sitio de unión (*binding site*), que este describe todos los acontecimientos de unión. También se usa el termino de modo de unión (*binding mode*) que este describe todas las interacciones átomo por átomo del ligando con los aminoácidos que lo rodean.

*Back docking* (acoplamiento hacia atrás).

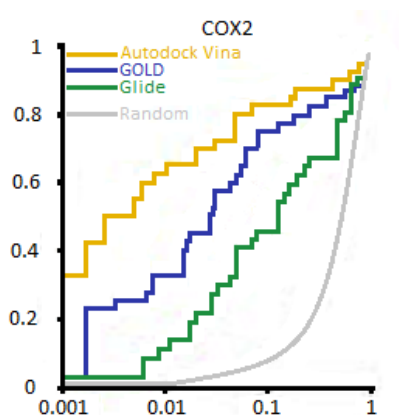
Es el acoplamiento de tipo controles positivos; es decir, cuando se extrae un ligando del complejo con su “receptor” conocido y se coloca en una la orientación y posición aleatoria al inicio del ensayo, y al final del acoplamiento, el ligando debería situarse en su orientación y posición conocidas por observaciones cristalográficas dentro del sitio de unión.

*Blind docking* (acoplamiento a ciegas).

Simula el acoplamiento al receptor con ligandos cuya orientación y posición de dicho ligando en el sitio activo del receptor no se conoce por falta de estudios cristalográficos.

El estudio de *docking*, necesita que las moléculas a estudiar o con las que se va a experimentar, tengan una gran resolución (alta calidad) para que el estudio tenga un buen resultado, así se asegura que el resultado es verídico. Hay diferentes tipos de programas para realizar *docking*, por ejemplo: *Glide*, *GOLD*, y *AutoDock Vina*. Estos programas se ponen a prueba entre si y contra diferentes blancos biomoleculares para verificar cuál de ellos es el apropiado para la realización del

experimento, la parte importante del estudio es ver qué tipo o paquete de propiedades fisicoquímicas toman en cuenta (*DEKOIS*) [Vogel S, *et al.*, 2011; Bauer M, *et al.*, 2013] por ejemplo, peso molecular, coeficiente de partición agua-octanol, número de enlaces rotables, número de hidrógenos donadores, a es, número de anillos aromáticos, cargas positivas o negativas. Al finalizar, los resultados se reportan un forma de graficas llamadas *pROC* (véase **Figura 27**) [Bauer M, *et al.*, 2013]. Y de este modo, se puede escoger el programa más adecuado para la realización del experimento.



**Figura 27.** Representación de una *pROC* de COX2, que da la información de que el programa *Autodock Vina* (color amarillo) es mejor que los otros 2 programas *GOLD* (color azul), *Glide* (color verde) la opción en color gris, señala el uso de cualquier otro programa (*Random*). Estas graficas dan la información de que, un valor más a la izquierda y hacia arriba es mejor significa que es un mejor programa a usar. Razón contraria, si, el valor está más a la derecha y hacia abajo es un peor resultado y un peor programa a usar [Ibrahim T, *et al.*, POSTER]

### 3. ESTUDIO RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (*SAR STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS*)

El estudio de la relación estructura-actividad (*Structure-Activity Relationships SAR*), permite relacionar grupos funcionales, con la acción de ciertos fármacos o moléculas.

Este tipo de estudio nos ayuda para elucidar mecanismos de acción, predicción de estructuras o desarrollo de nuevos fármacos. [Scior T, *et al.*, 2009].

## 4. JUSTIFICACIÓN

### 4.1. ANTECEDENTES

Año	Evento	Descripción
2010	XIX Congreso Italo-Latino Americano Calgari, Italia [García G, <i>et al.</i> , 2010]	El dolor se inicia por eventos que suceden en la piel o en tejido internos como vísceras, huesos o músculos, pero se requiere que el sujeto esté consciente y por lo tanto es una experiencia subjetiva que funciona como un medio natural de defensa. En la experimentación con animales, las mediciones de dolor se basan en las respuestas objetivas del sujeto cuando es sometido a una agresión nociceptiva, dichas respuestas son muy semejantes entre humanos y animales. Los modelos más empleados están basados en el uso de estímulos térmicos, como la prueba de <i>hot-plate</i> . En México, <i>Eupatorium glabratum</i> ha sido utilizada popularmente por sus efectos analgésicos sin embargo, poco se conoce acerca de dichos efectos. De aquí el interés de evaluar la actividad analgésica de <i>E. glabratum</i> en la prueba <i>hotplate</i> .
2011	Tesis de licenciatura [García G, <i>et al.</i> , 2011]	Búsqueda, identificación, extracción y aislamiento BOTIT estudio computacional
2011	Publicación Nacional Revista de Ciencias Farmacéuticas [García G, <i>et al.</i> , 2011]	<i>Ageratina glabrata</i> está ampliamente distribuida en México y es conocida popularmente por sus efectos analgésicos. Aunque esta especie ha sido estudiada químicamente, no hay estudios acerca de su efecto analgésico. En este trabajo fitofarmacéutico se evaluó el efecto analgésico del extracto de <i>A. glabrata</i> en dos modelos térmicos de dolor agudo en rata: la prueba del plato caliente y en la prueba de retirada de la cola. Se probaron dosis de extracto de 100mg/Kg y 150 mg/Kg para la prueba de plato caliente, y 100mg/Kg para la prueba de retirada de la cola. Los resultados preliminares obtenidos muestran que el extracto de hoja de <i>A. glabrata</i> posee efecto analgésico 5 horas posteriores a la administración en la prueba de plato caliente.
2011	Publicación Internacional:	<i>Ageratina glabrata</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob., Asteraceae (syn. <i>Eupatorium glabratum</i> Kunth) is

	<i>Brazilian Journal of Pharmacognosy</i> [García G, et al., 2011]	<i>widely distributed throughout Mexico and popularly known as “chamizo blanco” and “hierba del golpe” for its traditional use as external analgesic remedy. Though glabrata species has been chemically studied, there are no experimentally asserted reports about possible analgesic effects which can be inferred from its genus Ageratina. To fill the gap, we evaluated A.glabrata extracts in an animal model of nociception exploiting thermal stimuli. NMR and mass analyses identified a new thymol derivative, 10-benzoiloxy 6,8,9-trihydroxy-thymol isobutyrate, which was computationally converted into a ring-closed structure to explain interaction with the COX-2 enzyme in a ligand-receptor docking study.</i>
Mayo 2014	<i>Reverse Pharmacology Green pharma, Nouvé Orleans Francia</i>  Mensaje interno [Bernard P, et al., 2014]	<i>Docking contra 10001 Receptores Humanos. BOTIT para confirmar los 3 receptores, escogido anteriormente en SAR</i>

El siguiente trabajo de tesis se realizó para dar a conocer el(los) sitio(s) de unión del ligando que fue extraído de la planta *Agerarina glabrata* (sin. *Eupatorium glabratum* Kunth) el cual tradicionalmente es conocido con un efecto analgésico, dicho efecto puede confundirse con un efecto antiinflamatorio. Por lo tanto, simulamos la afinidad del ligando BOTIT frente al receptor de analgesia central receptor opioide  $\mu$  [Stefano G, 1999], al receptor de inflamación COX1 y COX2 [Batluoni M, 2010], y a un receptor nuclear receptor de estrógenos ER [Maggi A, 2002].

Se evalúa la interacción mediante herramientas computacionales (acoplamiento o *docking*), este ensayo *in silico* proporciona información sobre la afinidad del ligando por su blanco biomolecular y en este trabajo se estudian tres blancos biomoleculares, el receptor opioide  $\mu$ , la enzima ciclooxigenasa 1 y 2, y el receptor de estrógenos. Esperando que tenga unión preferentemente a la enzima

ciclooxigenasa y al receptor de estrógenos.

La preferencia en la unión va a ser decidida por la energía interacción, con la cual se puede inferir la afinidad o energía de unión en este caso del ligando por su blanco biomolecular.

## 5. HIPÓTESIS

El derivado de timol presenta afinidad por la enzima ciclooxigenasa y el receptor nuclear (estrógenos), pero no tiene afinidad por el receptor opioide.

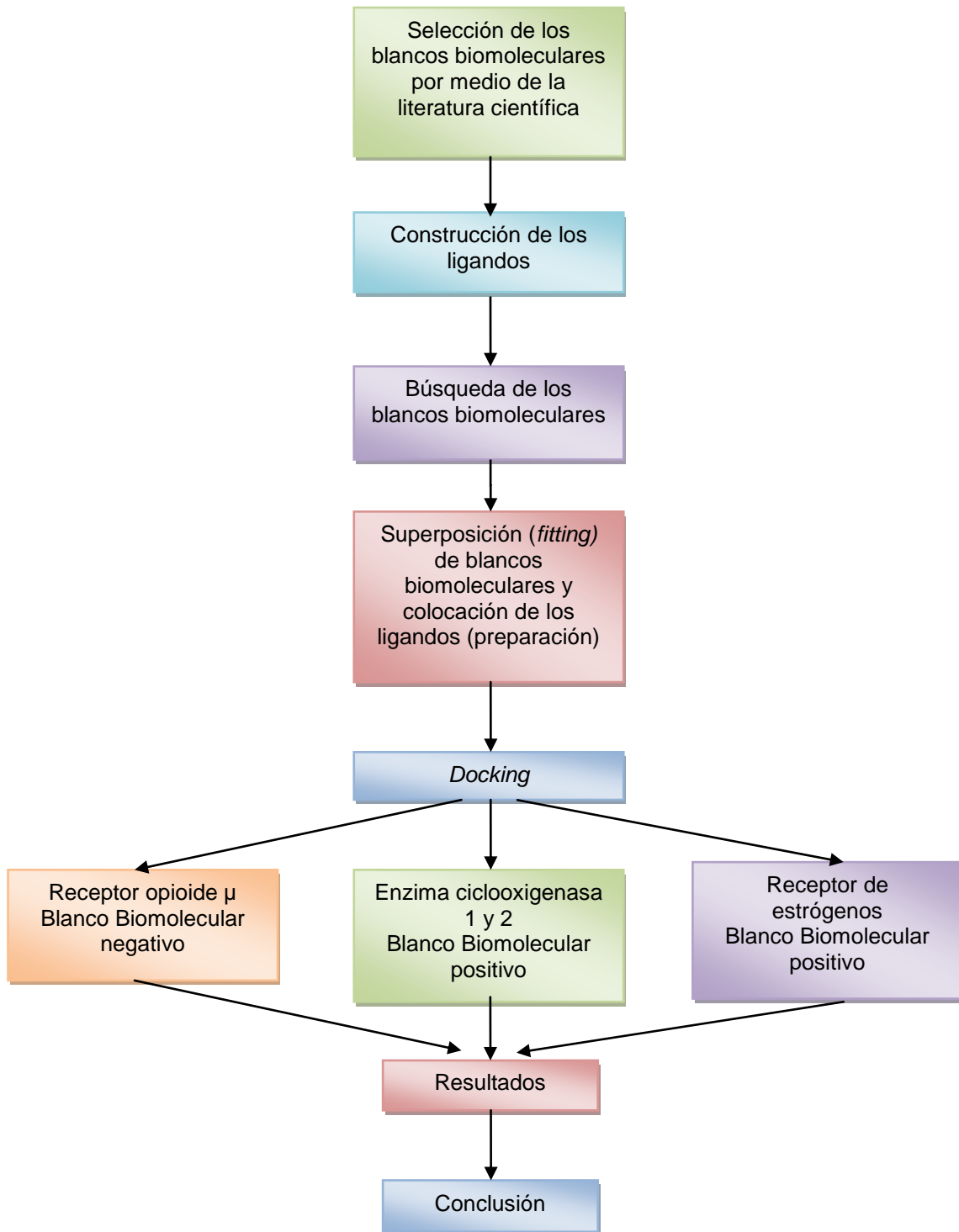
## 6. OBJETIVO GENERAL

Determinar por modelos computacionales la afinidad del derivado de timol (BOTIT) por el receptor opioide  $\mu$ , el receptor a estrógenos y la ciclooxigenasa 1 y 2.

### 6.1. Objetivos Particulares

1. Buscar y analizar en bases de datos los blancos biomoleculares, el receptor opioide  $\mu$ , enzimas ciclooxigenasa 1 y 2, y el receptor de estrógenos alfa y beta.
2. Analizar mediante la literatura científica los aminoácidos dentro del sitio activo cuales están conservados y cuales fueron cambiados a la hora de cristalizar.
3. Preparar los parámetros para el *docking (set up)* para el acoplamiento de los ligandos cristalizados.
4. Simular la unión de los ligandos con los blanco biomoleculares realizando *back docking* y *blind docking*.
5. Analizar los resultados de *docking* para inferir la afinidad y el sitio de unión de cada uno de los ligandos y en especial el ligando que es derivado de timol.

## 7. DIAGRAMA DE TRABAJO



## 8. METODOLOGÍA

Se realizó la búsqueda en internet de literatura que tenga como tema inflamación, terpenos, receptor opioide  $\mu$ , enzimas ciclooxygenasas, receptor de estrógenos.

Después de realizar la búsqueda se procedió a obtener los datos de las proteínas cristalizadas de las dianas biomoleculares, posterior a esto se realizó una superposición de las estructuras de las dianas biomoleculares, y colocación de los ligandos en los sitios de unión.

El procedimiento que se realizó es *docking*, dentro de este procedimiento están presentes tres tipos: *back docking* (acoplamiento hacia atrás: mismo ligando cristalizado, mismo sitio de unión), *blind docking* (acoplamiento a ciegas: diferente ligando, mismo sitio de unión) y *manual docking* (colocación manual del ligando en el sitio de unión), que se diferencian en la procedencia de los ligandos y la colocación en el sitio de unión, este procedimiento simula la interacción del ligando con el receptor lo cual nos proporciona como parámetro la afinidad.

El proceso de *docking* se realizó con el programa *autodock VINA* (Trott O, *et al.*, 2010), proporcionándonos la afinidad, posición o conformación que toma el ligando al interactuar con el blanco biomolecular, y la interfaz *autodock tools* 1.5.6 que permite visualizar cada uno de los ligandos, así como también de las conformaciones que adopte cada uno.

Posterior a la obtención de cada una de las energías de afinidad, se determinó mejor perfil de interacción, tomando en cuenta las afinidades que tienen los ligandos ya cristalizados con las dianas biomoleculares, los cuales fueron utilizados como controles positivos.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Estudio de tipo SAR (*Structure-Activity Relationship*) de los ligandos presentados

Se muestran las estructuras mostradas abajo, (véase **tabla 6**) con las que se realizó el acoplamiento molecular.

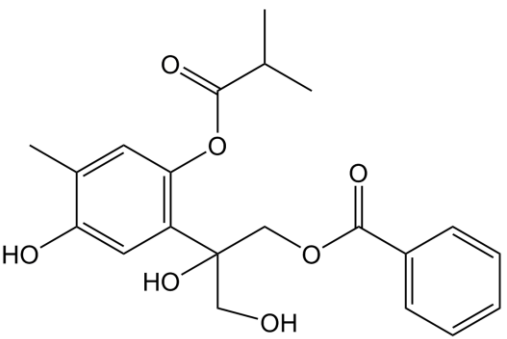
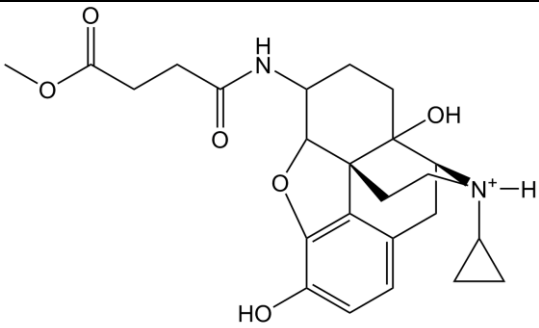
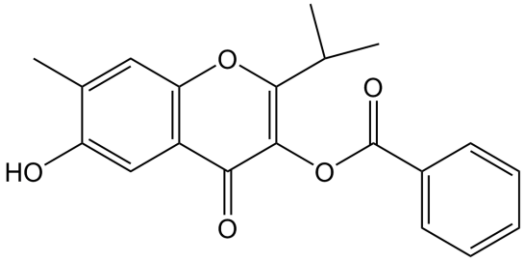
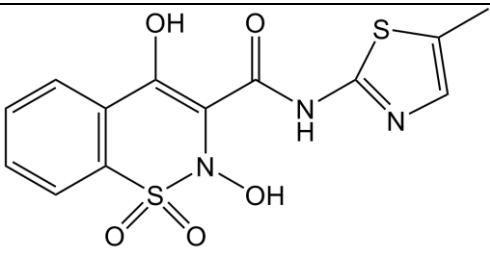
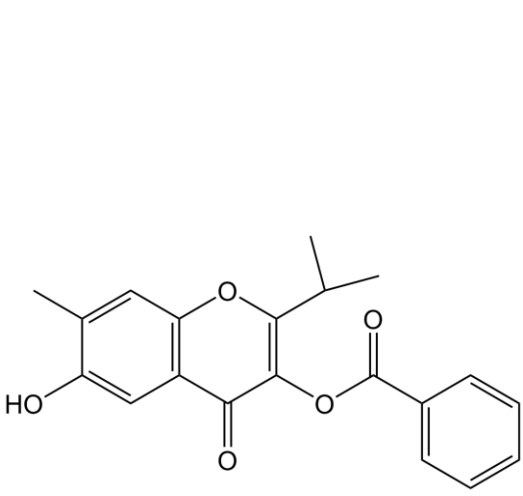
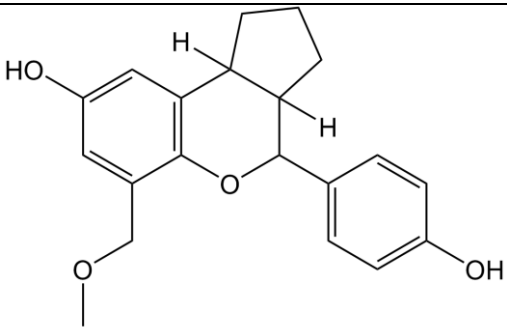
Mirándolas estructuralmente, para el receptor opioide  $\mu$ , su ligando cristalizado  $\beta$ -funaltrexamina es de pH básico, interacciona principalmente con el nitrógeno iónico y su esqueleto policíclico (gran tamaño), en comparación con BOTIT y bicíclico que son de pH ácido.

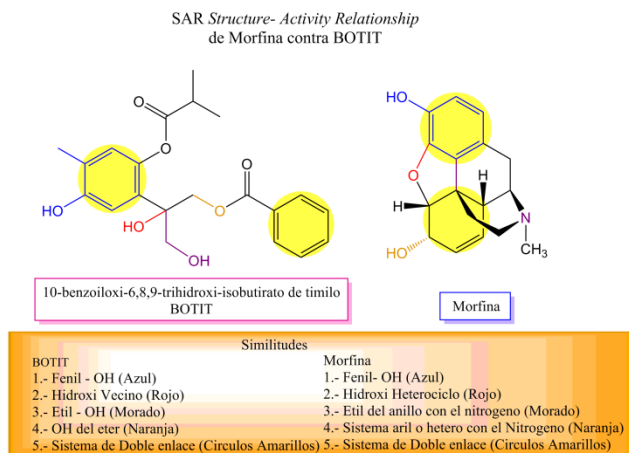
Dentro del esqueleto de la morfina, que de este se obtuvo  $\beta$ -funaltrexamina, tiene seis similitudes con BOTIT (véase **Figura 28**).

Con el ligando meloxicam (véase **Figura 29**), pasa lo mismo, tiene pH básico en comparación con los ligandos BOTIT y bicíclico que son ácidos.

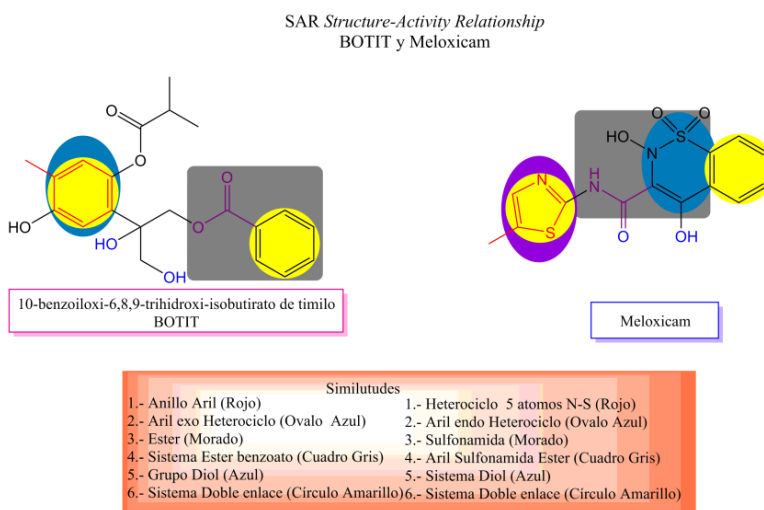
Los ligandos BOTIT y bicíclico, tienen gran parecido con el derivado de naftaleno y el derivado de benzopirano ligandos cristalizados de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. Son de pH ácido, son moléculas pequeñas, tienen como esqueleto principal dos ciclos (bicíclico, derivado de naftaleno y derivado de benzopirano).

**Tabla 6.** Figuras de la derecha, son los ligandos cristalizados con los que se realiza *back-docking* y los de la izquierda son con los que se realizó *blind-docking*.

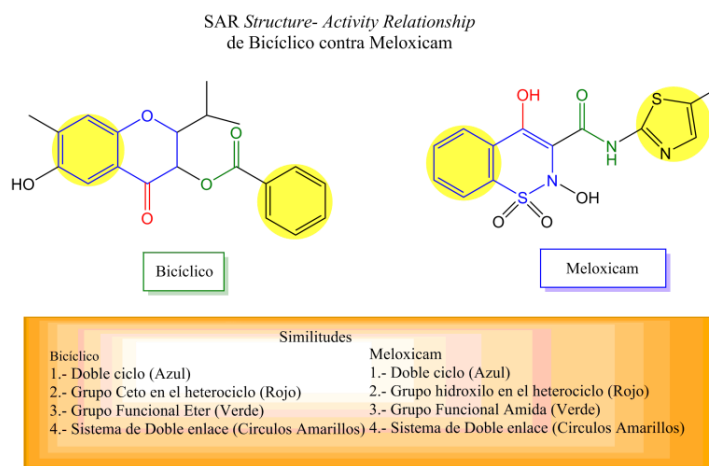
Ligandos derivado de timol	Ligandos cristalizados (figuras)
 <p data-bbox="276 871 779 913">Derivado de timol monocíclico (BOTIT)</p>	 <p data-bbox="909 682 1299 777"><math>\beta</math>-funaltrexamina (<math>\beta</math>-FNA), Derivado de Morfina</p>
 <p data-bbox="357 1617 698 1659">Derivado de timol bicíclico</p>	 <p data-bbox="1031 1060 1177 1092">Meloxicam</p>
 <p data-bbox="1039 1449 1169 1480">Naftaleno</p>	 <p data-bbox="1023 1848 1185 1879">Benzopirano</p>



**Figura 28.** Representación del SAR, realizado entre BOTIT y la morfina.

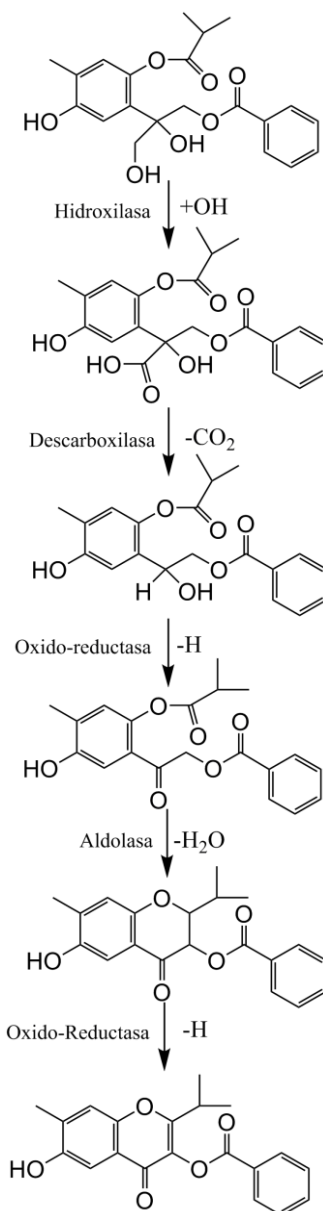


**Figura 29.** Representación de SAR, realizado en BOTIT y meloxicam



**Figura 30.** Representación de SAR, realizado en Biciclico y meloxicam

La estructura marcada es el resultado de varias reacciones que se llevan a cabo dentro del cuerpo humano por medio de diferentes enzimas, todas estas enzimas se encuentran en diferentes procesos del cuerpo (glucólisis). Así mismo las enzimas también se encuentran en las plantas (ruta de los flavonoides) y esta molécula, siendo un flavonoide tiene una mayor afinidad a algunas de nuestros blancos biomoleculares (véase **Figura 31**).



**Figura 31.** Representación de las interacciones del ligando BOTIT con las enzimas presentes dentro de la planta, dando la formación de un nuevo ligando (bicíclico), este ligando también es de interés por las interacciones que podría tener con nuestras dianas biomoleculares.

## 9.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR LIGANDO-RECEPTOR (*DOCKING*)

Estudio del sitio de unión y modo de unión de los ligandos cristalizados y los ligandos a prueba (derivado de timol BOTIT y derivado de timol bicíclico).

A todos los ligandos que se encuentran cristalizados se realiza un acoplamiento molecular llamado *back docking* (antes mencionado) el cual simula la interacción del ligando con su receptor, para esto se presentan cinco receptores o dianas biomoleculares, el receptor opioide  $\mu$  teniendo un código de PDB (*protein data bank*) [Berman H, *et al.*, 2000] 4DKL [Manglik A, *et al.*, 2012], que tiene como ligando a un compuesto similar a la morfina llamado  $\beta$ -funaltrexamina ( $\beta$ -FNA). También se tienen las isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX1 y COX2) que estas presentan el código de PDB 4O1Z [Xu S, *et al.*, 2014] y 4M11 [Xu S, *et al.*, 2014], respectivamente, estas enzimas presentan como ligando cristalizado a meloxicam. Y por último se tienen a los dos tipos del receptor de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  que presentan 3DT3 [Fang J, *et al.*, 2008] y 2JJ3 [Norman B, *et al.*, 2007] como códigos de PDB respectivamente, estos receptores tienen como ligandos cristalizados a un derivado de naftaleno y a un derivado de un benzopirano.

Cada diana biomolecular presenta un sitio de unión el cual está rodeado de residuos aminoacídicos, estos forman interacciones con los ligandos. Pueden interaccionar formando puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas y electrostáticas; estas interacciones ayudan a que el ligando se mantenga dentro del sitio de unión y realice su efecto.

Los sitios de unión de los blancos biomoleculares que se presentan abajo son los correspondientes a las dianas biomoleculares usadas para la realización del *back docking* y el *blind docking*.

### 9.2.1. RECEPTOR OPIOIDE $\mu$

En el receptor opioide  $\mu$ , los principales residuos aminoacídicos que interaccionan y mantienen la unión estable dentro del sitio de unión, pueden formar puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas e interacciones electrostáticas con  $\beta$ -funaltrexamina (ligando cristalizado); BOTIT y derivado de timol bicíclico (ligandos evaluados) (véase **Tabla 7** y **Figura 32**).

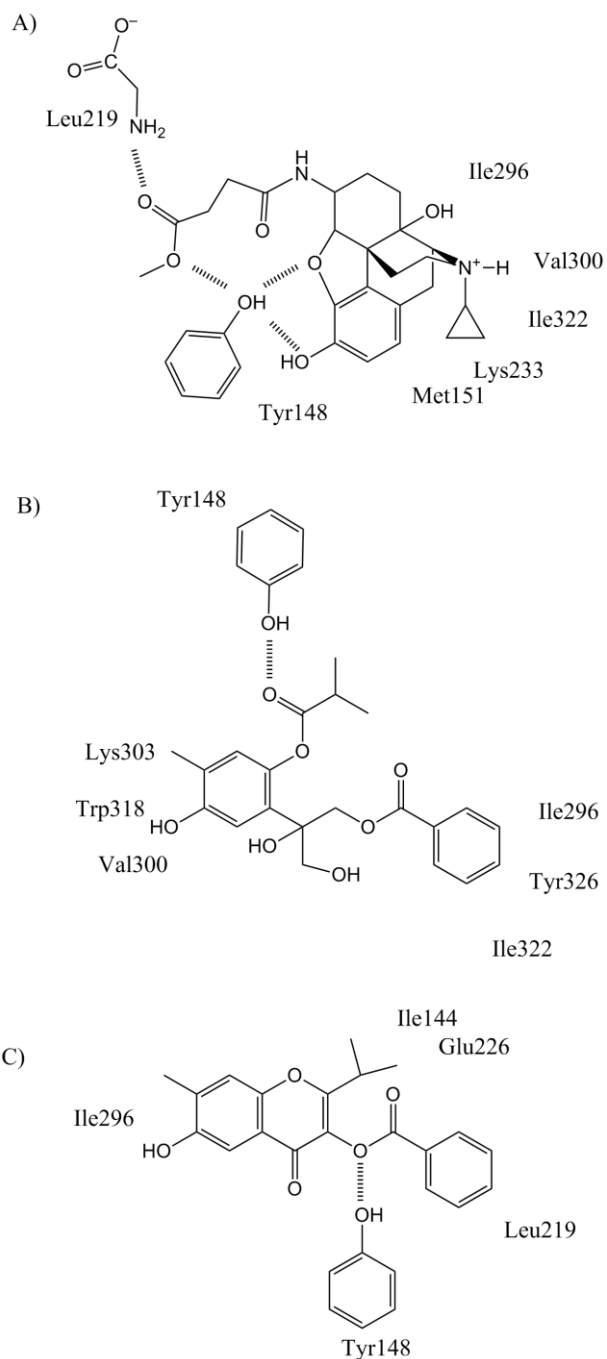
**Tabla 7.** Tabla que muestra las interacciones que tienen los ligandos con los residuos aminoacídicos dentro del sitio activo, estas pueden ser: puentes de hidrogeno, interacciones hidrófobas y electrostáticas.

Ligando	Interacciones con los aminoácidos											
	Puentes de Hidrógeno		Interacciones Hidrofóbicas									
	Y148	L219	W318	I296	V300	K303	K233	L219	Y326	M151	I144	I322
$\beta$ -funaltrexamina ( $\beta$ -FNA),	Yellow	Yellow	White	Yellow	Yellow	White	Yellow	White	White	Yellow	White	Yellow
BOTIT	Red	White	Red	Red	Red	Red	White	White	Red	White	White	Red
Bicíclico	Red	White	White	Red	White	White	White	Red	White	White	Red	White

Código de colores:

Amarillo: ligando cristalizado

Rojo: menor afinidad del ligando por el blanco biomolecular que el ligando cristalizado



**Figura 32.** Interacciones con el receptor opioide  $\mu$  en su sitio activo, a) se puede observar una mayor interacción hidrófoba con el ligando  $\beta$ -funaltrexamina (esqueleto policíclico) y formando dos puentes de hidrógeno con los residuos aminoácidos tirosina 148 (Tyr148, Y148) y leucina 219 (Leu219, L219), b) ligando BOTIT formando un puente de hidrógeno con tirosina148 (Tyr148, Y148) formando interacciones hidrófobas con 6 residuos aminoácidos más, c) ligando bicíclico formando también un puente de hidrogeno con tirosina148 (Tyr148, Y148) e interacciones hidrófobas con 4 residuos aminoácidos en el sitio activo del receptor.

## 9.2.2. ENZIMA CICLOOXIGENASA 1 (COX-1)

En la enzima ciclooxigenasa 1 (COX1), están presentes residuos aminoacídicos dentro del sitio activo, estos formaran interacciones con meloxicam (ligando cristalizado); BOTIT y el derivado de timol bicíclico (ligandos evaluados) (véase **Tabla 8** y **Figura 33**).

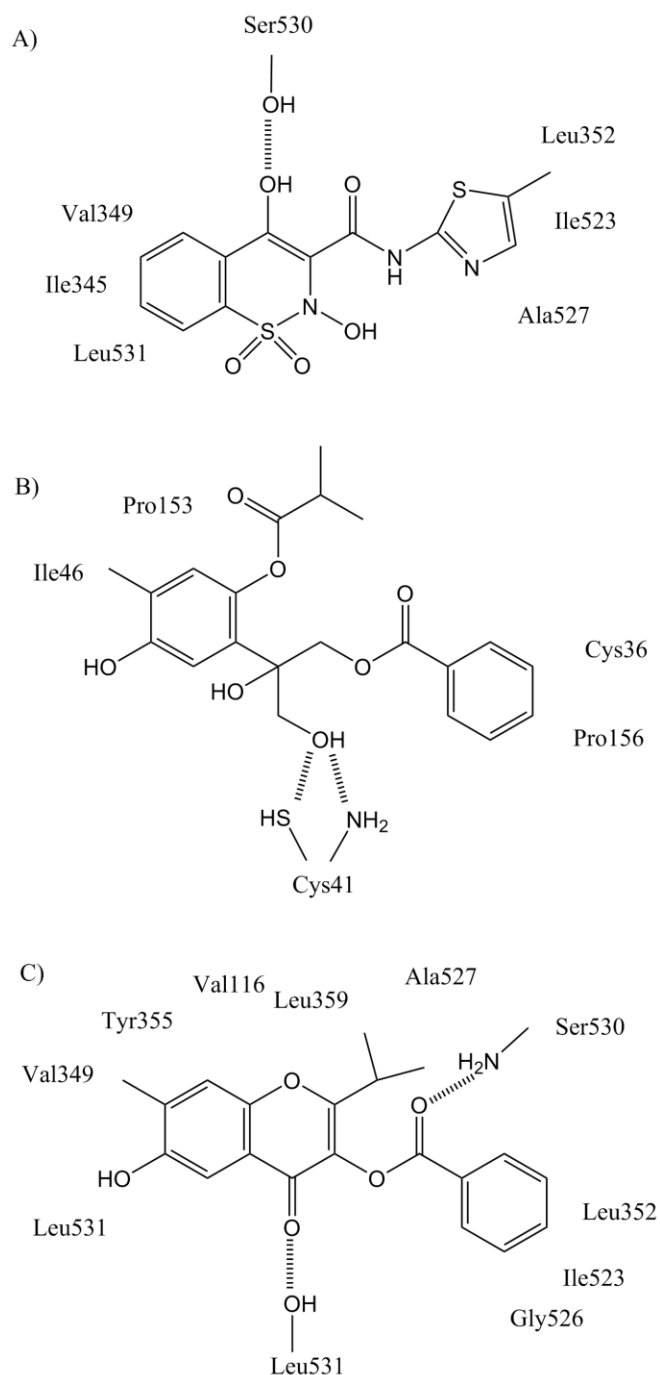
**Tabla 8.** Matriz de interacción, en donde se representan las interacciones que tiene cada ligando en el sitio de unión.

Ligando	Interacciones aminoacídicas																
	Puentes de Hidrógeno			Interacciones Hidrofóbicas													
	L531	S530	C41	V116	G526	A527	P153	P156	V349	I345	L352	Y355	L359	I523	L531	C36	I46
Meloxicam		Am				Am			Am	Am	Am			Am	Am		
BOTIT			Ver				Ver	Ver								Ver	Ver
Bicíclico	Am	Am		Am	Am	Am			Am		Am	Am	Am	Am	Am		

Código de colores:

Amarillo: ligando cristalizado y similitud entre la afinidad del ligando cristalizado con BOTIT bicíclico

Verde: mayor afinidad del ligando por el blanco biomolecular que el ligando cristalizado



**Figura 33.** Representación de las interacciones en el sitio activo en la enzima COX1, a) es la interacción que forma el ligando cristalizado con la proteína, haciendo 7 interacciones, formando un puente de hidrogeno con serina530 (Ser530, S530). B) el ligando monocíclico, se encuentra interaccionando con 4 aminoacidos, con cisteína 41 (Cys41, C41) forma un puente de hidrogeno. C) el ligando bicíclico interacciona con 9 aminoacidos, este interacciona mayoritariamente de forma hidrófoba, solo formando dos puentes de hidrogeno, con serina 530 (Ser530, S530) y con leucina 531 (Leu531, L531).

### 9.2.3. ENZIMA CICLOOXIGENASA 2 (COX-2)

En la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) están presentes residuos aminoacídicos dentro del sitio activo, estos formaran interacciones con meloxicam (ligando cristalizado); BOTIT y el derivado de timol bicíclico (ligandos evaluados) (véase **Tabla 9** y **Figura 34**)

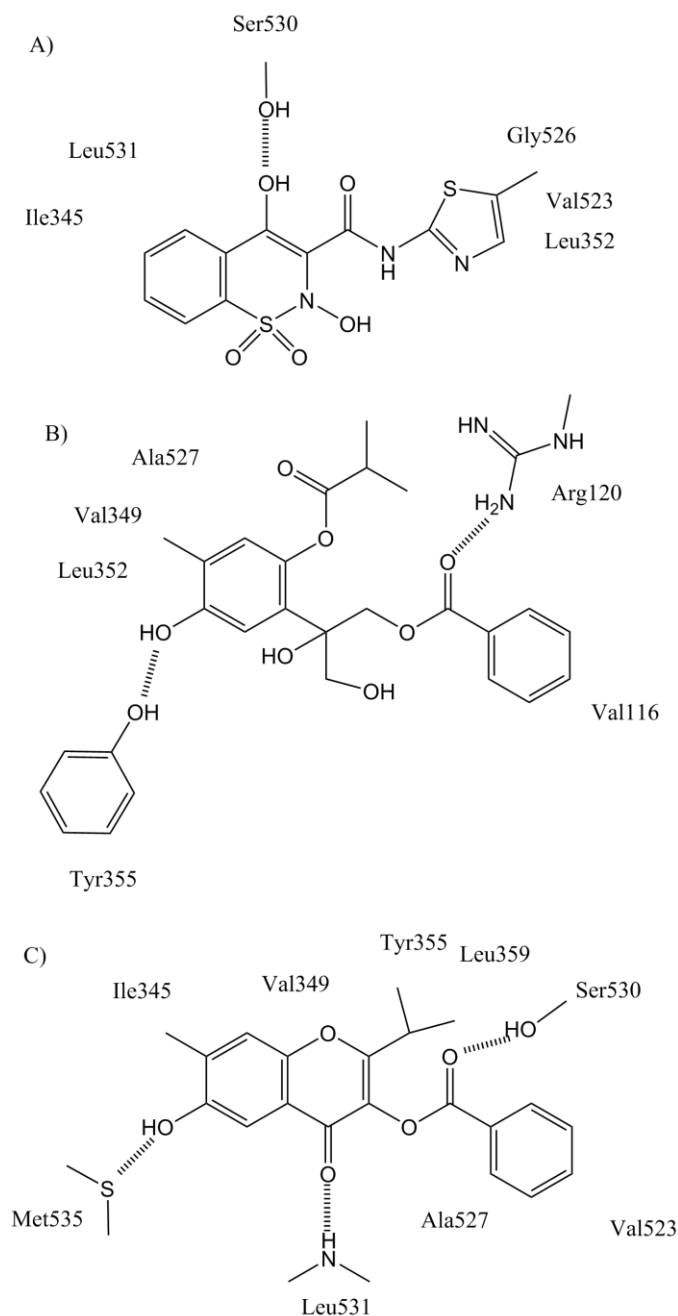
**Tabla 9.** Matriz de interacción, en donde se representan las interacciones que tiene cada ligando en el sitio de unión.

Ligando	Interacciones aminoacídicas														
	Puentes de hidrogeno					Interacciones Hidrófobas									
	S530	R120	M535	Y355	L531	L531	I345	G526	V523	L352	V349	R527	V116	Y355	L359
Meloxicam	Am					Am	Am	Am	Am	Am					
BOTIT		Am		Am						Am	Am	Am	Am		
Bicíclico	Ver		Ver		Ver		Ver		Ver		Ver	Ver		Ver	Ver

Código de colores:

Amarillo: ligando cristalizado y similitud entre la afinidad del ligando cristalizado con BOTIT monocíclico

Verde: mayor afinidad del ligando por el blanco biomolecular que el ligando cristalizado



**Figura 34.** Representación de la interacción en el sitio activo de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2). a) Es la interacción que forma el ligando cristalizado con la proteína, haciendo 5 interacciones hidrófobas y formando un puente de hidrogeno con serina 530 (Ser530, S530); b) el ligando monocíclico, hace interacción hidrófoba con 4 residuos aminoacídicos y forma 2 puentes de hidrogeno con arginina 120 (Arg120, R120) y tirosina 355 (Tyr355, Y355); c) el ligando bicíclico forma interacciones hidrófobas con 6 residuos aminoacídicos y forma tres puentes de hidrogeno, con serina 530 (Ser530, S530), con leucina 531 (Leu531, L531) y metionina 535 (Met535, M535).

### 9.2.4. RECEPTOR DE ESTRÓGENOS $\alpha$ (ER $\alpha$ )

El sitio de unión del receptor de estrógenos  $\alpha$  están presentes residuos aminoacídicos, que estos formaran interacciones con naftaleno (ligando cristalizado); BOTIT y el derivado de timol biciclico (ligandos evaluados) (véase **Figura 35**), este último no interacciona con los ligandos, porque se encuentra fuera del sitio de unión (véase **Tabla 10**).

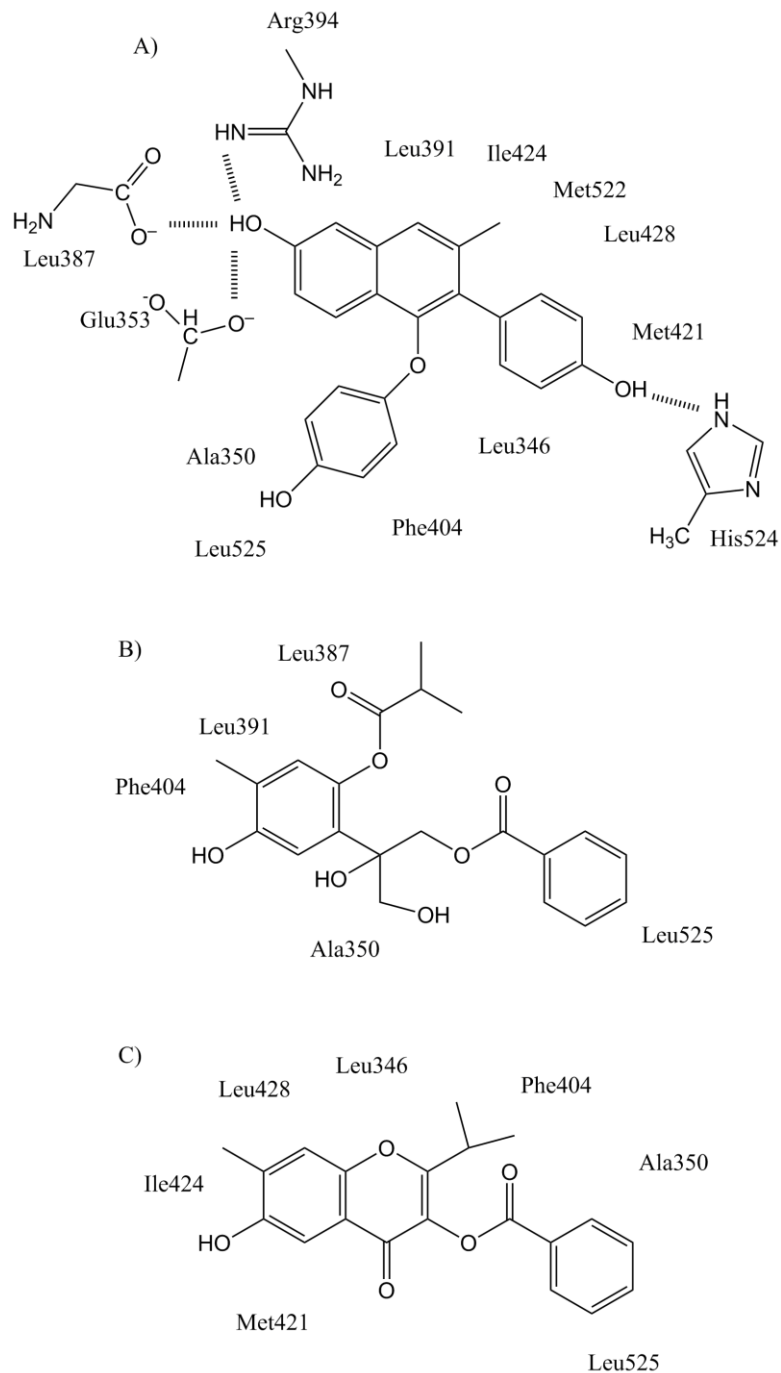
**Tabla 10.** Matriz de interacción, en donde se representan las interacciones que tiene cada ligando en el sitio de unión.

Ligando	Interacciones aminoacídicas													
	Puentes de Hidrógeno				Interacciones Hidrófobas									
	H524	R394	L387	E353	L391	L387	L525	A350	F404	M421	I424	L428	L346	M522
Naftaleno	Am	Am	Am	Am	Am	Bl	Am	Am	Am	Am	Am	Am	Am	Am
BOTIT	Bl	Bl	Bl	Bl	R	R	R	R	R	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl
Biciclico	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	R	R	R	R	R	R	R	Bl

Código de colores:

Amarillo: ligando cristalizado

Rojo: menor afinidad del ligando por el blanco biomolecular que el ligando cristalizado



**Figura 35.** Representación de las interacciones entre los ligandos y los aminoácidos en el sitio de unión del receptor de estrógenos  $\alpha$ . Siendo a) el ligando que estaba cristalizado, interacciona con 9 residuos aminoacídicos, formando interacciones hidrófobas mayoritariamente, forma 4 puentes de hidrógeno con ácido glutámico 353 (Glu353, E353), arginina 394 (Arg394, R394), leucina 387 (Leu387, L387) e histidina 542 (His542, H542). B) el ligando monocíclico interacciona solo de forma hidrófoba con 5 residuos aminoacídicos. C) el ligando bicíclico interacciona con 7 aminoácidos en el sitio de unión.

### 9.2.5. RECEPTOR DE ESTRÓGENOS $\beta$ (ER $\beta$ )

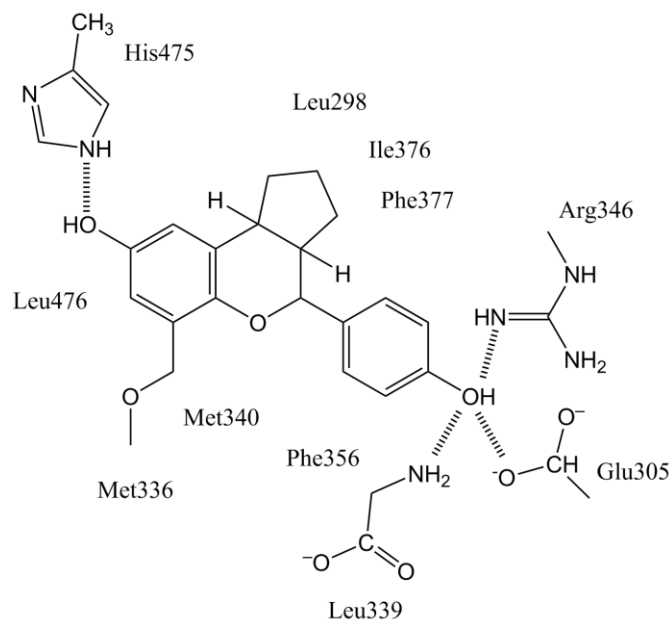
El sitio de unión del receptor de estrógenos  $\beta$  y están presentes residuos aminoacídicos dentro del sitio activo, estos formaran interacciones con benzopirano (ligando cristalizado); BOTIT y el ligando de timol bicíclico (ligandos evaluados) (véase **Figura 36**), los ligandos evaluados no interaccionan con los aminoácidos del sitio activo, porque se encuentra fuera de este (véase **Tabla 11**).

**Tabla 11.** Matriz de interacciones que muestra los ligandos y los aminoácidos del receptor de estrógenos  $\beta$  con los que hace interacción.

Ligando	Interacciones aminoacídicas										
	Puentes de Hidrogeno				Interacciones Hidrófobas						
	H475	L339	E305	R346	L298	F356	F377	L476	I376	M340	M336
Benzopirano											
BOTIT	No se reporta porque todas las posiciones que toma el ligando están fuera del área propuesta para el sitio de acción										
Bicíclico	No se reporta porque todas las posiciones que toma el ligando están fuera del área propuesta para el sitio de acción										

Código de colores:

Amarillo: ligando cristalizado

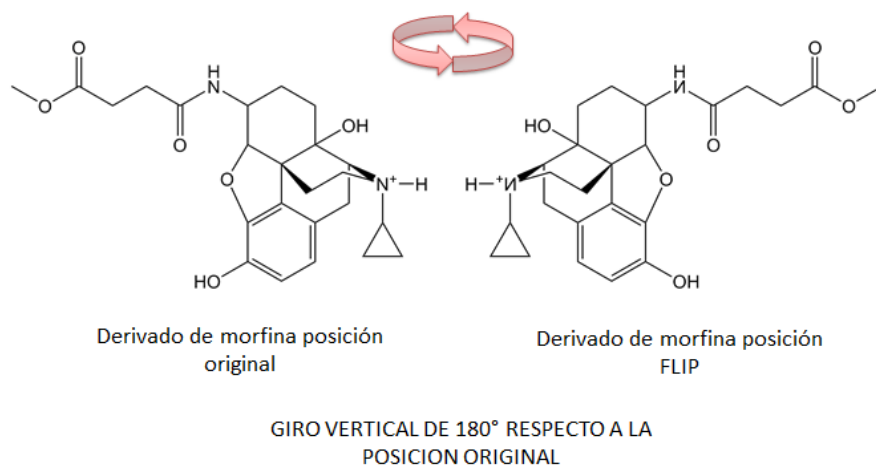


**Figura 36.** Representación del ligando benzopirano y los 7 aminoácidos, principalmente hidrófobos que hacen interacción con el benzopirano en el sitio activo, formando 4 puentes de hidrogeno con arginina 346 (Arg346, R346), ácido glutámico 305 (Glu305, E305), leucina 339 (Leu339, L339) e histidina 475 (His475, H475).

### 9.3. TABLAS DE ENERGÍAS DE INTERACCIÓN

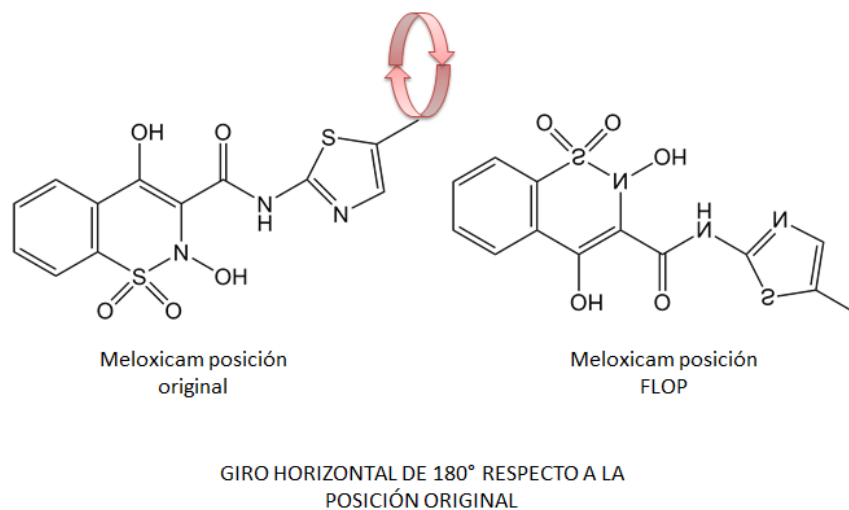
Los movimientos descritos FLIP y FLOP son posiciones que toman los ligados al final del acoplamiento:

- Movimiento FLIP



**Figura 37.** Representación del movimiento FLIP, que es un giro vertical de 180°, respecto a la posición original del ligando.

- Movimiento FLOP



**Figura 38.** Representación del movimiento FLOP, que es un giro horizontal de 180°, respecto a la posición original del ligando

**Tabla 12.** Receptor opioide  $\mu$  (mOR)

<b>Ligando</b>	<b>Afinidad (<math>\Delta G</math>)</b>	<b>Posición de mayor afinidad dentro del sitio activo</b>
methyl 4-[(5beta,6alpha)-17-(cyclopropylmethyl)-3,14-dihydroxy-4,5-epoxymorphinan-6-yl]amino}- 4-oxobutanoate <b>análogo de morfina</b>	-9.0	FLIP (respecto al ciclopropilo)
Derivado de timol Monocíclico	-8.8	FLIP (rotación de la ramificación del ciclo)
Derivado de timol Bicclico	-8.6	FLOP (toda la molécula, se observa en la ramificación del ciclo)

**Tabla 13.** Enzima ciclooxygenasa 1 (COX-1)

<b>Ligando</b>	<b>Afinidad (<math>\Delta G</math>)</b>	<b>Posición de mayor afinidad dentro del sitio activo</b>
Meloxicam	-8.4	Posición de origen
Derivado de timol Monocíclico	-10.2	Todas fuera de la caja
Derivado de timol bicclico	-8.6	Posición muy cercana al ligando cristalizado

**Tabla 14.** Enzima ciclooxygenasa 2 (COX-2)

<b>Ligando</b>	<b>Afinidad (<math>\Delta G</math>)</b>	<b>Posición de mayor afinidad dentro del sitio activo</b>
Meloxicam	-10.5	Posición de origen
Derivado de timol Monocíclico	-10.2	FLOP (ciclo principal)

Derivado de timol Biciclico	-10.7	Posición muy cercana al ligando cristalizado
-----------------------------	-------	--

**Tabla 15.** Receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ )

<b>Ligando</b>	<b>Afinidad (<math>\Delta G</math>)</b>	<b>Posición de mayor afinidad dentro del sitio activo</b>
Naftaleno	-11.5	Posición de origen
Derivado de timol Monocíclico	-8.5	Mov. de 90° de la ramificación con el ciclo respecto al ciclo principal
Derivado de timol Biciclico	-7.4	Mov. de 100° toda la molécula respecto a la colocación del ligando y flip del ciclo sustituyente

**Tabla 16.** Receptor de estrógenos  $\beta$  (ER $\beta$ )

<b>Ligando</b>	<b>Afinidad (<math>\Delta G</math>)</b>	<b>Posición de mayor afinidad dentro del sitio activo</b>
Benzopirano	-10.7	Posición de origen
Derivado de timol Monocíclico	-8.6	FLOP (Mov. Del ligando fuera de la posición original)[todas las moléculas fuera]
Derivado de timol Biciclico	-7.7	FLOP & FLIP (MOV 180° DE ACUERDO A LA POSICION DEL LIGANDO AL INICIO Y MOV. FUERA DE LA POSICION ORIGINAL [todas las moléculas fuera]

## 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La planta *Ageratina glabrata* ha sido usada en la medicina tradicional, existen experimentos realizados por García G, *et al.*, 2011 usando un extracto de esta planta. En esta investigación es para dar a conocer los aminoácidos dentro del sitio activo de los blancos biomoleculares receptor opioide  $\mu$ , enzimas ciclooxigenasas 1 y 2, y receptor de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$ , con los que BOTIT y bicíclico se hacen interaccionar.

Se pusieron a prueba dos ligandos, uno derivado de timol y otro con estructura similar a los flavonoides, denominado bicíclico. La importancia que tienen estas moléculas, es ver si tienen una actividad de mitigar dolores.

Las energías de afinidad que se obtuvieron a partir del *docking* son expresiones logarítmicas para así deducir la afinidad de una molécula por otra, para esto se toma en cuenta el valor que arroja el *docking* del ligando cristalizado (*back docking*).

Los resultados obtenidos indican que los ligandos ( $\beta$ -funaltrexamina, BOTIT y bicíclico) tienen una alta afinidad de interacción por el receptor opioide  $\mu$  en estado inactivo de -9.0, -8.8 y -8.6 Kcal/mol, respectivamente. Estas interacciones son importantes porque demuestran una interacción con aminoácidos como valina 300 (Val 300, V300), metionina 151 (Met 151, M151), Isoleucina 249 (Ile 249, I249) y lisina 233 (Lys 233, K233) para el caso de  $\beta$ -funaltrexamina, y treonina 148 (Thr 148, Y148), valina 300 (Val 300, V300) e Isoleucina 249 (Ile 249, I249) para BOTIT y treonina 148 (Thr 148, Y148) para bicíclico (véase **Tabla 7** y **Figura 32**) [Manglik A, *et al.*, 2012].

La conformación inactiva que toma el receptor es gracias a una interacción entre dos residuos aminoacídicos, treonina 279 (Thr 279, T279) y arginina 165 (Arg 165, R165), esta interacción está estabilizada por un puente de hidrógeno entre estos dos aminoácidos [Manglik A, *et al.*, 2012]. La activación del receptor se da por el cambio de la treonina 279 (Thr 279, T279) por una lisina en la misma posición, no

llevándose a cabo este puente de hidrógeno. Dada esta aclaración, los resultados obtenidos no tienen relevancia, puesto que el ligando no va a realizar la función deseada en este blanco biomolecular.

Los resultados respecto a la enzima COX-1, el ligando de timol bicíclico da una afinidad de -8.6 Kcal/mol, tomando en cuenta al ligando cristalizado meloxicam con -8.4 kcal/mol, se encuentra interaccionando con serina 530 (Ser530, S530) (véase **Tabla 8** y **Figura 33**), este aminoácido es indispensable [Smith W, *et al.*, 2002], interacción con esta enzima porque forma un puente de hidrógeno con el ligando, estabilizando la acoplamiento. El ligando derivado de timol se encuentra fuera del sitio de interacción propuesto.

Las energías de unión respecto a la enzima COX-2 que obtuvimos respecto al ligando derivado de timol BOTIT y el ligando bicíclico, son -10.2 Kcal/mol y -10.7 Kcal/mol, respectivamente. Observando que el ligando cristalizado con la diana biomolecular es meloxicam y tiene -10.5 Kcal/mol de energía de unión. Se puede deducir que el ligando de timol bicíclico tiene mayor afinidad con esta enzima, tiene interacciones con leucina 351 (Leu 351, L351) y con tirosina 355 (Tyr 355, Y355) (véase **Tabla 9** y **Figura 34**), con ambos aminoácidos presenta puentes de hidrógeno. El ligando BOTIT presenta dos puentes de hidrógeno con arginina 120 (Arg120, R120) y tirosina 355 (Tyr355, Y355) (véase **Tabla 9** y **Figura 34**), [Wang L, *et al.*, 2010]. De acuerdo a lo anterior, BOTIT y bicíclico tienen una afinidad similar que meloxicam por COX-2, lo que nos daría como resultado que posiblemente disminuiría la producción de prostaglandinas y así la inhibición de la reacción inflamatoria, y la subsecuente disminución del dolor.

Las energías que se obtuvieron con el receptor de estrógenos  $\alpha$ , el ligando cristalizado derivado de naftaleno obtuvo una energía de interacción de -11.5 Kcal/mol, interaccionando puentes de hidrógeno con ácido glutámico 353 (Glu353, E353), arginina 394 (Arg394, R394), leucina 387 (Leu387, L387) e histidina 524 (His524, H524); el ligando BOTIT interacciona de manera hidrófoba dentro del

sitio activo, teniendo una energía de interacción de -8.5 Kcal/mol; el ligando bicíclico tiene una energía de interacción de -7.4 Kcal/mol y también se une mediante interacciones hidrófobas (véase **Tabla 10** y **Figura 35**).

En el receptor de estrógenos  $\beta$ , los ligandos a prueba salieron del sitio de unión, quedando solamente el ligando cristalizado. Con una energía de interacción de interacción de -10.7 Kcal/mol (véase **Tabla 11** y **Figura 36**).

Los ligandos BOTIT y bicíclico al acoplarse con los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  tienen una menor afinidad que los ligandos cristalizados, lo que nos daría como resultado que nuestros ligandos no inhibirían a estos receptores, y así no bloquearían su función de factor de transcripción, de tal modo que no disminuyen la producción de sustancias proinflamatorias y así el proceso inflamatorio dentro del sistema nervioso central.

## 11.CONCLUSIÓN

De la estructura BOTIT que se obtuvo al resolver los resultados de resonancia magnética nuclear del extracto de *Ageratina glabrata* antes *Eupatorium glabratum* Kunth, se plantea una nueva estructura bicíclica.

De acuerdo a los resultados a partir del *docking* obtenidos concluimos que:

- El receptor opioide  $\mu$  en estado inactivo, BOTIT y su derivado bicíclico presentan una afinidad muy similar al ligando que se encuentra cristalizado junto con la estructura proteica, por lo que se propone que la vía analgésica mediada por este receptor está descartada
- BOTIT y su derivado bicíclico tienen una mayor afinidad por COX2 por lo que la vía que inactiva o está involucrada es por COX-2 (inflamación).
- Con la enzima COX-1 el ligando BOTIT interacciona fuera del sitio de acción propuesto.
- El ligando BOTIT tiene una menor afinidad por el receptor de estrógenos  $\alpha$  que el ligando cristalizado dentro de la estructura proteica, por lo que se puede descartar una actividad dentro del sistema nervioso central.
- Ninguno de los ligandos (BOTIT y su derivado bicíclico) se une en el sitio de acción propuesto para el receptor de estrógenos  $\beta$ , a causa de que el ligando cristalizado se encuentra en otra posición.

## 12.REFERENCIAS

1. Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego: Accelrys Software Inc., 2013.
2. Ai-Xia Cheng, Young-Gen Lou, Ying-Bo Mao, Shan Lu, Ling-Jian Wang Xiao-Ya Chen. "Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions", *Journal of Integrative Plant Biology* (2007), 49(2): 179-186.
3. Avalos A, Perez-Urria E. "Metabolismo secundario de plantas", *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal* (2009), 2(3): 119-145.
4. Bauer M, Ibrahim T, Vogel S, Boeckler F. "Evaluation and Optimization of Virtual Screening Workflows with DEKOIS 2.0 – A Public Library of Challenging Docking Benchmark Sets". *Journal of Chemistry Information Modeling* (2013), 53, 1447–1462.
5. Berman H, Westbrook J, Feng J, Gilliland G, Bhat T, Weissig H, Shindyalov I, Bourne P, "The Protein Data Bank", *Nucleic Acids Research* (2000), 28: 235-242.
6. Bernard P, Blondeau S, Scior T, Do QT, Morin-Allory L. "Reverse pharmacognosy: another way to harness the generosity of nature." *Current Pharmacology Design*. 2010 May; 16 (15):1682-96. Review.
7. Breitmaier E. "Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones", 1 Ed. Tubingen Germany: Wiley-VCH; 2006, ISBN: 3-527-31786-4.
8. Chakrabarti S, Law P, Loh H. "Distinct Differences Between Morfine-and [D-Ala<sup>2</sup>N-MePhe<sup>4</sup>,Gly-<sup>o</sup>15]-Enkephalin —,μ-Opioid Receptor Complexes Demonstrated by Cyvliv AMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylation", *Journal of Neurochemistry* (1998), 71, 231-239.
9. Claria J. "cyclooxygenase-2 Biology", *Current Pharmaceutical Design* (2003): 2177-2190.
10. Crocoll C. "Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme" [thesis doctoral], Max-Planck-Institut furchemische Okologie; 2011.
11. Curtis S, Korech K. "Estrogen Receptor: structure, mechanism and function", *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* (2002): 193-200.

12. Dalsgaard J. "The Estrogen Receptor", Department of Chemistry University of Aarhus Denmark [Bachelor's thesis], 2005.
13. Duggan K, Hermanson D, Musee J, Prusakiewicz J, Scheib J, Carter B, Banerjee S, Oates J, Marnett L. "(R)-Profens are substrate-selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by COX-2", *Nature Chemistry Biology* (2011): 803-809.,
14. Fang J, Akwabi-Ameyaw A, Britton J, Katamreddy S, Navas III F, Miller A, Williams S, Gray D, Orband-Miller L, Shearin J, Heyer D. "Synthesis of 3-alkyl naphthalenes as novel estrogen receptor ligands", *Bioorganic & Medicinal Chemical Letters*, (2008): 5075-5077.
15. Fertig, W, "*Eupatorium glabratum Kunth*", Arizona State University Vascular Plant Herbarium, <http://swbiodiversity.org/seinet/collections/individual/index.php?occid=1121874>.
16. García G, Del Rio R, Guzmán R, Martínez M, Scior T. Estudios preliminares sobre el efecto analgésico del extracto de hojas de *Ageratina glabrata* en dos modelos térmicos de dolor agudo, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* (2011): 45-51.
17. García G, García E, Martínez M, Scior T, Salvador J, del Rio R. Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test, *Brazilian Journal of Pharmacognosy* (2011), 21(5): 928-935.
18. García G, Martínez I, Bravo A, Scior T, Pardo J, Del Rio R. "Efecto analgésico del extracto de hoja de *Eupatorium glabratum* en la prueba de hot plate" XIX Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina celebrado en Cagliari, Italia del 6-10 de septiembre del 2010.
19. García G, Martínez M, Scior T, Salvador J, del Rio R. "Evaluación del efecto analgésico del extracto de *Eupatorium glabratum* en dos modelos térmicos de dolor agudo" (Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. BUAP), 2011.
20. Granier S, Manglik A, Kruse A, Kobilka T, Thian F, Weis W, Kobilka B. "Structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to naltrindole". *Nature* 485 (2012): 400-404.
21. Ibrahim F, Bauer M, Vogel S, Andreeva S, Boeckler F. "Application of DEKOIS

- 2.0 (demanding evaluation kits for objective in silico screening) for benchmarking”, Laboratory for Molecular Design and Pharmaceutical Biophysics, Institute of Pharmacy Sciences, Eberhard Karls University of Tübingen, Germany. (POSTER).
22. Kiefer J, Pawlitz J, Moreland K, Stegeman R, Hood W, Gierse J, Stevens A, Goodwin D, Rowlinson S, Marnett L, Stallings W, Kurumbail R. “Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction”, *Nature* 2000: 97-101.
  23. Kumar V, Abbas A, Aster J. “Robbins Basic Pathology” 9 edition, Ed. Elsevier Saunders, 2013, pag. 29-58, ISBN 978-0-8089-2432-6.
  24. Kushner P, Agard D, Greene G, Scanlan T, Shiau A, Uht R, Webb P. “Estrogen Receptor pathways to AP-1”, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* (2000): 311-317.
  25. Maggi A. “Estrogen and inflammation: hormone generous action spreads to the brain”, *Molecular Psychiatry* (2002) 7, 236–238.
  26. Manglik A, Kruse A, Kobilka T, Thian F, Mathiesen J, Sunahara R, Pardo L, Weis W, Kobilka B, Granier S. “Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist”, *Nature*, 485 (2012): 321-327.
  27. Noriega M, Langley E. “Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario”, *Cancerología* 3 (2008): 29-40.
  28. Norman B, Richardson T, Dodge J, Pfeifer L, Durst G, Wang Y, Durbin J, Krishnan V, Dinn S, Liu S, Reilly J, Ryter K. “Benzopyrans as selective estrogen receptor  $\beta$  agonists (SERBAs). Part 4: Functionalization of the benzopyran A-ring”, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* (2007): 18, 5082-5085.
  29. Pardee K, Nacakov A, Krause H. “Nuclear Receptors: Small Molecule Sensors that Coordinate Growth”, *Metabolism and Reproduction, A Handbook of Transcription Factors* (2011): vol. 52, 123-153, ISBN 978-90-481-9069-0
  30. Pasternak G, Pan Ying-Xian. “Mu Opioids and Their Receptors: Evolution of a Concept”, *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2013): vol. 65, 1257-1317. <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/65/4/1257.short?rss=1>.

31. Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato A, Milic N, Borrelli F. "Novel Insights into the Pharmacology of Flavonoids", *Phytotherapy Research* (2013) 27: 1588–1596
32. Salido M, Abasolo L, Bañares A. "Revisión de los antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2", *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* (2001), vol. 25: 46-52.
33. Sánchez G, Scior T, "Elaboración de un catálogo de monografías de plantas medicinales", (Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias Químicas BUAP), 2003.
34. Scior T, Lozano-Aponte J. CAMD y CADD "Simulaciones moleculares computacionales". *Informacéutico* (2009): 47 – 50.
35. Smith W, Murphy R. "The eicosanoids, cyclooxygenase, lipooxygenase and epoxygenase pathways", *Biochemistry of lipids, Lipoproteins and Membranes* (4ed) (2002).
36. Trott O, Olson A. "Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking scoring function, efficient optimization and multithreading". *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010): 455-461.
37. Vane J, Bakhle Y, Botting R. "cyclooxygenases 1 and 2", *Revision Pharmacology and Toxicology* (1998): 38, 97-120.
38. Vázquez J. *Eupatorium mairitianum*, IREKANI, Instituto de Biología UNAM (2010), <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/10888?proyecto=Irekani>.
39. Vitale P, Tacconelli S, Perrone M, Malerba P, Simone L, Scilimati A, Lavecchia A, Dovizio M, Marcantoni E, Bruno A, Patrignani P. "Synthesis, Pharmacological Characterization, and Docking Analysis of a Novel Family of Diarylisoxazoles as Highly Selective Cyclooxygenase-1 (COX-1) Inhibitors", *Journal of Medical Chemistry* (2013), 56, 4277–4299
40. Wang J. The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2-inhibitors Part 2: the clinical candidate having a shorter a favorable human half-life, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2010): 7159-7163.
41. Wang L, Limburg D, Graneto M, Springer J, Bruce J, Liao S, Pawlitz J, Kurumbail R, Maziasz T, Talley J, Kiefer J, Carter J. "The novel benzopyran

class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors Part 2: the second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2010): 7159-7163.

42. Xu S, Hermanson D, Banerjee S, Ghebreselasie K, Clayton G, Garavito R, Marnett L. “Crystal Structure of Murine Cyclooxygenase-2 Complex with Meloxicam”, *The Journal of Biological Chemistry* (2014) 289, 6799-6808
43. Xu S, Hermanson D, Banerjee S, Ghebreselasie K, Clayton G, Garavito R, Marnett L. “Oxicams Bind in a Novel Mode to the Cyclooxygenase Active Site via a Two water-mediated H-bonding Network”, *The Journal of Biological chemistry* (2014), 268, 6799-6808.
44. Xu S, Hermanson D, Banerjee S, Ghebreselasie K, Clayton G, Garavito R, Marnett L. “Crystal Structure of Ovine Cyclooxygenase-1 Complex with Meloxicam”, *The Journal of Biological Chemistry* (2014) 289, 6799-6808.