



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**“Diseño *in silico* de inhibidores aminoésteres
esteroidales con acción dual en M3 y PDE4 contra
la enfermedad pulmonar obstructiva crónica”**

Tesis para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

Oswaldo Uriel Escobar Cuatetl

Director de tesis:

D.C. Jesús Sandoval Ramírez

Codirector de tesis:

D.C. Alan Carrasco Carballo

Asesor Técnico:

L.B.T Jesús Alberto Rojas Morales



Marzo 2022





El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de elucidación y síntesis en química orgánica LESQO-BUAP en el área de enfermedades respiratorias bajo la dirección del DC Jesus Sandoval Ramírez y el cDC Alan Carrasco Carballo.

El presente trabajo se presentó en los siguientes programas y congresos.

LatinXChem 2021 congreso virtual realizado por LatinXChem, con el cartel #BIO063 titulado “DISEÑO IN SILICO DE INHIBIDORES DE M3 PARA LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)” bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez, cDC. Alan Carrasco Carballo y Dr. Limón Pérez

Verano DELFIN 2021 XXVI con el trabajo titulado "EVALUACIÓN IN SILICO DE DERIVADOS DE DIOSGENINA Y LAXOGENINA COMO INHIBIDORES DEL RECEPTOR M3 PARA EPOC", asesorado por el Dr. Jesús Sandoval Ramírez, investigador de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

DEDICATORIA

A mis padres

María del Rosario Cuatetl Flores

Ramon Escobar Toxqui

Por ser los pilares de mi vida, por todo su sacrificio, esfuerzo y su apoyo a lo largo de mi vida, que por ellos es posible la realización del presente trabajo.

A mi abuela Esperanza, tías, tíos, primas y sobrinos,

Por su apoyo incondicional, su aliento en cada momento que lo necesité a lo largo de la licenciatura y mi vida.

Agradecimientos

Al Dr. Jesús Sandoval Ramírez por permitirme realizar la investigación bajo su tutoría incluso en aquellos programas de investigación de verano, donde aprendí bastante y que sin su apoyo no sería posible la realización de la presente tesis.

Al cDr. Alan Carrasco Carballo por toda su guía desde que fue mi profesor en la licenciatura, por la gran oportunidad que me brindó al invitarme a su laboratorio, así como con el presente trabajo al ayudarme con diversas dudas que surgieron en el proceso, le agradeceré siempre su paciencia y tiempo invertido en mí.

A los integrantes del laboratorio LESQO, por enseñarme muchas cosas en los seminarios realizados, los cursos que cursé, sus consejos y correcciones en los trabajos.

A mis revisores Dr. Gustavo López y la Dra. María Laura por sus aportaciones para mejorar mi tesis.

A mis profesores de licenciatura, que me dieron los conocimientos necesarios que fueron fundamentales para la realización de esta tesis, así como mi desarrollo como investigador.

A mis padres Rosario y Ramón por todo su amor y sacrificio durante mi vida académica, con su apoyo en días extenuantes, con su escucha y guía en diversos momentos de mi vida, sin duda alguna han sido los mejores padres que pudiera haber deseado.

A mis tías Cristina, Gloria, Lourdes y Elena, por ser siempre unas segundas madres a lo largo de mi vida, donde nunca faltó el amor y el aliento para realizar mis metas.

A mi abuelita Esperanza, por todo el amor desde que nací, donde aquellas tazas de atole volviendo del kínder hasta volviendo de la universidad significaron una gran motivación para seguir por este camino, esas comidas calientes que siempre hubo en la mesa, sin ti todo hubiera sido más difícil.

A mis primas Fernanda y Fany, mi hermana Andrea, mis sobrinos Rodrigo, Arizbeth y Sophia, su compañía, sonrisas sacadas, carcajadas compartidas y aquellos momentos de apartarme de los deberes cuando los necesité.

A Jesús Eduardo, Elizabeth y Miguel, por el apoyo con tareas, temas que no entendía, risas, anécdotas vividas durante la universidad y las que faltan por vivir.

A Angie, Brenda, Daniel y Ramsés, por tantos años de amistad, así como su apoyo en toda mi vida académica y personal, así como durante la realización de la tesis al ayudarme con dudas en detalles y momentos de distracción cuando los necesité.

A todas mis demás amistades que he forjado a lo largo de mi vida, las que se quedaron en el camino por cualquier motivo, pero que su presencia ha significado un gran aporte para convertirme en la persona que soy actualmente.

Índice

Índice	6
Símbolos y abreviaturas	8
Índice de figuras	9
Índice de tablas	11
RESUMEN	12
ANTECEDENTES	14
1. EPOC	14
1.1 Epidemiología y Origen	14
1.2 Diagnóstico y Tratamiento	16
2. Receptores Muscarínicos	21
3. Proteína PDE4	23
4. Bioinformática en farmacología	27
5. Esteroides	30
OBJETIVOS	34
Objetivo general	34
Objetivos particulares	34
METODOLOGIA.....	35
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	37
1. Análisis energético estadístico	38
1.1. Análisis estadístico del efecto sobre M3	41
1.1.1. Análisis del grupo ester.....	42
1.1.2. Análisis del efecto del esteroide basal	43
1.1.3. Análisis del efecto del grupo protector ftalamidato	44
1.2. Análisis del efecto sobre PDE4A	46
1.2.1. Análisis del grupo ester.....	47
1.2.2. Análisis de esteroide basal	48
1.2.3. Análisis de grupo protector.....	50
1.3. Análisis de selectividad entre proteínas	51
1.4. Selección de candidatos energéticos.	53

2. Análisis Interaccional	55
2.1. Sobre M3	55
2.2. Sobre PDE4A	62
3. Análisis ADME y toxicológico	70
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79

Símbolos y abreviaturas

EPOC: Enfermedad Obstructiva Crónica

ACh: Acetilcolina

PDE4: Fosfodiesterasa 4

ADMET: Absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicología

FVC: Capacidad Vital Forzada

FVE1: Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo

PDB: Protein Data Bank

EA: Energía de acoplamiento

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

ATRP: Atropina

BIPR: Bromuro de ipratropio

BTIR: Bromuro de tiotropio

RFLT: Roflumilast

CLMT: Cilomilast

PM: Peso molecular

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de bronquitis y enfisema [8].....	14
Figura 2. Principales causas de mortalidad a nivel mundial.....	15
Figura 3. Principales causas de muerte en el país.....	15
Figura 4. Metodología de diagnóstico EPOC [1,2]	16
Figura 5. Diagrama de tratamientos para EPOC	17
Figura 6. Acción de fármacos antagonistas muscarínicos [29]	18
Figura 7. Esquema de acción de fármacos agonistas β -adrenérgicos y metilxantinas [29] .	18
Figura 8. Acción de los corticoesteroides en la inflamación pulmonar.....	19
Figura 9. Estructura de fármacos empleados para EPOC.....	20
Figura 10. Terapia no farmacológica.....	20
Figura 11. Mecanismo de acción de acetilcolina en los receptores muscarínicos.....	21
Figura 12. Mecanismo de activación de los subtipos de receptores muscarínicos [66]	22
Figura 13. Esquema de unión y activación de Adenilato Ciclasa y Guanilato ciclasa [83] .	25
Figura 14. Protein Data Bank, base de datos de acceso libre [97]	27
Figura 15. Diagrama de proceso de investigación usando docking molecular	28
Figura 16. Ejemplo de visualización de resultados de docking en Discovery Studio [111]	29
Figura 17. Pantalla de uso de SwissADME [114].....	29
Figura 18. (Izquierda) Marker con Dioscorea mexicana. (Superior derecha) Dioscorea composita. (Inferior derecha) Dioscorea mexicana.....	30
Figura 19. Izquierda, Mural de Alfaro Siqueiros "El tesoro de la selva" donde se resalta el barbasco y su valor entre los recolectores. Derecha, Recolector de barbasco.....	31
Figura 20. Estructura de diosgenina (izquierda) y laxogenina (derecha).....	32
Figura 21. Mecanismos de acción de corticoesteroides en el asma [29].....	32
Figura 22. Dexametasona contra Covid-19	33
Figura 23. Diagrama de la metodología empleada.....	35
Figura 24. Esquema del procedimiento llevado a cabo	37
Figura 25. Fármacos utilizados para EPOC en M3 y PDE4, a: atropina (ATRP), b: ipratropio, c: tiotropio, d: roflumilast, e: cilomilast.	38
Figura 26. Energías de acoplamiento para M3 (izquierda) y PDE4 (derecha).....	39
Figura 27. Resumen de análisis estadístico para prueba de normalidad tanto de M3 como PDE4A.....	40
Figura 28. Gráfica de efectos principales en la EA de la molécula con M3 con respecto al esteroide, aminoácido o presencia del grupo protector.	41
Figura 29. Gráfico de intervalos de M3 con respecto al aminoácido presente en la molécula	42
Figura 30. Gráfico de intervalos con respecto al esteroide presente en la molécula.....	43
Figura 31. Gráfico de intervalos de M3 con respecto a la presencia del grupo protector	44
Figura 32. Gráfico de intervalo de diferencia de medias para M3 de 95% con método de Fisher	45

Figura 33. Gráfica de efectos principales en la EA de la molécula con PDE4A con respecto al esteroide, aminoácido o presencia del grupo protector	46
Figura 34. Gráfica de intervalos con respecto al aminoácido en la molécula	47
Figura 35. Gráfica de intervalos con respecto al esteroide basal de la molécula	48
Figura 36. Gráfica de intervalo con respecto al esteroide basal de la molécula.....	49
Figura 37. Gráfica de intervalos con respecto al grupo protector	50
Figura 38. Gráfico de intervalo con respecto a grupo protector método de Fisher	51
Figura 39. Gráfica de intervalos con respecto a las dianas farmacológicas	51
Figura 40. Gráfico de intervalo con respecto a la diana farmacológica mediante método de Fisher	52
Figura 41. Gráficas de EA de compuestos con el grupo protector, fármacos y ligandos naturales.....	53
Figura 42. Primeros candidatos a) AD02, b) AD04, c) AD06, d) AD08, e) AD10, f) AD12, g) AL2, h) AL04, i) AL06, j) AL08, k) AL10, l) AL12.....	54
Figura 43. Diagramas de interacción ligando endógeno y fármacos con M3	56
Figura 44. Diagramas de interacciones de derivados de diosgenina con el receptor M3.....	57
Figura 45. Diagramas de interacciones de derivados de laxogenina con el receptor M3.....	59
Figura 46. Diagramas de interacciones ligando endógeno y fármacos con PDE4A.....	63
Figura 47. Diagrama de interacción de derivados de diosgenina con el receptor PDE4A...	64
Figura 48. Diagramas de interacciones de derivados de laxogenina con PDE4A.....	66
Figura 49. Diagramas propiedades fisicoquímicas por SwissADME.	71
Figura 50. Diagrama BOILED-Egg de ligandos endógenos, fármacos y moléculas candidatos a fármaco	73

Índice de tablas

Tabla 1. Receptores muscarínicos, localización y función [74,75]	23
Tabla 2. Familia de isoenzimas de PDE y su localización [77–81]	24
Tabla 3. Consecuencias de la inhibición de PDE4 [91,93,94]	26
Tabla 4. Análisis de varianza con respecto al aminoácido presente en la molécula	42
Tabla 5. Agrupación del efecto del éster sobre la EA en M3, $p < 0.05$	43
Tabla 6. Análisis de varianza con respecto al esteroide	44
Tabla 7. Agrupación del efecto del esteroide sobre la EA en M3, $p < 0.05$	44
Tabla 8. Análisis de varianza con respecto al grupo protector	45
Tabla 9. Agrupación del efecto del grupo protector en la EA, $p < 0.05$	45
Tabla 10. Análisis de varianza con respecto al aminoácido presente en la molécula	47
Tabla 11. Agrupación del efecto del éster sobre la EA en PDE4A, $p < 0.05$	48
Tabla 12. Análisis de varianza respecto con el esteroide basal	49
Tabla 13. Agrupación del efecto del esteroide sobre la EA en PDE4, $p < 0.05$	49
Tabla 14. Análisis de varianza con respecto al grupo protector	50
Tabla 15. Agrupación del efecto del grupo protector en la EA en PDE4A, $p < 0.05$	51
Tabla 16. Análisis de varianza con respecto a ambas dianas farmacológicas	52
Tabla 17. Interacción de los residuos aminoacídicos del receptor M3 con ligando endógeno, fármacos y moléculas propuestas	59
Tabla 18. Interacciones de los residuos aminoacídicos del receptor PDE4A con ligando endógeno, fármacos y moléculas propuestas.....	66
Tabla 19. Resultados SwissADME de ligandos endógenos, fármacos y moléculas candidatos a fármaco	72
Tabla 20. Probabilidad de efectos adversos de las moléculas candidatas	74

RESUMEN

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) ocupa el 3° lugar en incidencia de muerte en el mundo y 10° en el país, es una enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por la reducción del flujo de aire provocada principalmente tanto por enfisema pulmonar como por bronquitis crónica; su principal causa es el consumo de productos de tabaco y en menor medida factores ambientales. Los tratamientos están enfocados en el aminoramiento de síntomas y el detenimiento de la progresión de la enfermedad, debido a esto los tratamientos farmacológicos empleados cumplen la función de broncodilatadores o antiinflamatorios que mejoran el flujo de aire, desafortunadamente no existen moléculas con actividad dual por esta razón se estudió 26 moléculas aminoésteres esteroidales derivadas de diosgenina y laxogenina para evaluar su capacidad dual para funcionar tanto como broncodilatador y como antiinflamatorio, usando como dianas farmacológicas el receptor muscarínico M3 (acción broncodilatadora) y PDE4 (acción antiinflamatoria). De esta forma se realizó un estudio de acoplamiento molecular para la obtención de la energía de acoplamiento que fungirá de parámetro para saber que tan afines son las moléculas con la diana farmacológica, de igual forma se evaluó el ligando natural de cada diana además de fármacos usados contra esta enfermedad con acción en la diana de elección, estos últimos debido a que servirán como control para el estudio. Posteriormente se llevó a cabo un análisis estadístico mediante la aplicación de la prueba ANOVA para encontrar diferencias significativas en la energía de acoplamiento de las moléculas dependiendo del tipo de esteroide, grupo protector y ramificación del éster. Por consiguiente, se halló que la presencia del grupo protector en las moléculas es significativa en la energía de acoplamiento, por lo tanto, se elucidó el porqué mediante un análisis interaccional comparándolo con las interacciones que poseen los ligandos naturales en el sitio de acoplamiento de la diana, en donde se encontró que el grupo protector realiza varias interacciones con el sitio activo explicándose de esta forma la diferencia encontrada. Asimismo, el análisis proporcionó información sobre que moléculas tenían interacciones significativas con el sitio activo que en consecuencia facilitó la discriminación de las mejores moléculas que resultaron ser: AD06, AD12, AL06, AL08 y AL12. Finalmente se realizó un estudio ADMET de las moléculas previamente mencionadas para evaluar sus cualidades como posibles fármacos, encontrándose que éstas poseen cualidades óptimas para fungir como fármaco para la EPOC.

ABSTRACT

Pulmonary chronic disease (COPD) ranks 3rd in deaths worldwide and 10th in our country, this is a disease chronic and degenerative that is characterized by reduced airflow due to pulmonary emphysema and chronic bronchitis; the main cause is tobacco consumption and less frequently due to environmental factors. Current treatments focus on reducing symptoms and stopping the development of the disease, so pharmacological treatment fulfills the function of bronchodilator or anti-inflammatory to improve airflow, but unfortunately, at this time, there is no molecule with this dual activity, for this reason, it studied 26 amino ester steroid molecules derived from diosgenin and laxogenin to verify their dual ability to work as a bronchodilator and anti-inflammatory, using the M3 muscarinic receptor (bronchodilator action) and PDE4 (anti-inflammatory action) as pharmacological targets.

Thus, a molecular coupling study was carried out to obtain the binding energy that will act as a parameter to determine the affinity of the molecules for the pharmacological target, in the same way, the endogenous ligand of each target and the actual drugs for COPD disease were evaluated as a control for the study. Subsequently, a statistical test was performed, in this case, ANOVA, looking for significant differences in the binding energy of the molecules depending on the type of steroid, protective group, and branching in the ester.

Therefore, it was found the protective group in the molecules was significant in the binding energy, so the next thing to do was found the reason for this by analyzing the interactions of the molecules with the binding site compared with the endogenous ligands of each pharmacological target. This analysis was found the importance of the protective group because this has many interactions in the binding site of both pharmacological targets. Besides, the analysis brings information on the most significant interaction at the binding site and this works as a filter for the best molecules, which are: AD06, AD12, AL06, AL08, and AL12. Finally, the previous molecules were assessed by an ADMET study to obtain their qualities as a possible drug and found positive characteristics of the molecules for behaving like drugs for the COPD disease.

ANTECEDENTES

1. EPOC

La salud Humana y la alimentación son los pilares de la sociedad tal como la conocemos el día de hoy, sin embargo, las enfermedades que afligen a la población es un problema que siempre ha tenido relevancia para los científicos, de esta manera se investigan nuevos fármacos y diagnósticos buscando el bienestar de la sociedad. Una de estas enfermedades que afectan a la sociedad actual es la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica también conocida solo por sus siglas (EPOC) que es una enfermedad crónico-degenerativa, prevenible, tratable, caracterizada por persistentes síntomas respiratorios y limitación del flujo de aéreo. [1–4]. Esta última puede ser debido a una mezcla de enfermedades de las vías aéreas pequeñas [5] como bronquitis crónica caracterizada por la inflamación de tráquea, bronquios y bronquiolos así como aumento de las secreciones dificultando la inhalación y exhalación [6,7] y/o enfisema pulmonar que es el aumento de tamaño, y permanente, de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales asociado a destrucción de la parénquima ocasionando como primer síntoma una disnea progresiva [7,8], tal como se puede apreciar en la Figura 1. Diagrama de bronquitis y enfisema Figura 1. La contribución de una u otra depende de la persona, de igual forma la progresión y otros síntomas.

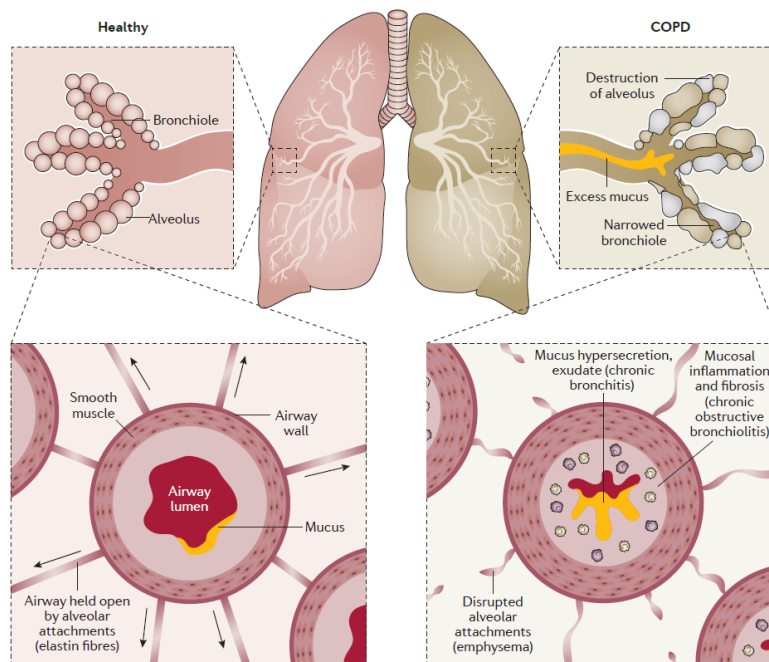


Figura 1. Diagrama de bronquitis y enfisema [8]

1.1 Epidemiología y Origen

La importancia social de esta enfermedad radica también en sus estadísticas de mortalidad (Figura 2), en la última actualización resulto como la tercera causa de muerte en el mundo acorde a los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [9].

Principales causas de muerte en el mundo (2019)

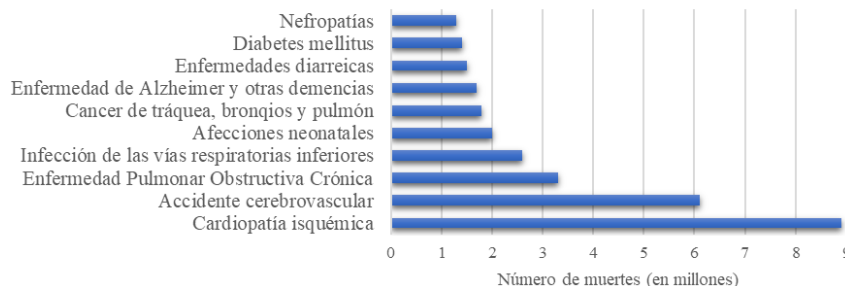


Figura 2. Principales causas de mortalidad a nivel mundial.

En el contexto nacional de igual forma ocupa lugares significativos, siendo la 10° causa de muerte en el país según datos del INEGI del año 2020 [10], donde resalta que en mujeres ocupó el 7° y en hombres la 10° causa de muerte (Figura 3).

10 causa de muerte por género México 2020

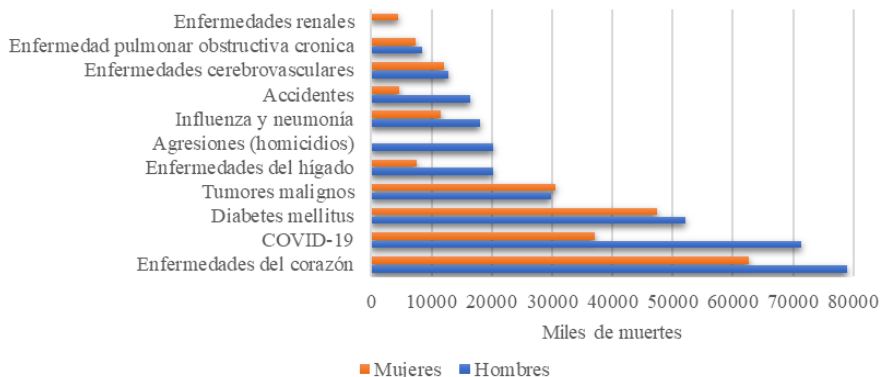


Figura 3. Principales causas de muerte en el país

El EPOC es originada por una exposición significativa a partículas o gases nocivos, siendo la principal causa la exposición al humo del tabaco (fumadores activos y pasivos) [11], donde se debe hacer mención a nuevos método de consumo como el cigarro electrónico [12], pero también es provocada por factores ambientales tales como:

- Quema de biomasa: se define biomasa a la materia orgánica no fosilizada, ya sea originada en un proceso biológico espontáneo o provocado, [13] como el uso de combustibles sólidos que originan humo en interiores de la casa [3,14,15].
- Inhalación de polvos o gases: En este factor se encuentra desde la polución del aire en el medio ambiente [16], así como la exposición crónica debido al tipo de puesto de trabajo [17]. Además, cabe señalar también su relevancia en la provocación de exacerbaciones [18,19].

Las influencias por factores individuales tales como un desarrollo anormal pulmonar desde etapa gestacional, factores maternos durante la gestación tales como que sea fumadora, mal nutrición [20]; enfermedades pulmonares durante la niñez [21,22], nutricional [23], estrés oxidativo [24]. También se debe tener en cuenta los factores genéticos que predisponen a desarrollar la enfermedad como la deficiencia de α -1 antitripsina, que es un trastorno hereditario común causado por mutaciones en el gen SERPINA1 que provoca una producción de esta mal plegada o sin producción, la función de esta es inhibir la elastasa de neutrófilos, que es una de varias enzimas proteolíticas liberadas mediante la activación de neutrófilos durante la inflamación, por lo tanto si existe una ausencia o deficiencia de α -1 antitripsina, resulta en una progresiva e irreversible destrucción del tejido del pulmón y finalmente el desarrollo de EPOC con un inicio temprano de enfisema [25].

1.2 Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico de EPOC que presenta síntomas respiratorios como disnea, tos crónica, expectoración y/o tenga historial de estar expuesto a los factores de riesgo de causa de la enfermedad [1,2]. El diagnóstico se confirma mediante espirometría [26]. Para EPOC se recomienda la maniobra de espirometría forzada, la presencia de obstrucción al flujo de aire se establece evaluando la relación FEV1/FVC después del broncodilatador comparándola contra el límite inferior de la normalidad (LIN) [27]. Posteriormente se establece la severidad de la enfermedad conforme a la guía GOLD [1]. La metodología que se utiliza se resume en la

Figura 4.

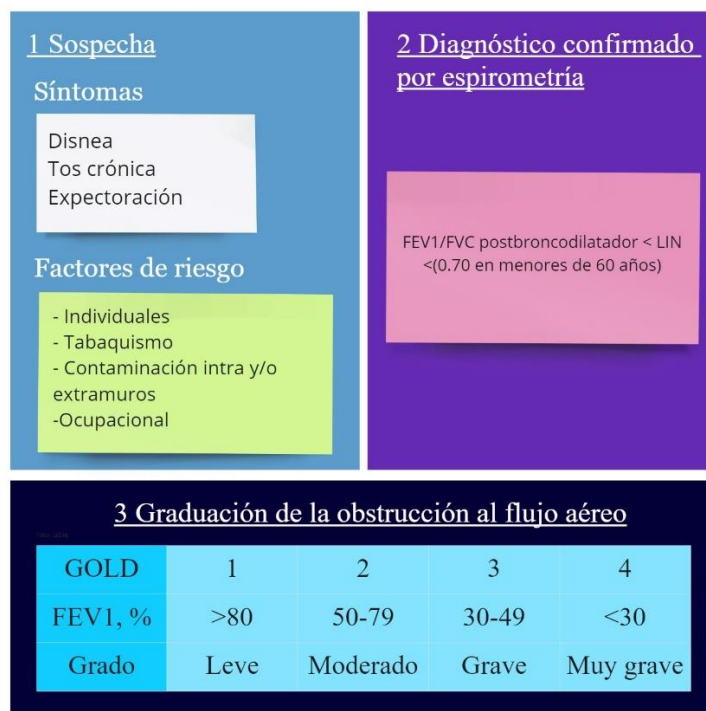


Figura 4. Metodología de diagnóstico EPOC [1,2]

Los tratamientos se pueden dividir en dos, farmacológicos y no farmacológicos (Figura 5), pero el objetivo de ambos es el mismo, disminuir el riesgo de exacerbaciones, mejorar el flujo de aire, detener la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida. Con respecto al farmacológico (Figura 9) principalmente consisten en broncodilatadores, antiinflamatorios y terapias de remplazo de nicotina.



Figura 5. Diagrama de tratamientos para EPOC

Los broncodilatadores anticolinérgicos impiden los efectos de la acetilcolina provocando la broncodilatación (Figura 6), mediante el antagonismo de los receptores colinérgicos muscarínicos tanto a nivel de las uniones neuroafectoras del sistema nervioso parasimpático como en los ganglios autónomos, la medula suprarrenal, el sistema nervioso central, las glándulas sudoríparas y prácticamente la totalidad de los lechos vasculares. Los órganos inervados por el sistema nervioso autónomo difieren en su sensibilidad a los antagonistas muscarínicos, así la potencias de estos para modificar dichos órganos es, en orden decreciente: glándulas salivales, bronquiales y sudoríparas, sistema de excitación-conducción del corazón, musculatura intrínseca del ojo, glándulas de secreción gástrica y ganglios vegetativos [28]. En la Guía de Práctica Clínica Mexicana, así como en la guía GOLD, dividen a estos fármacos en dos clases: antimuscarínicos de corta acción como lo es ipratropio y oxitropio, y anticolinérgicos de acción prolongada como tiotropio, aclidinio, glicopirronio y umeclidinio [1,2].

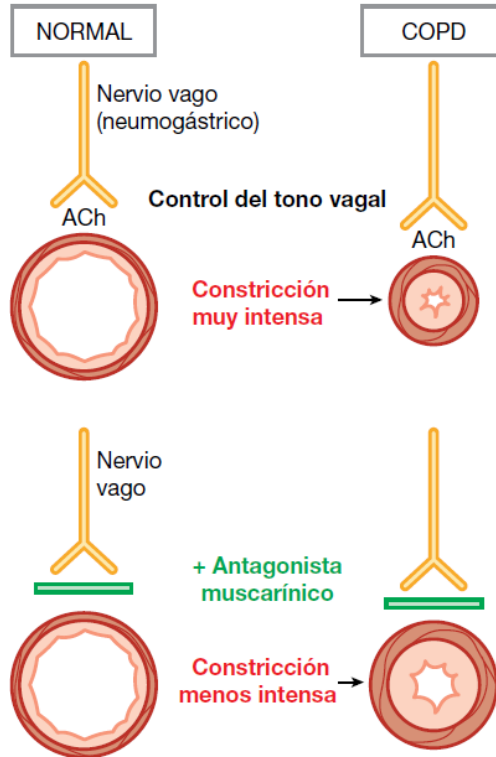


Figura 6. Acción de fármacos antagonistas muscarínicos [29]

Por otro lado, los inhibidores β_2 -adrenérgicos relajan el músculo liso de las vías aéreas mediante la estimulación de los receptores β_2 adrenérgicos, que incrementa el AMP cíclico y produce un antagonismo funcional a la broncoconstricción (Figura 7). En la Guía GOLD, así como Guía Práctica Clínica Mexicana, dividen a estos fármacos en dos clases, aquellos con una acción corta como salbutamol y los de acción prolongada formoterol, indacaterol y olodaterol. [1,2]

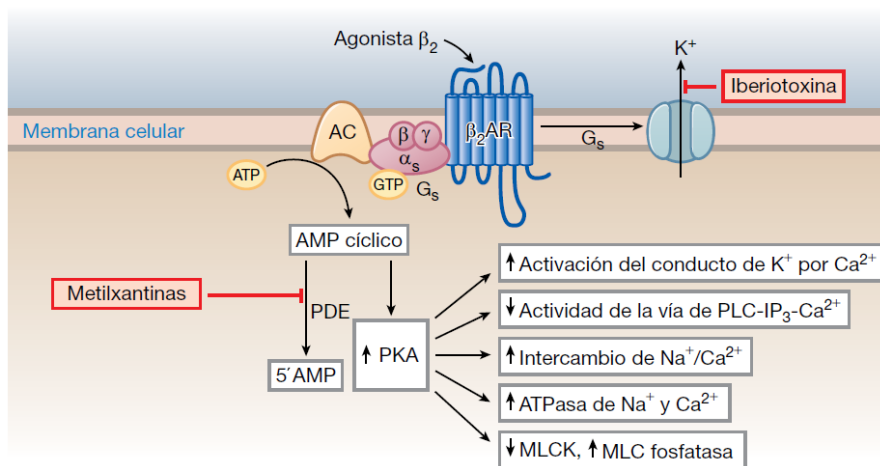


Figura 7. Esquema de acción de fármacos agonistas β -adrenérgicos y metilxantinas [29]

Del mismo modo se incluyen los fármacos que corresponde al grupo de corticoesteroides, se emplean como antiinflamatorio (Figura 8) ya que durante las exacerbaciones aumenta la inflamación local existente en la vía aérea [30], además el tratamiento es combinado con un broncodilatador para mejorar la función pulmonar, aceleración de la desaparición de síntomas, disminuye estancia hospitalaria y reduce el porcentaje de fracasos terapéuticos [1,2], pero cabe señalar que su uso prolongado puede resultar en efectos secundarios tales como inflamación de vías áreas altas, hipertensión intraocular, glaucoma, pérdida de masa ósea y las fracturas, supresión suprarrenal y neumonía. [31,32].

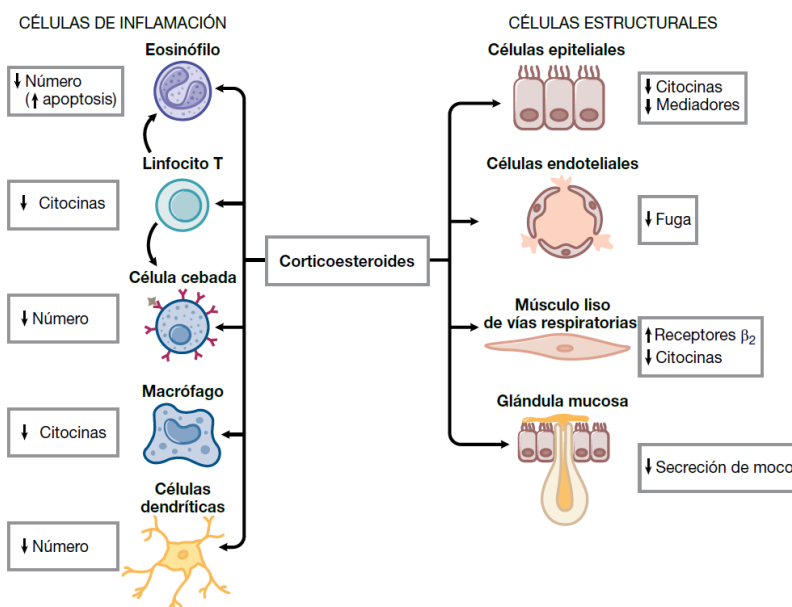


Figura 8. Acción de los corticoesteroides en la inflamación pulmonar

Por otro lado, las metilxantinas son fármacos inhibidores no selectivos de la fosfodiesterasa (Figura 7) que actúa como broncodilatador y un estimulador del sistema respiratorio [33], principalmente se utiliza la teofilina que puede tener efectos a favor en el tratamiento de EPOC además de poseer la ventaja que su vía de administración es oral [1,34,35]. Entre sus efectos secundarios se encuentra el insomnio, náuseas, dolores de cabeza, arritmias, acidez y convulsiones [36]. De manera análoga al anterior, pero más específicos a la fosfodiesterasa 4 (PDE4) los inhibidores de esta están dirigidos a reducir la inflamación presente por la EPOC, lográndolo mediante la inhibición que ocasiona que la enzima no realice la catálisis de cAMP, provocando un exceso del mismo, que a su vez, induce una respuesta antiinflamatoria de citocinas antiinflamatorias por producción de IL-6 e IL-10 [37–39].

El fármaco de esta clase recetado para los pacientes de EPOC es roflumilast [1,2], siendo de una toma diaria oral con muchas ventajas pero presentando algunos síntomas secundarios como diarrea, náuseas, pérdida de peso, dolor abdominal, problemas para dormir, entre otros. Cabe señalar que se receta junto a un broncodilatador para pacientes con exacerbaciones moderadas a severas [40].

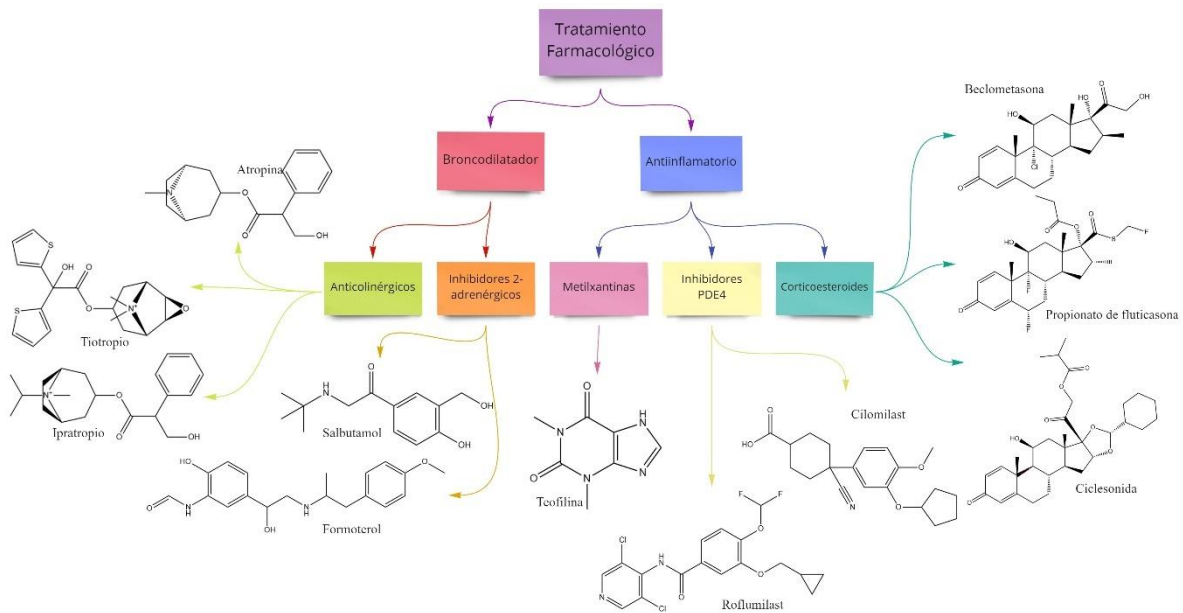


Figura 9. Estructura de fármacos empleados para EPOC

Al ser el tabaquismo causa principal de la EPOC, se sostiene como tratamiento el cese del consumo del cigarro con el uso de fármacos que es nicotina en bajas dosis [41]. El objetivo de esta terapia es reemplazar paulatinamente la introducción de la nicotina por medio del cigarro, usando otras presentaciones de este compuesto que van desde parches transdérmicos, chicles, pastillas, inhalador y aerosol nasal [42,43]. Cabe destacar que no se recomienda el uso de vaporizadores, o también llamados cigarrillos electrónicos [12]. Es importante mencionar los tratamientos no farmacológicos (Figura 10), que usualmente van acompañados al farmacológico, para detener o retrasar el progreso de la EPOC, principalmente se les indica a los pacientes cesar el consumo de tabaco, terapias de rehabilitación pulmonar, así como en casos donde existe una progresión mayor, oxígeno complementario y cirugía.



Figura 10. Terapia no farmacológica

Como se ha mencionado, el consumo del tabaco es una de las principales causas de la EPOC, además continuar fumando provocará daños permitiendo que la enfermedad progrese más rápido que aquellos que cesan su consumo [44,45]. Además del tratamiento farmacológico, se debe acompañar de ayuda psicológica para que las personas logren superar su adicción [46], ya que es común que no se logre en un primer intento e incluso llegando a mentir durante las consultas sobre su consumo [47]. Con el objetivo de reducir la dificultad para respirar y mejorar la tolerancia al ejercicio, que a su vez reduce la fatiga, ansiedad, depresión y aumenta la calidad de vida se recomienda la rehabilitación pulmonar [1,48–51].

En contraste, los tratamientos quirúrgicos son aquellos procedimientos que involucran la entrada al quirófano para la remoción de tejido pulmonar dañado y también el trasplante. Entre los procedimientos esta la cirugía de reducción de volumen pulmonar que mejora la mecánica del diafragma y de la pared torácica provocando una mejoría en el paciente; y la bullectomía, que es la remoción de bullas gigante de enfisema que ya no contribuyen al intercambio de oxígeno, esto disminuye la disnea, mejora el funcionamiento del pulmón y la tolerancia al ejercicio [1,52–54].

2. Receptores Muscarínicos

Estos receptores se han usado como dianas farmacológicas en muchas enfermedades, entre ellas la EPOC, actuando sobre el receptor M3 ya que está ampliamente distribuido en los pulmones y cuya función es la broncoconstricción al unirse con su ligando endógeno la acetilcolina (ACh) [55,56], proceso ilustrado en la Figura 11, por medio de segundos mensajeros. Los fármacos actúan inhibiendo antagónicamente esta unión, produciendo la broncodilatación al impedir que la acetilcolina se una con el receptor y desencadenando la cascada de segundos mensajeros. [57,58].

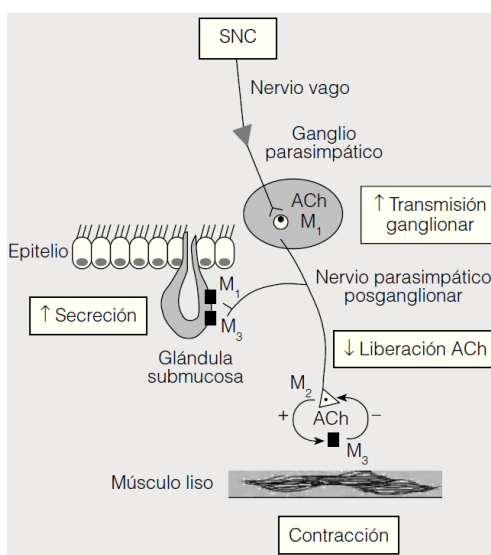


Figura 11. Mecanismo de acción de acetilcolina en los receptores muscarínicos

Son un grupo proteínas que funcionan de receptores ubicados en la membrana celular, siendo transmembranales, en algunos tipos de proteínas G [59–63], conformados por 5 subtipos denominados receptor muscarínico M1, M2, M3, M4 y M5 [64]. Todos tienen por ligando natural a la acetilcolina que provoca un control fisiológico mediante mecanismos hormonales y neuronales por medio de la activación por su unión con los diferentes subtipos de receptores, tal como se puede apreciar en la Figura 12. Cada subtipo varía en su locación en el organismo, así como su cantidad, siendo posible encontrarlas en el sistema nervioso central, sistema nervioso periférico, músculo liso, corazón, cerebro, endotelio, glándulas exocrinas [65].

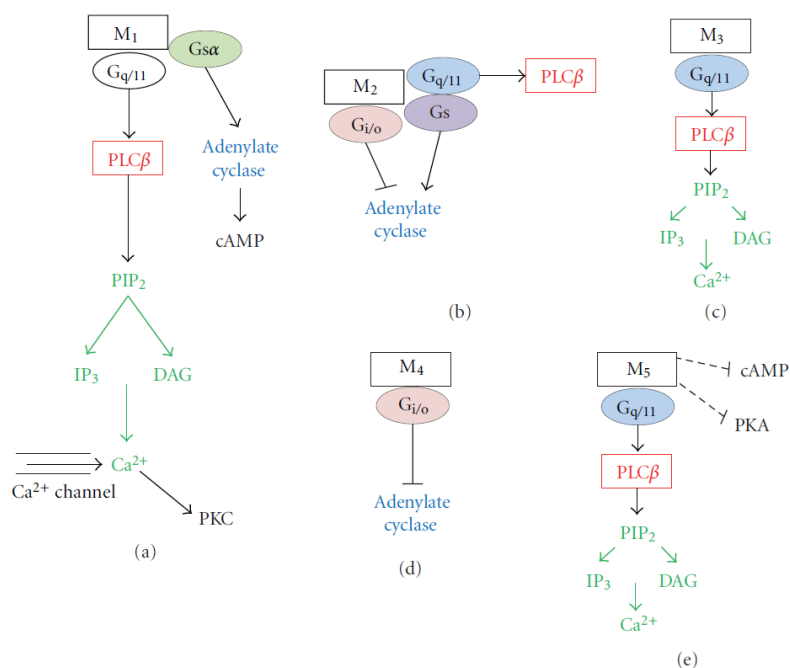


Figura 12. Mecanismo de activación de los subtipos de receptores muscarínicos [66]

Su nombre se origina debido a la molécula muscarina, proveniente de *Amanita muscaria*, que produce efectos similares a la acetilcolina, esta diferenciación entre los receptores nicotínicos y muscarínicos se acuñó por Henry Dale [55]. Como se mencionó anteriormente existen 5 subtipos de receptores muscarínicos acoplados a proteínas G, en la Tabla 1 podemos observar su localización y función, destacando el M3 debido a su función en la broncoconstricción al unirse con la acetilcolina, siendo una diana farmacológica utilizada en diversos fármacos tales como ipratropio, tiotropio, atropina entre otros [1,2,29,58,67], ya que al inhibir esta unión se crea el efecto contrario de su función natural siendo la broncodilatación, efecto deseado para los pacientes con EPOC al facilitarles el proceso de respirar. Incluso en investigaciones recientes se ha encontrado otro efecto de estos fármacos como antiinflamatorios [68–70]. Las investigaciones de estos receptores abarcan no solo para la EPOC, sino otras como cáncer, diabetes tipo 2, Alzheimer, esquizofrenia e incluso la adicción de drogas, entre otras [71–73].

Tabla 1. Receptores muscarínicos, localización y función [74,75]

Subtipo	Localización	Proteína G	Función
M1	Cerebro, glándulas, ganglios simpáticos, próstata, apéndice, colon, intestino delgado, musculo liso, riñón, pulmón, piel, estómago, linfocitos.	$G_{q/11}$	Aprendizaje, memoria, neurotransmisión, regulación del sistema nervioso autónomo y de la respuesta inmune.
M2	Corazón, rombencéfalo, músculo liso, nervios posganglionares, vesícula biliar, apéndice, colon, endometrio, esófago, hígado, pulmón, placenta, intestino delgado, vejiga, recto.	$G_{i/o}$	Neurotransmisión, autorreceptor (inhibe liberación de acetilcolina), regulación sensorial, inhibición cardiaca, control de la motilidad, tono muscular de vías aéreas y vejiga.
M3	Músculo liso, glándulas, cerebro, ojo, células epiteliales, células endoteliales, vejiga, estómago, bazo, intestino delgado, recto, próstata, páncreas, ovario, pulmones, riñón, corazón, vesícula biliar, esófago.	$G_{q/11}$	Broncoconstricción, contracción muscular, secreción glandular, control de la motilidad intestinal.
M4	Prosencéfalo, núcleo estriado, ganglios basales, duodeno, testículo, bazo.	$G_{i/o}$	Plasticidad sináptica, modulación circuitos neuronales, modulación función estriatal.
M5	Locus niger, placenta, testículo, esófago, linfocitos, glándulas salivales.	$G_{q/11}$	Modulación liberación dopamina, salivación, regulador del tono muscular liso y de la respuesta inmune.

3. Proteína PDE4

Las fosfodiesterasa-4 (PDE4) es una enzima que cataliza, mediante hidrólisis, la inactivación del nucleótido adenosín monofosfato cíclico (AMPC) a su forma 5'-AMP, controlando la concentración de este y a su vez la actividad que ejerce en las cascadas de señalización intracelular relacionados a la inflamación. Debido a esto se ha utilizado como diana

farmacológica para el EPOC para reducir la inflamación presente en pulmones al inhibir la inactivación del AMPc [76].

La PDE4 forma parte de una familia de 11 distintas fosfodiesterasas (PDE1-PDE11) que se clasifican de acuerdo con sus propiedades bioquímicas, estructura, respuesta a estímulos específicos y/o afinidad por nucleótidos cíclicos (Tabla 2. Familia de isoenzimas de PDE y su localización Tabla 2), la función de estas enzimas es catalizar la inactivación de los nucleótidos cíclicos adenosín monofosfato y/o guanósín monofosfato (AMPc y GMPc, respectivamente) [77]. Las PDE se localiza en diversos órganos, por mencionar algunos como el corazón, cerebro, bronquios, tracto intestinal, pulmón, corazón entre otros; de igual manera se encuentran en células entre ellas queratinocitos, neuronas, células endoteliales, linfocitos T y B, monocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos.

Tabla 2. Familia de isoenzimas de PDE y su localización [77–81]

Familia isoenzima	Ligando que cataliza	Distribución tisular
PDE1	AMPc, GMPc	Cerebro, músculo liso, corazón, testículos
PDE2	AMPc, GMPc	Corteza adrenal, cerebro, corazón, endotelio
PDE3	AMPc	Corazón, músculo liso, tejido adiposo, plaquetas, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, endotelio
PDE4	AMPc	Epitelio bronquial, músculo liso bronquial y vascular, endotelio, linfocitos T, monocitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, sistema reproductivo, piel, neuronas.
PDE5	GMPc	Músculo liso, plaquetas, fibroblasto de pulmón, cerebelo.
PDE6	GMPc	Retina
PDE7	AMPc	Músculo esquelético, células inmunitarias, cerebro
PDE8	AMPc	Células inmunitarias, hígado, riñón, testículos, tiroides
PDE9	GMPc	Cerebro, riñón
PDE10	AMPc, GMPc	Cerebro, testículos
PDE11	AMPc, GMPc	Cerebro, próstata, testículos, músculo esquelético

Los segundos mensajeros AMPc y GMPc son importantes reguladores de la transducción de señales intracelulares, particularmente de aquellas que activan la adenil y guanilato ciclasa (encargados de la conversión de ATP a AMPc y GTP a GMPc) así como el señalamiento intracelular de vías que regulan muchos procesos fisiológicos críticos [82,83] (Figura 13), incluyendo proliferación celular y la apoptosis, contracción del miocardio, relajación muscular vascular y del musculo liso de las vías áreas, reproducción, respuestas inmunes e inflamatorias, desarrollo del hueso, entre otras [84].

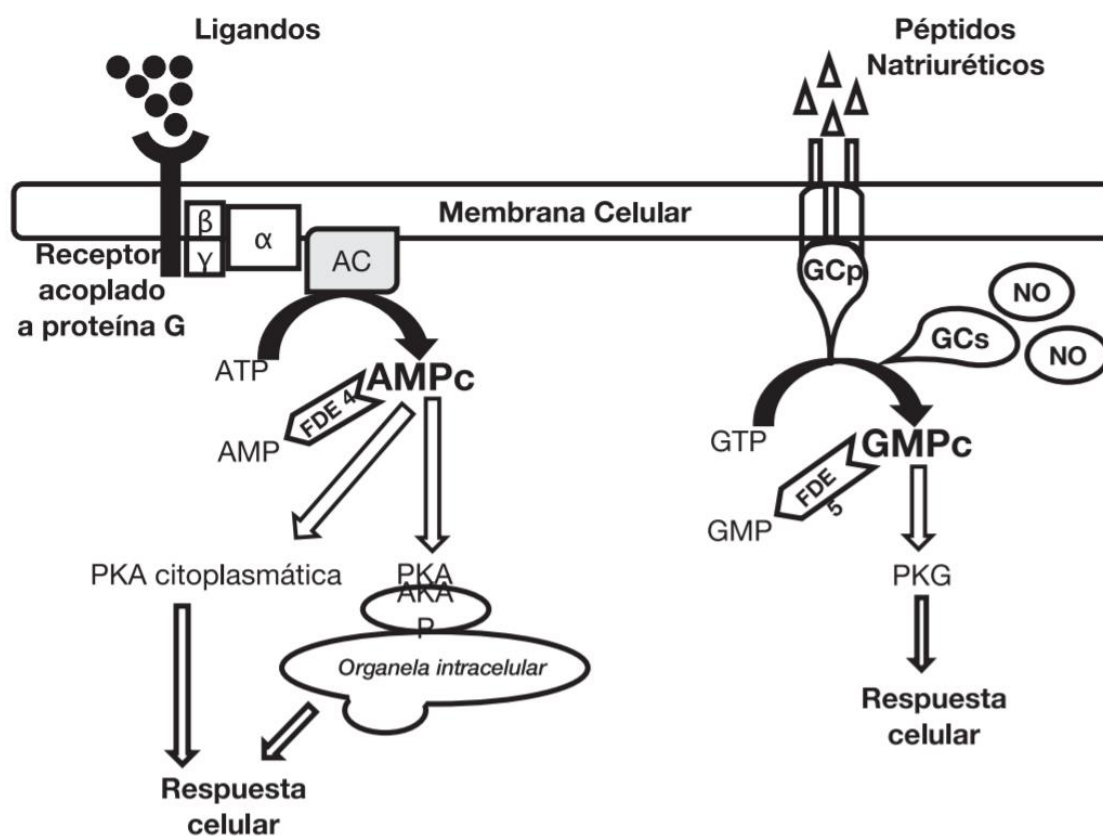


Figura 13. Esquema de unión y activación de Adenilato Ciclasa y Guanilato ciclasa [83]

En el caso de la PDE4 tiene 4 isoformas PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D [85], las cuales se pueden hallar en la mayoría de los leucocitos, pero las isoformas A y B tienen un papel relevante en la inflamación debido a que se expresan principalmente en linfocitos T y B, monocitos y neutrófilos, el papel fisiológico de estas es la regulación de diversos procesos relacionados con la respuesta inmunológica y la inflamación [38,86].

Por esta razón, la inflamación presente en los pulmones debido a la EPOC ha sido objeto de desarrollo de antiinflamatorios usando como diana farmacológica a la enzima PDE4 al inhibir la inactivación de AMPc e interrumpiendo las cascadas de señalización relacionadas a la inflamación por parte de varias células como se puede ver con detalle en la Tabla 3. Un ejemplo de esta clase de fármaco, y único para EPOC, es Roflumilast [81,87,88] pero estando en investigación y desarrollo otros fármacos [89–92].

Tabla 3. Consecuencias de la inhibición de PDE4 [91,93,94]

Tipo celular	Isoforma PDE4	Consecuencia de inhibición de la PDE
Linfocitos T (CD4, CD8, Th1, Th2, Th17)	A, B, D	Inhibición de la proliferación y liberación de citoquinas.
Linfocito B	A, B, D	Incremento de la proliferación.
Eosinófilos	A, B, D	Inhibición de la generación del anión superóxido; retraso de la apoptosis.
Neutrófilos	A, B, D	Inhibición de la liberación del anión superóxido y de la elastasa de neutrófilo.
Monocitos	A, B, D	Inhibición de la liberación de TNF α .
Macrófagos	A, B, D	Inhibición de la liberación de TNF α .
Células dendríticas	A, B, D	Inhibición de la liberación de TNF α .
Mastocitos		Poca o nula estabilización de mastocitos.
Células epiteliales de vías aéreas		Incremento de la producción de PGE2; inhibición de la producción de IL-6; incremento del eflujo de iones; reducción de la producción de mucosa e incremento de la frecuencia de batido ciliar.
Células endoteliales		Inhibición de la expresión de molécula de adhesión; Inhibición de la permeabilidad de las células endoteliales pulmonares.
Fibroblastos	A, B, D	Inhibición de la quimiotaxis de fibroblastos; inhibición de liberación de pro-MMP1,2; diferenciación en miofibroblastos; inhibición de producción de citoquinas y quimiocinas; inhibición de la expresión de actina alfa de musculo liso; inhibición de proliferación de fibroblastos.
Nervios sensitivos	D	Inhibición de la liberación de taquicinina.
Osteoblastos	A, B, D	Estimulación de la formación de osteoclastos RANKL-inducida
Condrocitos	A, B, D	Inhibición de IL-1b estimula producción de óxido nítrico
Células BETA pancreáticas	C, A, B	Incremento de la secreción de insulina dependiente de glucosa.
Adipocitos	A, B, C, D	Incremento lipolisis; no hay efecto en la inhibición de lipolisis inducida por insulina.

Cabe mencionar que se han identificado enfermedades debido a mutaciones en esta familia de proteínas, desde disfunción tiroidea, tumorigenesis, hipertensión primaria, trastornos en la formación del hueso tal como acrodisostosis y braquidactilia, trastornos en la vista por ejemplo retinitis pigmentosa y otras retinopatías, además de trastornos que afectan al cuerpo estriado [78]. Con la información recabada de ambas dianas farmacológicas (M3 y PDE4A) y su relación tan estrecha que poseen con la EPOC en el alivio de la broncoconstricción, así como la inflamación, que son síntomas clave en la recuperación del sentir de bienestar de aquellos que transcurren con la enfermedad, por esta razón se eligieron como dianas farmacológicas para la evaluación de moléculas esteroidales buscando un efecto en ambas dianas, esta búsqueda se realizará por medio de la bioinformática que ha sido parte fundamental del desarrollo de fármacos.

4. Bioinformática en farmacología

Los avances computacionales que ha permitido el desarrollo de distintas tecnologías y descubrimientos en años recientes, no ha sido indistinto a las ciencias de la salud que también ha tomado ventaja de los recursos informáticos para la investigación científica. Puntualmente uno de los campos beneficiados ha sido el desarrollo de fármacos mediante herramientas informáticas [95,96], que brinda un ahorro grande tanto de recursos al no tener que sintetizar distintos compuestos para su evaluación in vivo, así como de tiempo ya que solo entran a evaluación aquellos candidatos que muestran mejores resultados, permitiendo así una investigación más rápida, barata e incluso más amplia al poder evaluar moléculas en aquellas proteínas de interés que se encuentran cristalizadas por medio de técnicas de difracción de rayos X y disponibles en bases de datos como Protein Data Bank (PDB) (Figura 14) [97,98]. De la misma forma también se utilizan estos recursos para encontrar nuevas dianas farmacológicas para diversas enfermedades [99].

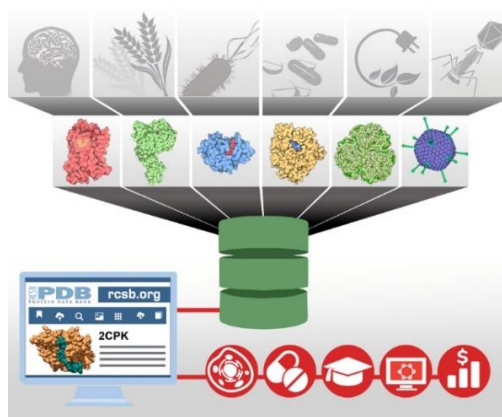


Figura 14. Protein Data Bank, base de datos de acceso libre [97]

Pero recientemente con la liberación del código fuente del software AlphaFold que su función es la obtención de modelos computacional de proteínas con una gran exactitud, obteniendo estructuras similares a los que se obtiene por difracción de rayos X o espectroscopia de resonancia magnética nuclear [100,101]. Esto permite que se amplie las posibilidades de investigación ya que existen proteínas que se dificulta la obtención de su cristal por distintas razones de esta forma se podría realizar las evaluaciones en cualquier proteína que se tenga su secuencia aminoacídica que sea de interés como objetivo farmacológico de cualquier enfermedad humana [102], e incluso permitiendo la investigación de fármacos en el campo de medicina veterinaria [103].

Otra de las herramientas empleadas a la par con la obtención del cristal o modelo computacional de la proteína, es el docking molecular (Figura 15), o también llamado acoplamiento molecular, que mediante algoritmos permite obtener la orientación de la molécula, la energía de acoplamiento (EA), de una molécula pequeña que recibe el nombre de ligando, con una proteína llamado receptor [104–106], dándonos un dato fundamental para conocer si la molécula, que tiene como fin ser candidato a fármaco, puede acoplarse en el sitio de la proteína, que puede ser el sitio activo o de forma alostérica [107].

La EA se encuentra dada por la energía libre de Gibbs (ΔG°), con unidades de kcal/mol y que es calculada con las interacciones entre el ligando y la proteína [105,108,109], está además nos dice que cuanto menor sea la energía a 0, más espontáneo será el acoplamiento de la molécula en el sitio de interés. Lo anterior nos permite el descartar aquellas moléculas que presenten poca afinidad, facilitando el proceso de selección para la evaluación *in vivo*. Ejemplo de este software es Autodock Vina que es de uso libre y que utiliza un algoritmo que usa iteraciones, llamado Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno [110].

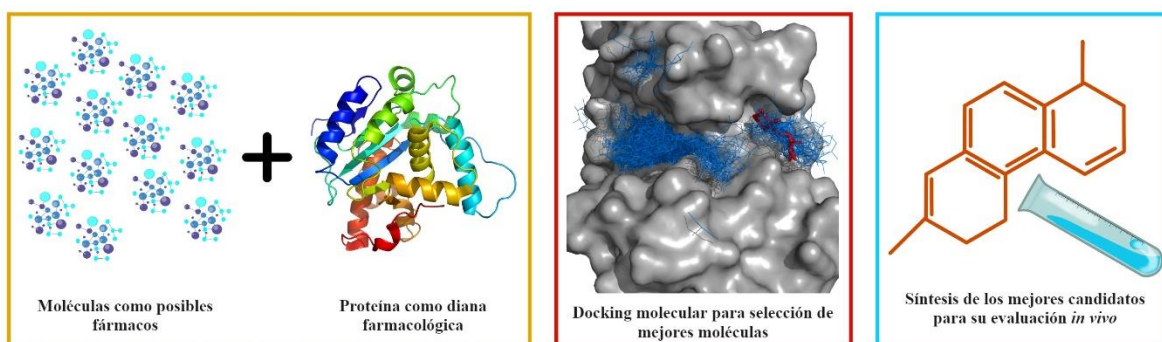


Figura 15. Diagrama de proceso de investigación usando docking molecular

Finalmente se discierne las interacciones de la molécula con los residuos aminoacídicos que le dio la EA mediante softwares de visualización (Figura 16) tal como Discovery Studio [111], UCSF Chimera [112] o PyMol [113], pero de igual forma la revisión de interacciones permite comprobar que se esté realizando la interacción con residuos aminoacídicos clave del sitio activo o alostérico, asegurándonos que la molécula se acople de forma correcta a su sitio objetivo.

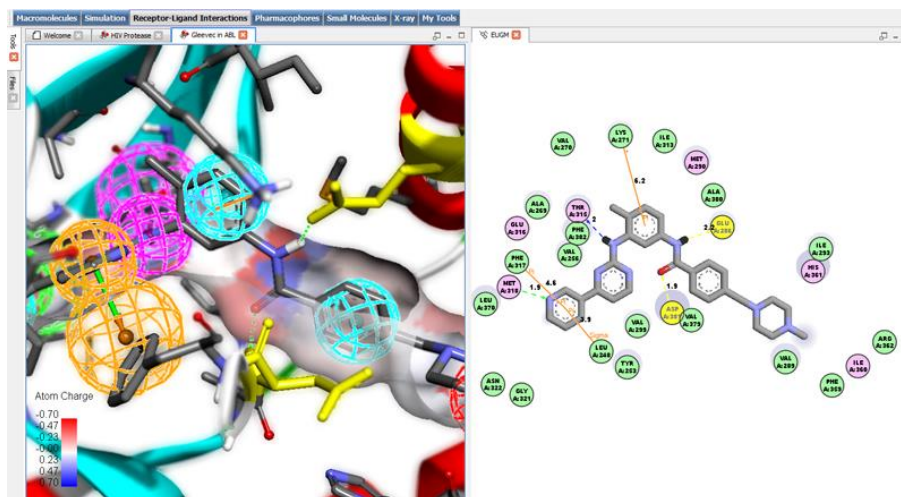


Figura 16. Ejemplo de visualización de resultados de docking en Discovery Studio [111]

Como complemento del proceso anterior, también se evalúan las moléculas de acuerdo con sus propiedades estructurales comparándolas con fármacos ya evaluados en laboratorio en bases de datos propias de la plataforma donde se lleva a cabo la evaluación, un ejemplo de esta es SwissADME que nos brinda datos como solubilidad en agua, lipofilicidad, farmacocinética, druglikeness (Figura 17). Estos parámetros nos permiten elucidar su posible comportamiento como fármaco [114].

Figura 17. Pantalla de uso de SwissADME [114]

Este tipo de investigación ha sido ampliamente utilizada durante el transcurso de la pandemia de Covid-19 debido a la necesidad de seguir realizando ciencia a pesar de no estar en un laboratorio físico, pero también para aprovechar la celeridad que brinda la realización del

análisis *in silico*, existen varios artículos donde se utilizó para la evaluación de moléculas como fármacos para Covid-19 así como incluso recolocación de fármacos [115]. Al convertirse incluso en un paso obligatorio para el desarrollo de fármacos, enfermedades como EPOC no están alejados de esta clase de investigación, donde se ha utilizado las herramientas bioinformáticas para el desarrollo y evaluación de moléculas tanto para el receptor M3, PDE4 entre otras [116–120].

5. Esteroides

Los esteroides no son ajenos al EPOC un ejemplo claro es el uso de los corticoesteroides, pero estos presentan una gran cantidad de efectos adversos, aún con esto es de interés estudiar esteroides de origen natural como una alternativa de terapia contra el EPOC, un modelo muy interesante son los espiroestanos, como la diosgenina y laxogenina.

En el contexto nacional el trabajo con esteroides no es reciente, incluso México se colocó a la vanguardia en la síntesis de hormonas esteroideas, citando a la revista Fortune en su artículo de 1951 “Mexican hormones” donde resaltan este hecho “la mayor explosión tecnológica que se haya escuchado al sur de la frontera” [121], todo esto gracias a la búsqueda de Marker (Figura 18) de material vegetal que fuera materia prima para la obtención de esteroides que sirvieran de punto de partida para la síntesis de hormonas esteroideas, lo trajo a nuestro país en 1942, donde en su búsqueda de dioscoreas para la obtención de diosgenina a partir de tubérculos endémicos de México, como cabeza de negro (*Dioscorea mexicana*) (Figura 18) y barbasco (*Dioscorea composita*) (Figura 18) con ayuda de Alberto Moreno, dueño de una tienda en Veracruz, que le proveyó los primeros ejemplares de *Dioscorea mexicana* [122].



Figura 18. (Izquierda) Marker con *Dioscorea mexicana*. (Superior derecha) *Dioscorea composita*. (Inferior derecha) *Dioscorea mexicana*.

Es así como su travesía sentaría las bases para la industria global de hormonas esteroideas que transformó la medicina reproductiva y el manejo de dolor en el siglo XX, siendo México la cumbre de esto después que la cortisona se sintetizara en 1951 en laboratorios mexicanos a partir del barbasco, muchas farmacéuticas instalaron subsidiarias en el país, debido a que el

gobierno restringió la exportación de tan preciado tubérculo. Esto significó beneficios al país, desde la formación de científicos mexicanos con la creación del primer doctorado en la UNAM al tener la necesidad de gente capacitada, así como la carrera por la investigación tanto de la ecología del barbasco como síntesis de hormonas ante científicos de todo el mundo, creación de industria farmacéutica capaz de competir a nivel mundial, así como un beneficio económico un sector olvidado, el campo mexicano.

Estos últimos merecen una mención honorífica en todos estos acontecimientos, ya que eran los únicos que poseían el conocimiento de donde localizar, así como de llegar hasta los lugares donde se podía encontrar el vegetal y que sin ellos no hubiera sido posible los descubrimientos (Figura 19).



Figura 19. Izquierda, Mural de Alfaro Siqueiros "El tesoro de la selva" donde se resalta el barbasco y su valor entre los recolectores. Derecha, Recolector de barbasco.

Uno de los eventos que trajo consigo esta etapa como México líder en la síntesis de hormonas esteroideas, fue la invención de la píldora anticonceptiva que cambió al mundo, donde fue participe un científico mexicano Luis Ernesto Miramontes [123].

La importancia de los esteroides continua hasta nuestros días, donde saponinas esteroidales como la diosgenina (Figura 20) se le han encontrado funciones biológicas como anticancerígeno, antitrombótico, hipocolesterolémico, entre otros [124–131], que como se mencionó anteriormente, también es utilizada como precursor de síntesis esteroideas, posee la habilidad de penetrar membranas celulares y unirse a receptores específicos. Otro espiroestano interesante es la laxogenina (Figura 20) debido a que actualmente ha demostrado efecto anabólico, así como anticancerígeno [132–134], siendo estas materias primas de partida para el diseño de nuevos candidatos a fármacos.

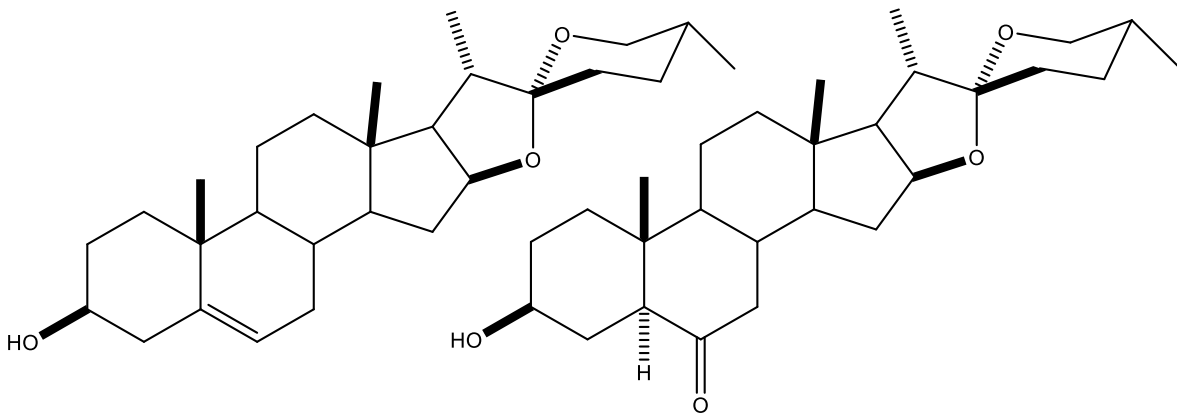


Figura 20. Estructura de diosgenina (izquierda) y laxogenina (derecha)

Cabe hacer mención que el uso de esteroides en otras enfermedades respiratorias es común, tal como es el caso para el asma, que es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, que mediante por distintos estímulos produce broncoconstricción. Siendo de esta forma el uso de corticoesteroides fármacos de primera línea, esto se lleva a cabo mediante la supresión de la inflamación mediante la inhibición de la expresión de múltiples genes de inflamación en células epiteliales de las vías respiratorias al tener efecto en muchas células de inflamación y estructurales que son activadas en el asma, así como impiden el reclutamiento de células de inflamación al interior de las vías respiratorias [30,135,136] (Figura 21).

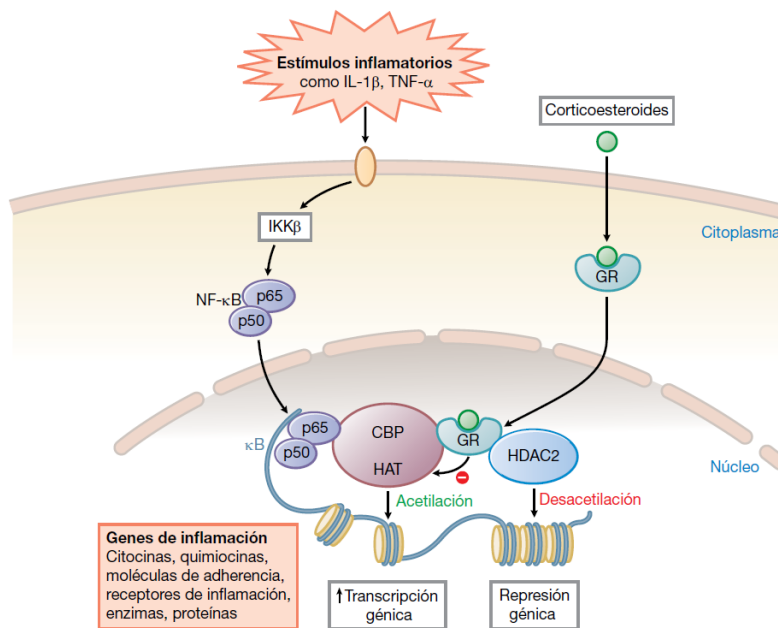


Figura 21. Mecanismos de acción de corticoesteroides en el asma [29].

Incluso se usa en enfermedades respiratorias en pacientes pediátricos [137] para enfermedades tales como asma [138], bronquiolitis [139], displasia broncopulmonar [140,141], fibrosis quística [142], Aspergilosis broncopulmonar alérgica [143], teniendo un

factor en común todas las enfermedades mencionadas siendo la inflamación presente en cada una, siendo los corticoesteroides fundamentales en el bienestar de todo aquel que atraviese cualquier padecimiento mencionado previamente, pero también utilizados para prevenir enfermedades neonatales como síndrome de dificultad respiratoria aguda taquipnea transitoria del recién nacido, en aquellos nacimientos prematuros permitiendo el correcto desarrollo de los pulmones mediante la administración de corticoesteroides [144].

De igual forma es usado en algunas enfermedades virales que provocan inflamación, tal como es el caso de neumonía provocada por Influenza, donde los corticoesteroides son prescritos para detener la cascada de señalización de la inflamación [145–147]. Otra enfermedad viral donde los corticoesteroides son una pieza fundamental en el tratamiento es en la infección por SARS-CoV-2 Figura 22, aquella enfermedad que incluso a fecha de escrito el presente trabajo, sigue siendo una enfermedad de importancia mundial que ha impactado de forma importante nuestras vidas el Covid-19, al ser una enfermedad relativamente nueva y descubrir que presentaba inflamación, se usó dexametasona en aquellos pacientes internados en los hospitales con síntomas graves, mejorando su situación de salud. [148,149]



Figura 22. Dexametasona contra Covid-19

Debido a la importancia social que representa la EPOC al ser una enfermedad que merma la vida de las personas que la padecen, así como colocarse en puestos importantes de mortalidad en el mundo, así como en el país, es fundamental la búsqueda de nuevos fármacos aprovechando las cualidades de las dianas farmacológicas como el receptor muscarínico M3 y PDE4 para mejorar la calidad de vida de las personas que transcurren con el padecimiento que se ha descrito anteriormente, la EPOC, en particular con el uso de herramientas bioinformáticas como el docking molecular para el diseño de nuevos candidatos, siendo moléculas esteroidales un modelo interesante al ser modificados en C-3 con diversos ésteres.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Diseñar *in silico* fármacos con posible efecto inhibitorio con acción dual para el receptor muscarínico M3 y de la fosfodiesterasa 4 derivados de diosgenina y laxogenina.

Objetivos particulares

- Evaluar la energía de acoplamiento de moléculas derivadas de diosgenina y laxogenina para el receptor muscarínico M3 y PDE4.
- Analizar las interacciones de los hits obtenidos con los residuos aminoacídicos del receptor muscarínico M3 y PDE4.
- Estimar las propiedades ADMET de los “hits” obtenidos.

METODOLOGIA

El desarrollo del proceso experimental *in silico* consistió en 4 partes (Figura 23), el acoplamiento molecular de las moléculas de estudio con el receptor muscarínico M3 y con PDE4, el análisis estadístico de los resultados obtenidos del acoplamiento molecular, el análisis interaccional de las moléculas con los residuos aminoacídicos y finalmente un estudio ADMET, todo este proceso para finalmente obtener moléculas como candidato a fármacos con acción dual en el receptor muscarínico M3 y PDE4 para la enfermedad de EPOC.

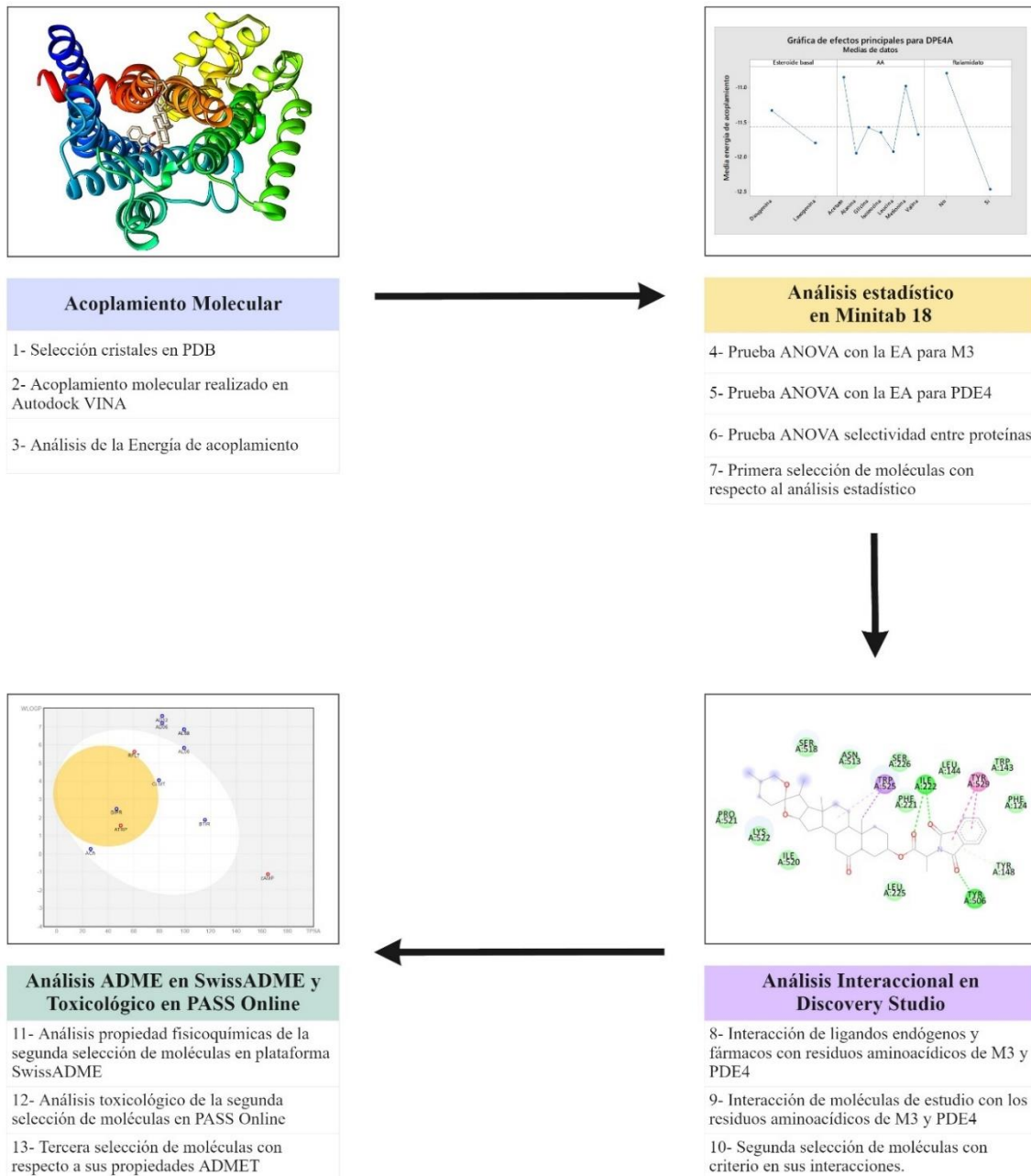


Figura 23. Diagrama de la metodología empleada.

Primeramente, para realizar el acoplamiento molecular se eligieron dos cristales de la base de datos de PDB, uno correspondiente al receptor muscarínico M3 con el número de identificación 5ZHP y para PDE4 se eligió el cristal con número de identificación 2QYK. Posteriormente se realizó el acoplamiento molecular con el software Autodock VINA con ambos cristales, tanto de las moléculas de estudio como del ligando natural y los fármacos comerciales, esto se realizó con 100 iteraciones por molécula, se graficaron los resultados obtenidos.

En consecuencia de los resultados, se realizó un análisis estadístico para elucidar la causa de la EA obtenida, si fue la presencia del grupo ftalamidato, el grupo añadido en el acetato en el C3 o si era influyente el tipo de esteroide usado, si diosgenina o laxogenina. Para saber si existía diferencia significativa se aplicaron pruebas ANOVA para los resultados con M3, con PDE4 además en conjunto para conocer la posible selectividad de las moléculas por las proteínas. Con estos resultados, fue posible descartar aquellas moléculas que no tuviera en su estructura el grupo ftalamidato para posteriores análisis.

Con los resultados obtenidos previamente, se procedió a analizar las interacciones con los residuos aminoacídicos del receptor M3 y de PDE4 de las moléculas remanentes, así como de los ligandos endógenos y fármacos; esto para elucidar las contribuciones por la estructura que poseen a la EA así como cerciorarse de que estén actuando dentro del sitio de acoplamiento de la proteína inhibiendo el acoplamiento del ligando endógeno. De esta forma se hizo otro filtro de moléculas que satisficiera el criterio anteriormente mencionado.

Finalmente, con el filtro de moléculas previo, se sometió a un análisis ADMET a las moléculas remanentes, así como los ligandos naturales y fármacos comerciales. Para lograr este fin se analizó las propiedades ADME en la plataforma SwissADME, del cual permitió hacer una comparación con la base de datos que posee para conseguir un resultado aproximado de estas propiedades para dar lugar a una conclusión de si presentan las cualidades de fármacos. Por último, se analizó las propiedades toxicológicas que pudieran poseer las moléculas remanentes en la plataforma PASS Online así como comparar con las que poseen los fármacos actuales, de esta forma dar la información de que los beneficios puedan ser mayores a sus efectos adversos, así como si poseían menos que los tratamientos actuales empleados en la enfermedad de EPOC.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Dado la relevancia del EPOC y su búsqueda continua de fármacos, mediante herramientas bioinformáticas se realizó el diseño de nuevos candidatos derivados de diosgenina y laxogenina con las proteínas M3 y PDE4A mediante el procedimiento que se observa en la Figura 24, destacando que se analizó estadísticamente el efecto del esteroide y del éster en el C-3.

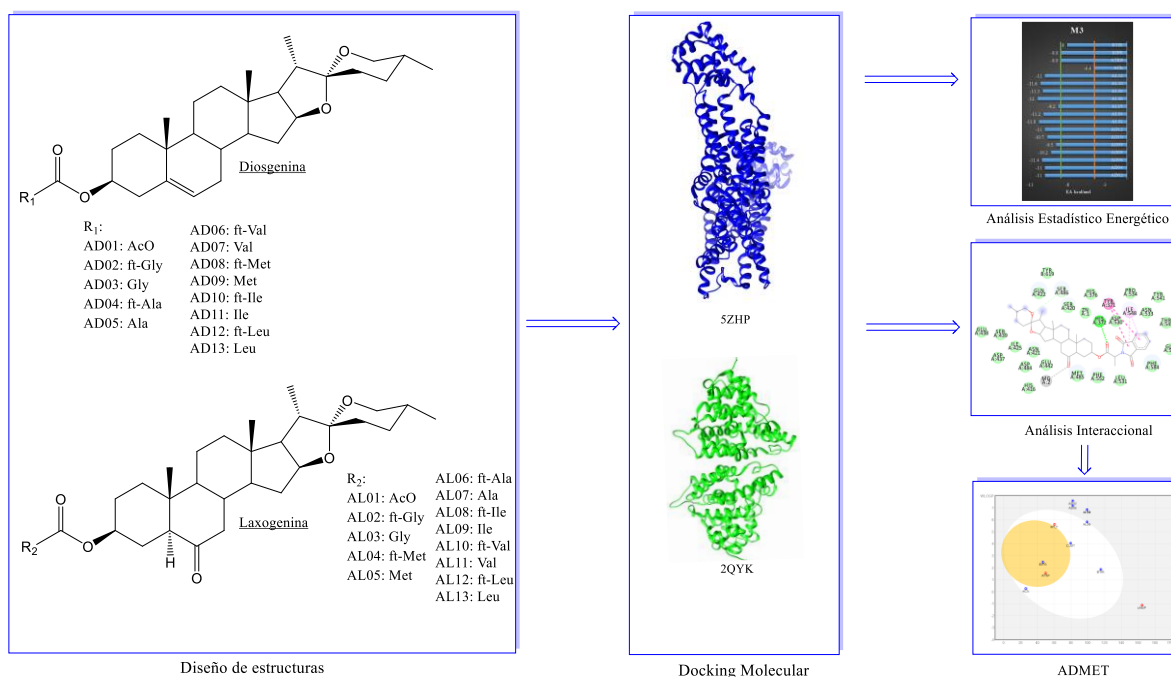


Figura 24. Esquema del procedimiento llevado a cabo

Para el diseño y análisis de nuevos candidatos con efecto broncodilatador y antiinflamatorio, se selecciona el receptor muscarínico M3 y la fosfodiesterasa 4 PDE4A respectivamente, a fin de analizar el efecto energético a nivel estadístico, primero estudiando la normalidad de los datos y después evaluar los efectos significativos, posteriormente pasar a un análisis interaccional para determinar el efecto inhibitorio y no activador de estos nuevos derivados, seleccionando así los candidatos o hits de la parte de docking molecular, para proceder a la predicción de las propiedades ADME y toxicológicas.

1. Análisis energético estadístico

En las gráficas de la Figura 26, se puede apreciar que los valores de las moléculas de interés son superiores a los ligandos naturales tanto del receptor M3 como PDE4, de igual forma supera la EA de los fármacos utilizados comúnmente (Figura 25) para EPOC que utilizan las dianas farmacológicas mencionadas.

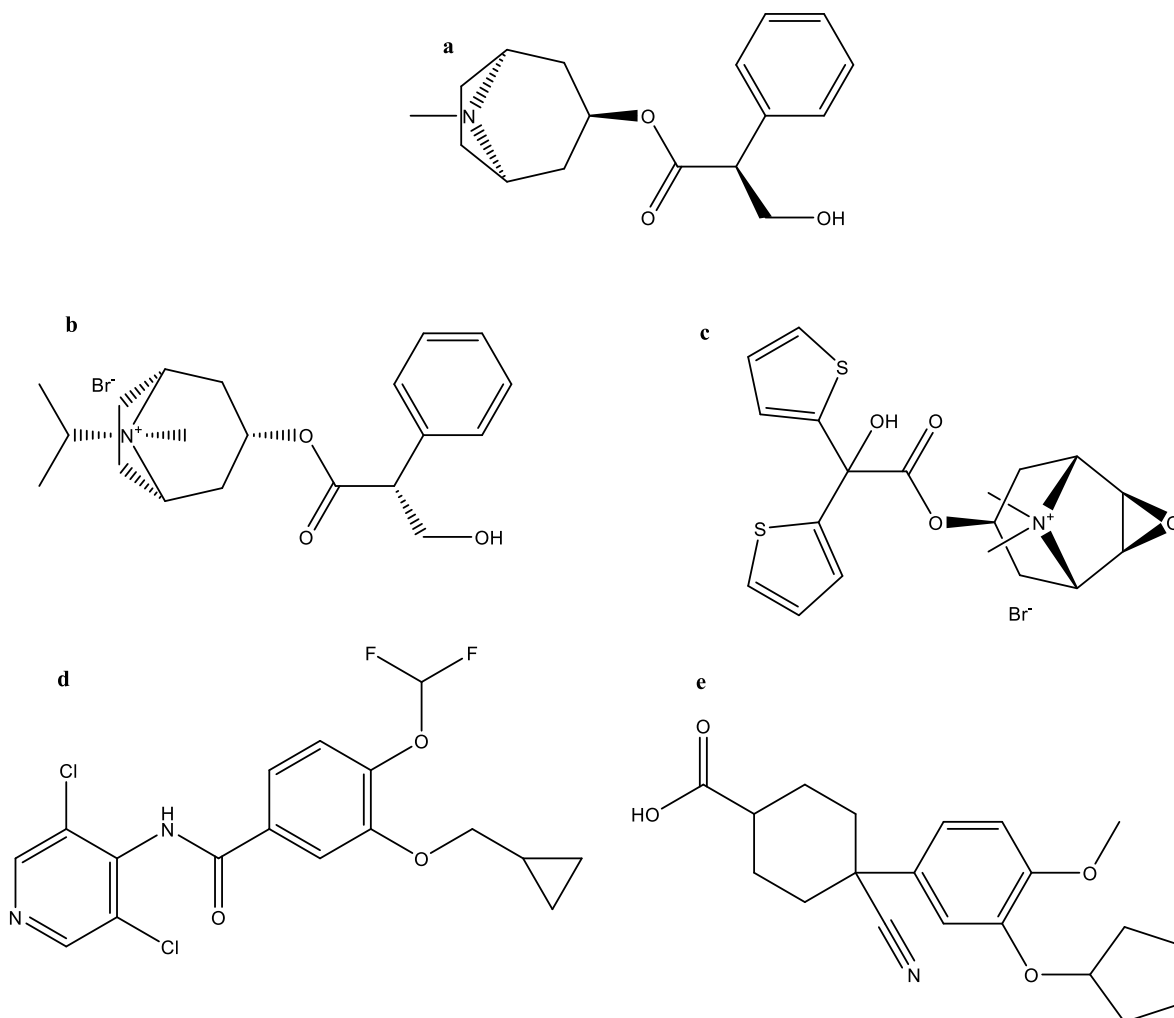


Figura 25. Fármacos utilizados para EPOC en M3 y PDE4, a: atropina (ATRP), b: ipratropio, c: tiotropio, d: roflumilast, e: cilomilast.

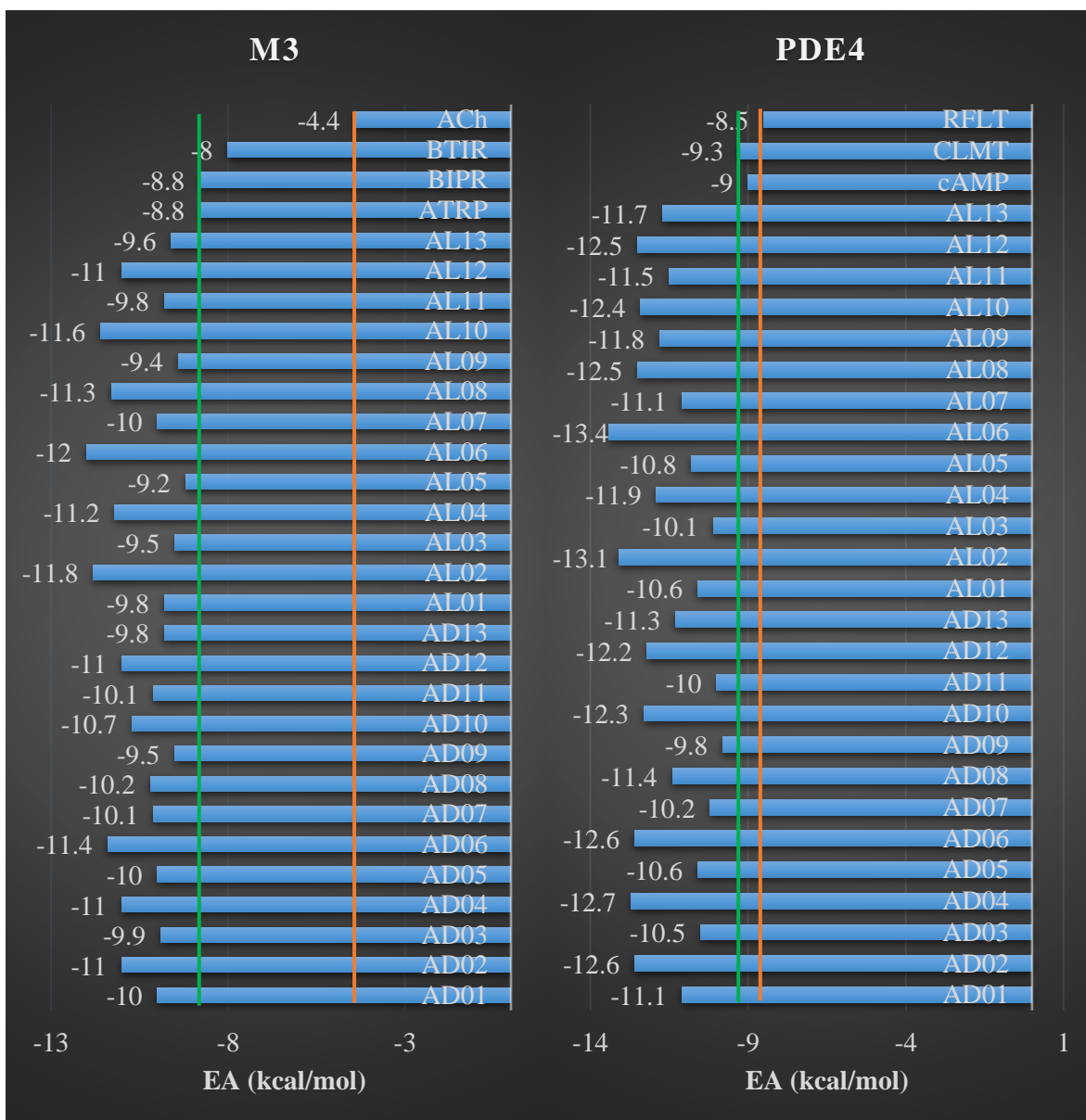
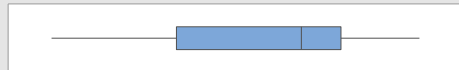
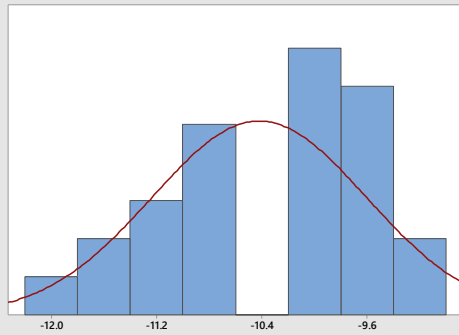


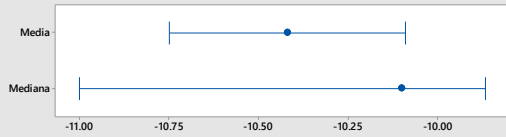
Figura 26. Energías de acoplamiento para M3 (izquierda) y PDE4 (derecha)

A fin de analizar estos datos energéticos a nivel estadístico se realizó la prueba de normalidad a ambos grupos de datos, como se observa en la Figura 27, observando una distribución normal con $p > 0.05$ en ambos casos, lo que permitió un estudio paramétrico, mediante una prueba de ANOVA post LSD-Fisher de manera separada y al final en conjunto para observar la selectividad de los compuestos de hacia una u otra proteína.

Informe de resumen de M3

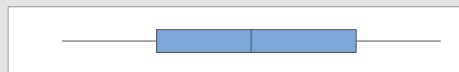
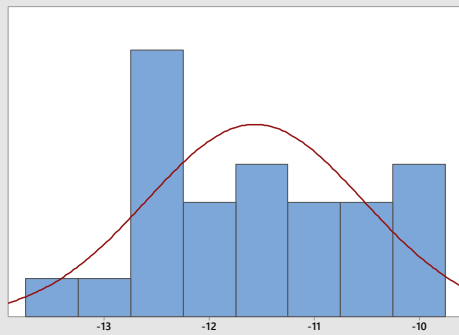


Intervalos de confianza de 95%

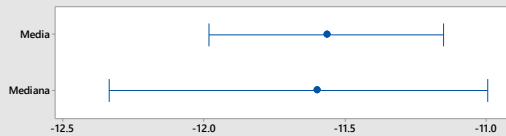


Prueba de normalidad de Anderson-Darling	
A-cuadrado	0.81
Valor p	0.032
Media	-10.419
Desv.Est.	0.816
Varianza	0.666
Asimetría	-0.39935
Curtosis	-1.10821
N	26
Mínimo	-12.000
1er cuartil	-11.050
Mediana	-10.100
3er cuartil	-9.800
Máximo	-9.200
Intervalo de confianza de 95% para la media	
	-10.749 -10.090
Intervalo de confianza de 95% para la mediana	
	-11.000 -9.865
Intervalo de confianza de 95% para la desviación estándar	
	0.640 1.127

Informe de resumen de PDE4A



Intervalos de confianza de 95%



Prueba de normalidad de Anderson-Darling	
A-cuadrado	0.36
Valor p	0.431
Media	-11.565
Desv.Est.	1.028
Varianza	1.057
Asimetría	0.09288
Curtosis	-1.09284
N	26
Mínimo	-13.400
1er cuartil	-12.500
Mediana	-11.600
3er cuartil	-10.600
Máximo	-9.800
Intervalo de confianza de 95% para la media	
	-11.981 -11.150
Intervalo de confianza de 95% para la mediana	
	-12.335 -10.995
Intervalo de confianza de 95% para la desviación estándar	
	0.806 1.419

Figura 27. Resumen de análisis estadístico para prueba de normalidad tanto de M3 como PDE4A

1.1. Análisis estadístico del efecto sobre M3

Con respecto al receptor muscarínico M3 existen varias interrogantes a comparar, primero el efecto del éster de los diversos aminoácidos alifáticos y el acetato como control sin el grupo amino (el cual puede estar protegido o desprotegido), la presencia o ausencia del grupo ftalamidato, el esteroide original (diosgenina vs laxogenina) siendo estos tres correlatos a estudiar con el grupo de moléculas seleccionadas a fin de definir los candidatos a bloqueo de M3 para efecto broncodilatador, dado la normalidad de los datos se procedió en primera instancia a realizar un estudio generalizado con estos tres factores, lo cual podemos observar en la gráfica de efectos principales, de la Figura 28, denotando que a priori el esteroide no tiene un efecto significativo, en cambio la presencia o ausencia del grupo protector delimita un cambio en promedio de más 1.0 kcal/mol, para el caso de los ésteres utilizados se observa un efecto disperso sobre la media, teniendo valores superiores e inferiores, pero no suficiente para determina significancia entre ellos.

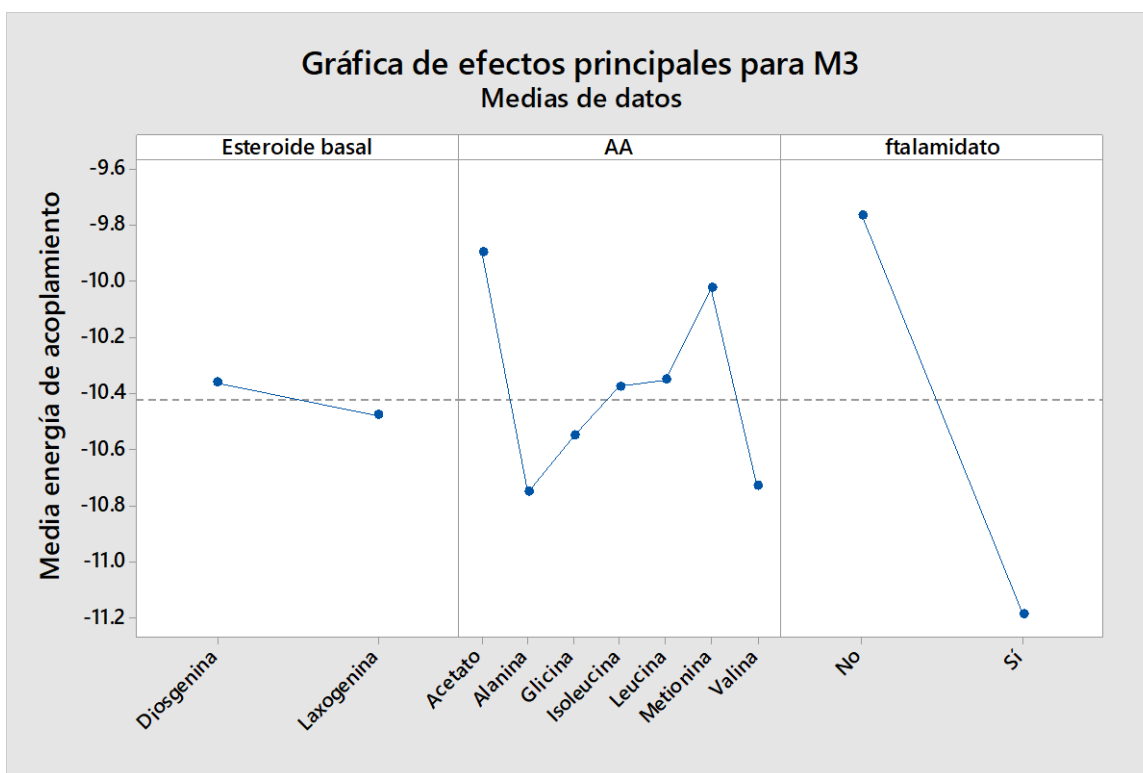


Figura 28. Gráfica de efectos principales en la EA de la molécula con M3 con respecto al esteroide, aminoácido o presencia del grupo protector.

1.1.1. Análisis del grupo éster

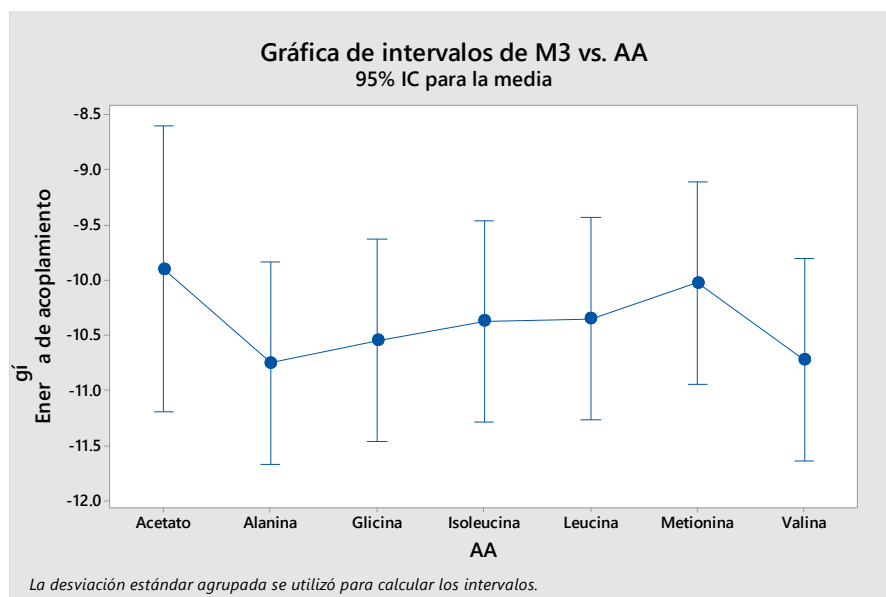


Figura 29. Gráfico de intervalos de M3 con respecto al aminoácido presente en la molécula

Dado la normalidad de los datos se procedió a realizar una prueba ANOVA post LSD-Fisher con la hipótesis abajo mostrada, obteniendo un valor de p de 0.837 (Tabla 4) siendo mayor que $\alpha = 0.05$, por lo tanto, se acepta la Hipótesis alternativa, lo que al comparar con la prueba de Fisher ($p > 0.256$) además de cómo se puede observar en la Tabla 5, se concluye que no existe una diferencia significativa en la EA si es Alanina, Glicina, Isoleucina, Leucina, Metionina, Valina o acetato para la proteína M3 (Figura 29).

Hipótesis nula Existe diferencia significativa dependiendo del aminoácido
 Hipótesis alterna No existe diferencia significativa dependiendo del aminoácido
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Tabla 4. Análisis de varianza con respecto al aminoácido presente en la molécula

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AA	6	2.068	0.3446	0.45	0.837
Error	19	14.593	0.7680		
Total	25	16.660			

Tabla 5. Agrupación del efecto del éster sobre la EA en M3, $p < 0.05$

AA	N	Media	Agrupación
NA	2	-9.900	A
Metionina	4	-10.025	A
Leucina	4	-10.350	A
Isoleucina	4	-10.375	A
Glicina	4	-10.550	A
Valina	4	-10.725	A
Alanina	4	-10.750	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

1.1.2. Análisis del efecto del esteroide basal

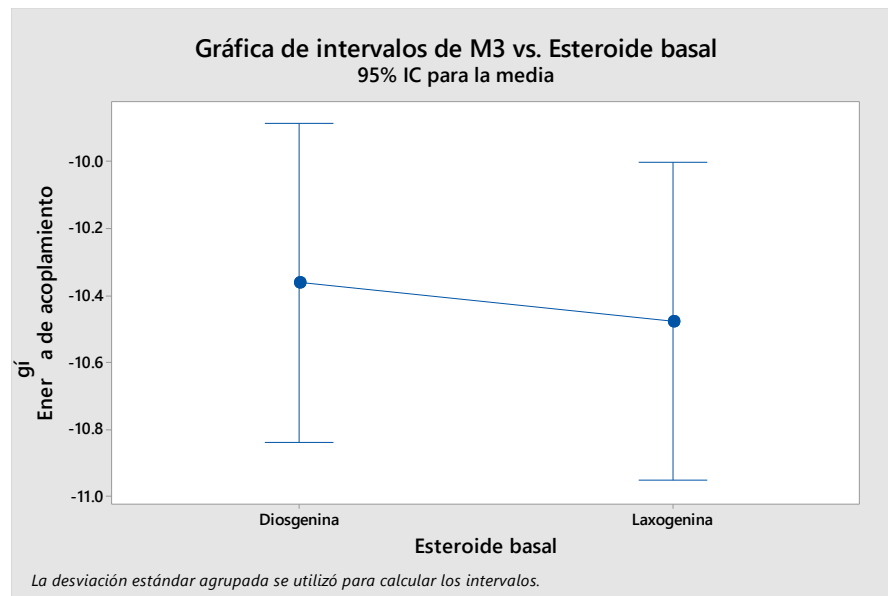


Figura 30. Gráfico de intervalos con respecto al esteroide presente en la molécula

Debido a la normalidad de los datos se procedió a realizar una prueba ANOVA post LSD-Fisher con la hipótesis abajo mostrada, obteniendo un valor de p de 0.726 (Tabla 6) siendo mayor que $\alpha = 0.05$, por lo tanto, se acepta la Hipótesis alternativa, lo que al comparar con la prueba de Fisher ($p > 0.726$), así como se puede observar en la Tabla 7, se concluye que no existe una diferencia significativa en la EA si se usa el esteroide diosgenina o laxogenina para la proteína M3 (Figura 30).

Hipótesis nula Es significativo si es diosgenina o laxogenina
 Hipótesis alterna No es significativo si es diosgenina o laxogenina
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Tabla 6. Análisis de varianza con respecto al esteroide

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Funcionalidad	1	0.0865	0.08654	0.13	0.726
Error	24	16.5738	0.69058		
Total	25	16.6604			

Tabla 7. Agrupación del efecto del esteroide sobre la EA en M3, $p < 0.05$

Funcionalidad	N	Media	Agrupación
Diosgenina	13	-10.362	A
Laxogenina	13	-10.477	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

1.1.3. Análisis del efecto del grupo protector ftalamidato

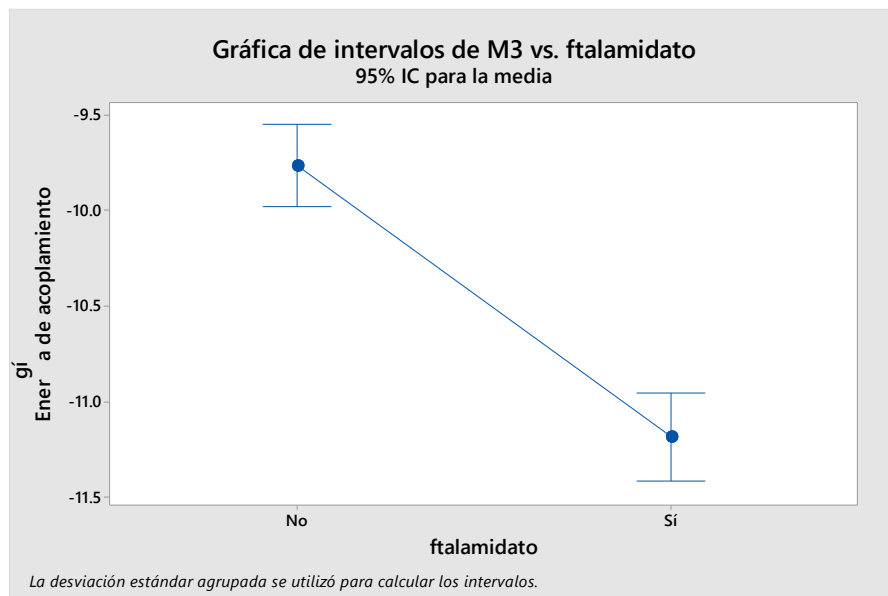


Figura 31. Gráfico de intervalos de M3 con respecto a la presencia del grupo protector

Debido a la normalidad de los datos se procedió a realizar una prueba ANOVA post LSD-Fisher con la hipótesis abajo mostrada, obteniendo un valor de p de 0.000000002 (Tabla 8) siendo menor que $\alpha = 0.05$, por lo tanto, se acepta la Hipótesis nula, lo que al comparar con

la prueba de Fisher ($p > 0.000000002$), así como se puede observar en la Tabla 9, se concluye que existe una diferencia significativa en la EA si está presente el grupo protector ftalamidato para la proteína M3, lo que implica que según la ruta de síntesis planteada conviene dejar el aminoácido sin desproteger, efecto que se puede explicar por las interacciones que este puede presentar en el sitio de unión del receptor M3 (Figura 31 y Figura 32).

Hipótesis nula Existe diferencia si hay presencia del grupo ftalamidato
 Hipótesis alterna No existe diferencia si hay presencia del grupo ftalamidato
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Tabla 8. Análisis de varianza con respecto al grupo protector

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
ftalamidato	1	13.012	13.0116	85.58	0.000000002
Error	24	3.649	0.1520		
Total	25	16.660			

Tabla 9. Agrupación del efecto del grupo protector en la EA, $p < 0.05$

ftalamidato	N	Media	Agrupación
No	14	-9.7643	A
Sí	12	-11.183	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

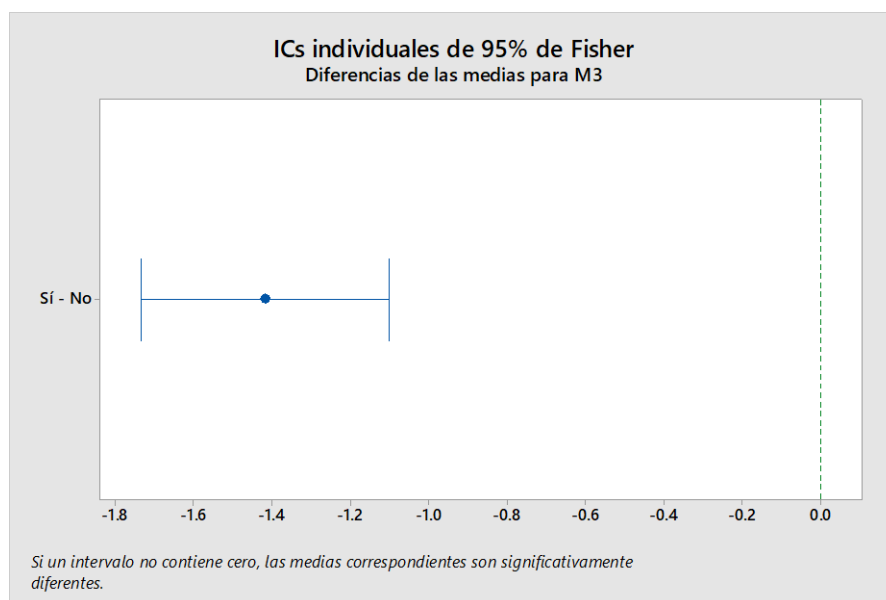


Figura 32. Gráfico de intervalo de diferencia de medias para M3 de 95% con método de Fisher

1.2. Análisis del efecto sobre PDE4A

Con respecto a la difosfoesterasa-4A (PDE4A), así como la diana farmacológica anterior, existen varias interrogantes a comparar, primero el efecto del ester de los diversos aminoácidos alifáticos y el acetato como control sin el grupo amino (el cual puede estar protegido o desprotegido), la presencia o ausencia del grupo ftalamidato, el esteroide original (diosgenina vs laxogenina) siendo estos tres correlatos a estudiar con el grupo de moléculas seleccionadas a fin de definir los candidatos a bloqueo de PDE4A para efecto antiinflamatorio, dado la normalidad de los datos se procedió en primera instancia a realizar un estudio generalizado con estos tres factores, lo cual podemos observar en la gráfica de efectos principales, Figura 33, denotando que a priori el esteroide tiene un efecto significativo, en cambio la presencia o ausencia del grupo protector delimita un cambio en promedio de más 1.5 kcal/mol, para el caso de los aminoácidos utilizados se observa un efecto disperso sobre la media, teniendo valores superiores e inferiores, pero no suficiente para determina significancia entre ellos.

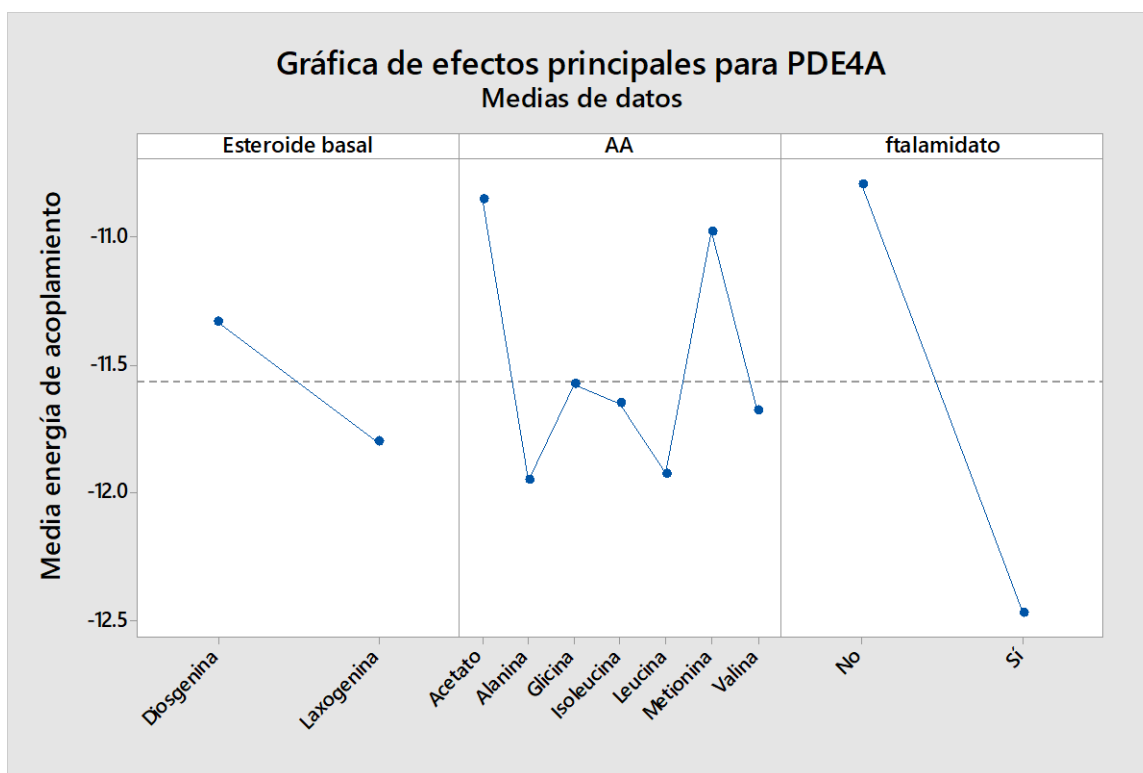


Figura 33. Gráfica de efectos principales en la EA de la molécula con PDE4A con respecto al esteroide, aminoácido o presencia del grupo protector

1.2.1. Análisis del grupo éster

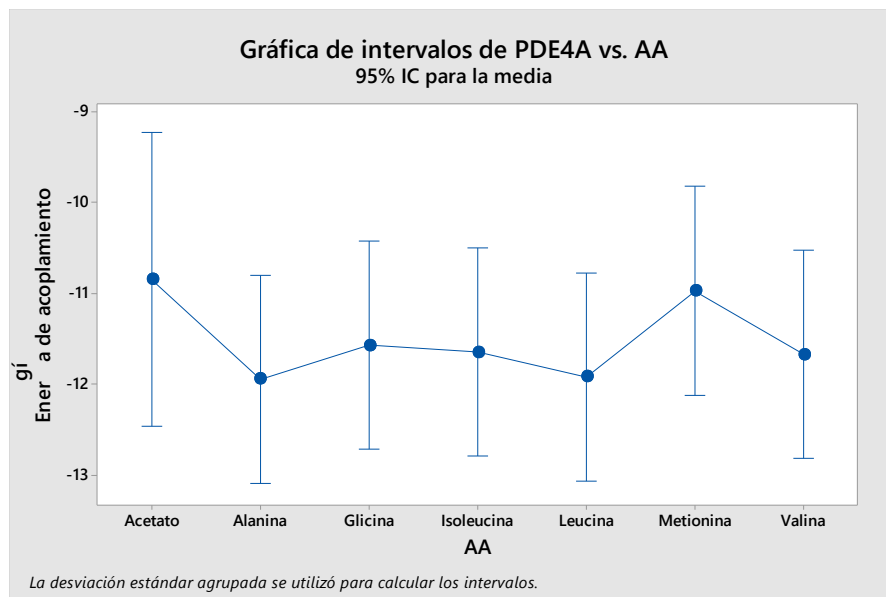


Figura 34. Gráfica de intervalos con respecto al aminoácido en la molécula

Dado la normalidad de los datos se procedió a realizar una prueba ANOVA post LSD-Fisher con la hipótesis abajo mostrada, obteniendo un valor de p de 0.800 (

Tabla 10) siendo mayor que $\alpha = 0.05$, por lo tanto, se acepta la Hipótesis alternativa, lo que al comparar con la prueba de Fisher ($p > 0.256$), así como se puede observar en la Tabla 11, se concluye que no existe una diferencia significativa en la EA si es Alanina, Glicina, Isoleucina, Leucina, Metionina, Valina o acetato para la proteína PDE4A (Figura 34).

Hipótesis nula Existe diferencia significativa dependiendo del aminoácido
 Hipótesis alterna No existe diferencia significativa dependiendo del aminoácido
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Tabla 10. Análisis de varianza con respecto al aminoácido presente en la molécula

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AA	6	3.604	0.6006	0.50	0.800
Error	19	22.815	1.2008		
Total	25	26.419			

Tabla 11. Agrupación del efecto del éster sobre la EA en PDE4A, $p < 0.05$

AA	N	Media	Agrupación
NA	2	-10.850	A
Metionina	4	-10.975	A
Glicina	4	-11.575	A
Isoleucina	4	-11.650	A
Valina	4	-11.675	A
Leucina	4	-11.925	A
Alanina	4	-11.950	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

1.2.2. Análisis de esteroide basal

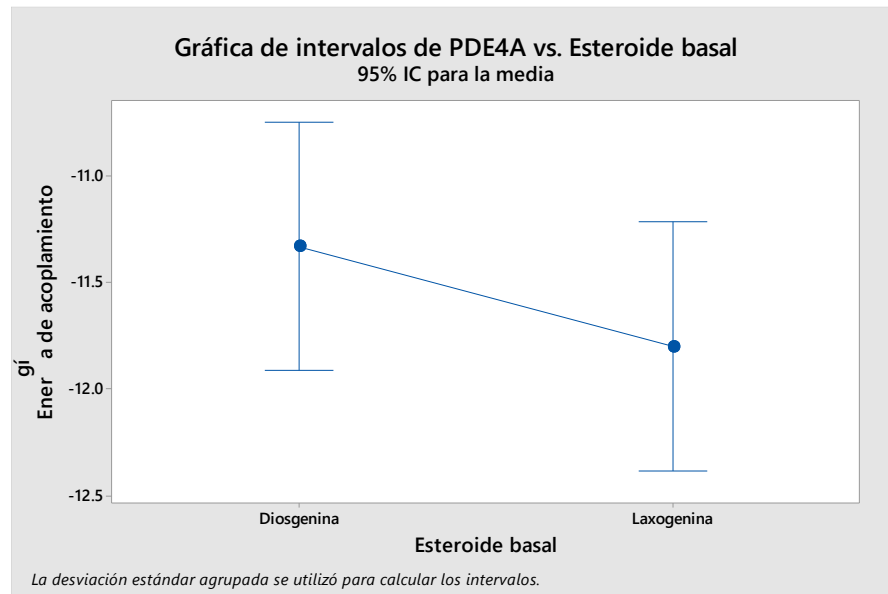


Figura 35. Gráfica de intervalos con respecto al esteroide basal de la molécula

Debido a la normalidad de los datos se procedió a realizar una prueba ANOVA post LSD-Fisher con la hipótesis abajo mostrada, obteniendo un valor de p de 0.253 (

Tabla 12) siendo mayor que $\alpha = 0.05$, por lo tanto, se acepta la Hipótesis alternativa, lo que al comparar con la prueba de Fisher ($p > 0.253$), así como se puede observar en la Tabla 13, se concluye que no existe una diferencia significativa en la EA si se usa el esteroide diosgenina o laxogenina para la proteína PDE4A (Figura 35 y Figura 36).

Hipótesis nula	Es significativo si es diosgenina o laxogenina
Hipótesis alterna	No es significativo si es diosgenina o laxogenina
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Tabla 12. Análisis de varianza respecto con el esteroide basal

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Funcionalidad	1	1.431	1.431	1.37	0.253
Error	24	24.988	1.041		
Total	25	26.419			

Tabla 13. Agrupación del efecto del esteroide sobre la EA en PDE4, $p < 0.05$

Funcionalidad	N	Media	Agrupación
Diosgenina	13	-11.331	A
Laxogenina	13	-11.800	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

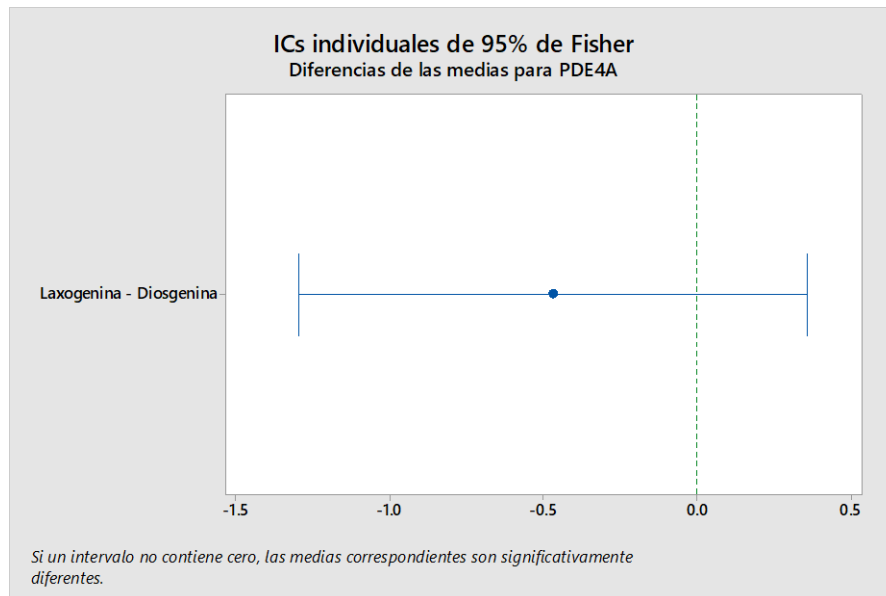


Figura 36. Gráfica de intervalo con respecto al esteroide basal de la molécula

1.2.3. Análisis de grupo protector

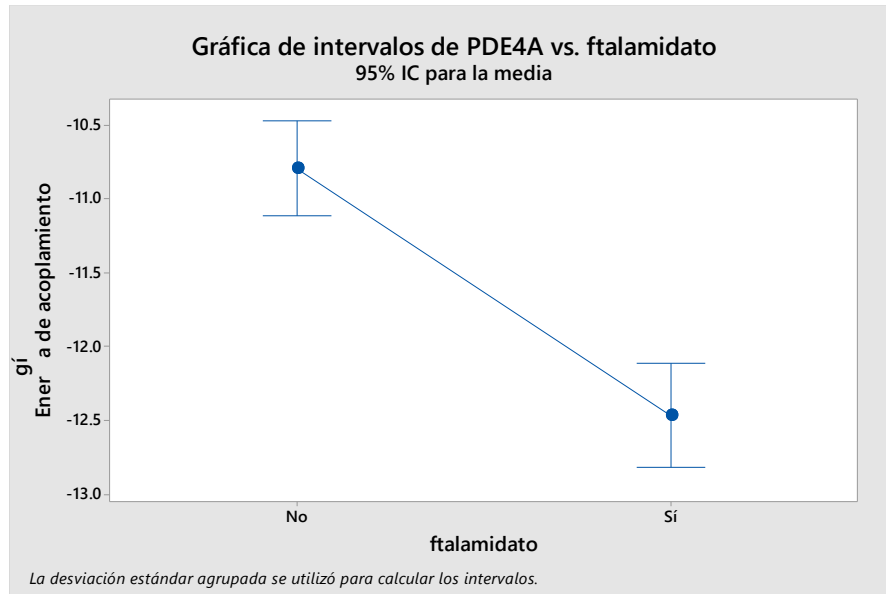


Figura 37. Gráfica de intervalos con respecto al grupo protector

Debido a la normalidad de los datos se procedió a realizar una prueba ANOVA post LSD-Fisher con la hipótesis abajo mostrada, obteniendo un valor de p de 0.0000002 (Tabla 14) siendo menor que $\alpha = 0.05$, por lo tanto, se acepta la Hipótesis nula, lo que al comparar con la prueba de Fisher ($p > 0.0000002$), así como se puede observar en la Tabla 15, se concluye que existe una diferencia significativa en la EA si está presente el grupo protector ftalamidato para la proteína PDE4A, lo que implica que según la ruta de síntesis planteada conviene dejar el aminoácido sin desproteger, efecto que se puede explicar por las interacciones que este puede presentar en el sitio de unión del receptor M3 (Figura 37 y Figura 38).

Hipótesis nula Existe diferencia si hay presencia del grupo ftalamidato
 Hipótesis alterna No existe diferencia si hay presencia del grupo ftalamidato
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Tabla 14. Análisis de varianza con respecto al grupo protector

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
ftalamidato	1	18.103	18.1029	52.25	0.0000002
Error	24	8.316	0.3465		
Total	25	26.419			

Tabla 15. Agrupación del efecto del grupo protector en la EA en PDE4A, $p < 0.05$

ftalamidato	N	Media	Agrupación	
No	14	-10.793	A	
Sí	12	-12.467	B	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

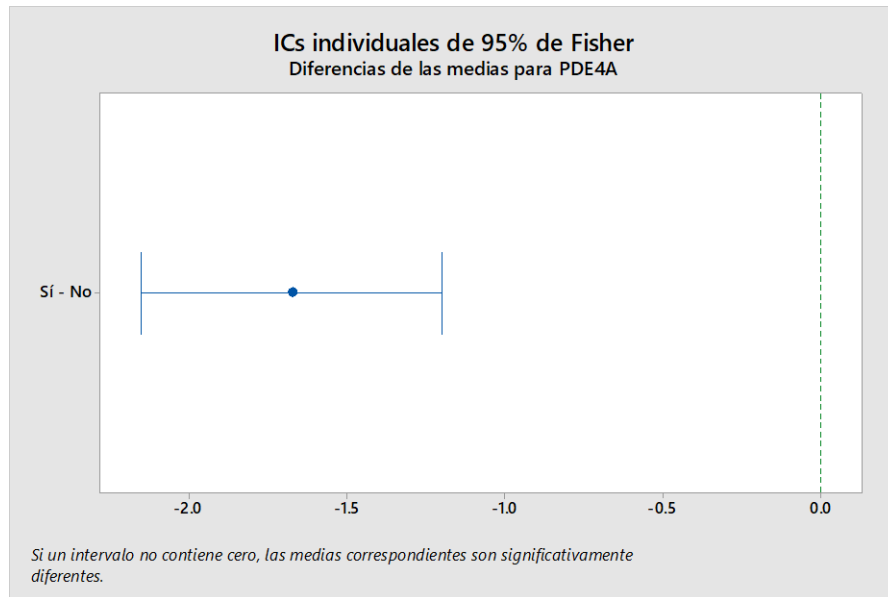


Figura 38. Gráfico de intervalo con respecto a grupo protector método de Fisher

1.3. Análisis de selectividad entre proteínas

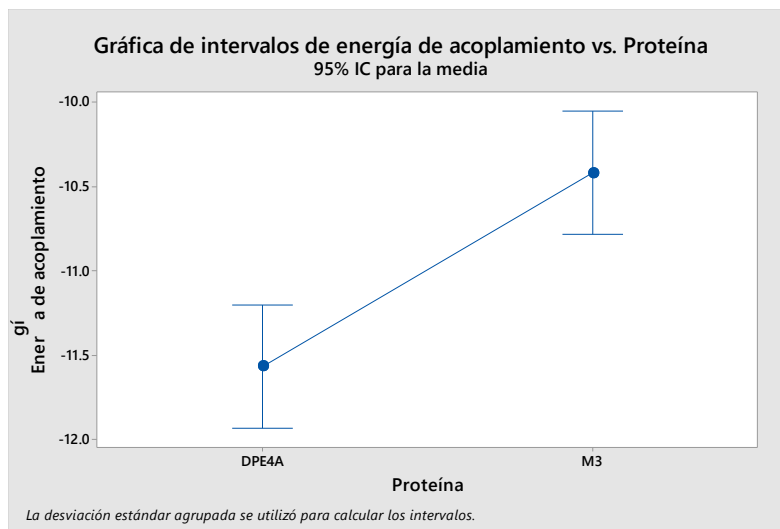


Figura 39. Gráfica de intervalos con respecto a las dianas farmacológicas

Por último con respecto al análisis estadístico, se procedió a realizar una prueba ANOVA post LSD-Fisher con la hipótesis abajo mostrada, obteniendo un valor de p de 0.00005 (Tabla 16) siendo menor que $\alpha = 0.05$, por lo tanto, se acepta la Hipótesis alterna, lo que al comparar con la prueba de Fisher ($p > 0.00005$), se concluye que no existe una diferencia significativa en entre la EA de los compuestos con respecto a la diana a la que se une, ya sea el receptor muscarínico M3 o PDE4A (Figura 39 y Figura 40), pero incluso aunque la diferencia no sea significativa, cabe señalar que si es mayor la EA obtenida por PDE4A con respecto a M3. Esto puede implicar que es posible el efecto dual que se busca en las dianas farmacológicas con los compuestos de estudio.

Hipótesis nula	Existe diferencia significativa en la EA de los compuestos entre M3 y PDE4A
Hipótesis alterna	No existe diferencia significativa en la EA de los compuestos entre M3 y PDE4A
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Tabla 16. Análisis de varianza con respecto a ambas dianas farmacológicas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Proteína	1	17.08	17.0777	19.82	0.00005
Error	50	43.08	0.8616		
Total	51	60.16			

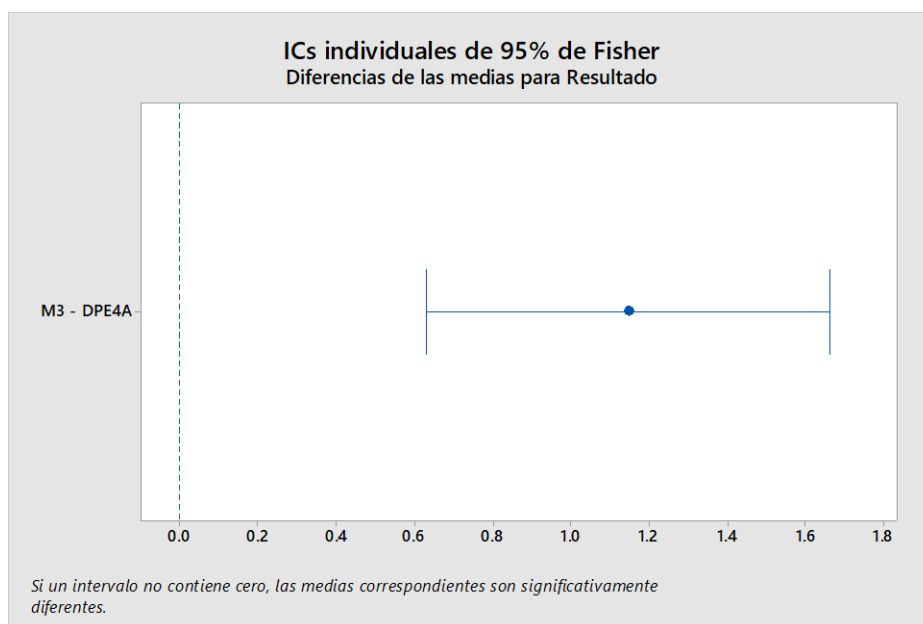


Figura 40. Gráfico de intervalo con respecto a la diana farmacológica mediante método de Fisher

1.4. Selección de candidatos energéticos.

Dado que las pruebas estadísticas nos indican que el único factor importante es la presencia del grupo protector, por lo cual en la Figura 41 podemos observar las energías de acoplamiento de los compuestos (Figura 42) que cumplen con este criterio además de los ligandos y fármacos de referencia, así como 2 controles negativos, los que se seleccionaron con respecto a la ausencia del grupo ftalamidato. Para posteriormente analizar sus interacciones con los residuos aminoacídicos del sitio de acoplamiento tanto para el receptor muscarínico M3 y PDE4A.

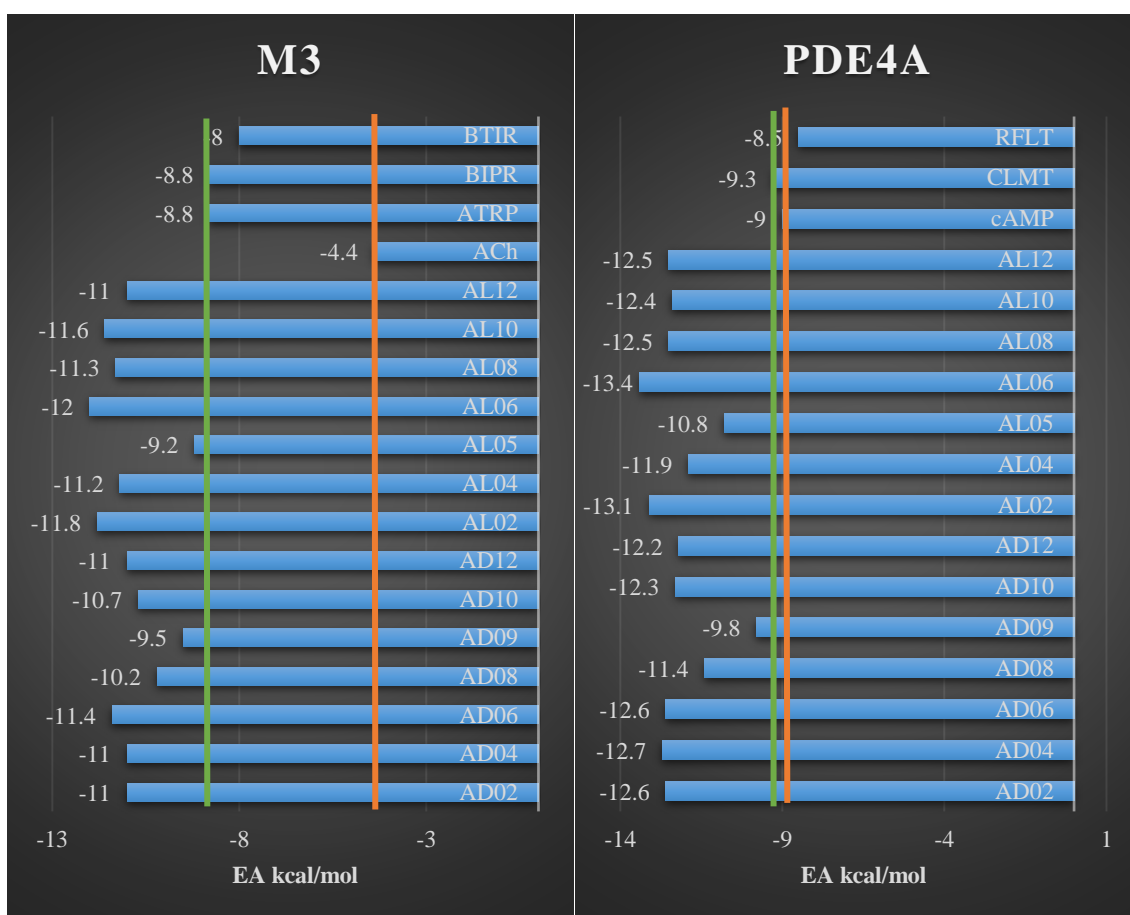


Figura 41. Gráficas de EA de compuestos con el grupo protector, fármacos y ligandos naturales

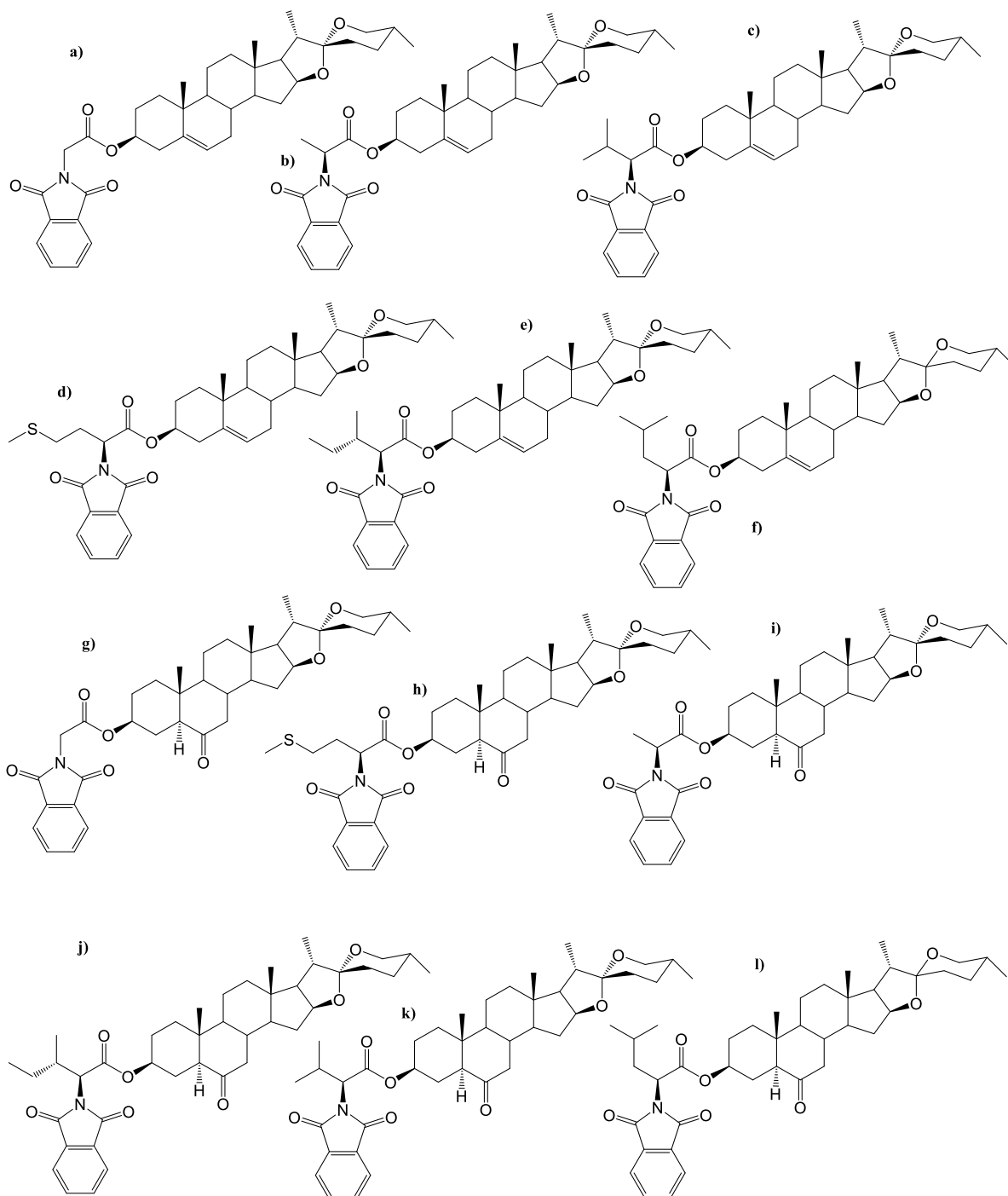


Figura 42. Primeros candidatos a) AD02, b) AD04, c) AD06, d) AD08, e) AD10, f) AD12, g) AL2, h) AL04, i) AL06, j) AL08, k) AL10, l) AL12.

El análisis interaccional de los candidatos después de los estadísticos podrá elucidar tanto la razón de la EA de cada molécula con su respectivo receptor debido a su estructura, así como la correcta elección de moléculas al asegurar que sus interacciones sean con residuos aminoacídicos clave del sitio de acoplamiento para que de esta forma cumplan con su función como fármacos.

2. Análisis Interaccional

El presente análisis de las interacciones que poseen cada molécula del estudio, así como tomando de referencia los ligandos naturales, así como fármacos utilizados actualmente para cada receptor, este análisis fungirá como una herramienta clave para la selección de moléculas, entre aquellas previamente filtradas tras el análisis estadístico, capaces de funcionar como fármacos al interactuar con los residuos aminoacídicos clave tanto del receptor muscarínico M3 como PDE4.

2.1. Sobre M3

Primeramente, para el receptor muscarínico M3 se analizó las interacciones del ligando endógeno y sus fármacos inhibidores para usarlo de referencia para las moléculas propuestas, ya que de esta forma se puede observar aquellos residuos aminoacídicos que son clave en la correcta función del receptor.

Como se puede observar en la (Figura 43) así como en la Tabla 17, la ACh que es el ligando endógeno, así como será la principal referencia para los análisis de las moléculas posteriores, presenta 9 interacciones (PHE A:239, TYR A:506, TYR A:148, CYS A:532, ASP A:147, TYR A:529, TYR A:533, TRP A:503, SER A:151) de las cuales se puede explicar la EA tan baja (-4.4), al ser solo TRP A:503 y SER A:151 interacciones por puente de hidrogeno, siendo las demás interacciones más débiles al ser fuerzas de van der Waals. Los fármacos que se usan actualmente para EPOC coinciden en sus interacciones al receptor endógeno, el número de interacciones para ipratropio (BIPR) que son iguales son 9 de 17 con una EA (-8.8), para tiotropio (BTIR) 3 de 16 con EA (-8.0) y finalmente para atropina (ATRP) 8 de 16 con una EA (-8.8). De lo anterior se ve reflejado que el número de interacciones es proporcional a una mayor EA, pero donde como el caso de BIPR y ATRP que poseen la misma EA, pero distintos números de interacciones dejando en claro también que el tipo de interacción importa. Pero de manera más importante, se puede inferir que todos los fármacos funcionan de manera correcta al ocupar el espacio de unión del ligando endógeno al tener en el caso de BIPR 9 interacciones de las 9 de ACh, en el caso de ATRP 8/9 y finalmente BTIR 3/9, pero en este último caso además de compartir solo esas 3 interacciones, cabe señalar que presenta una señal de repulsión que propició un puntaje inferior comparado con los otros fármacos.

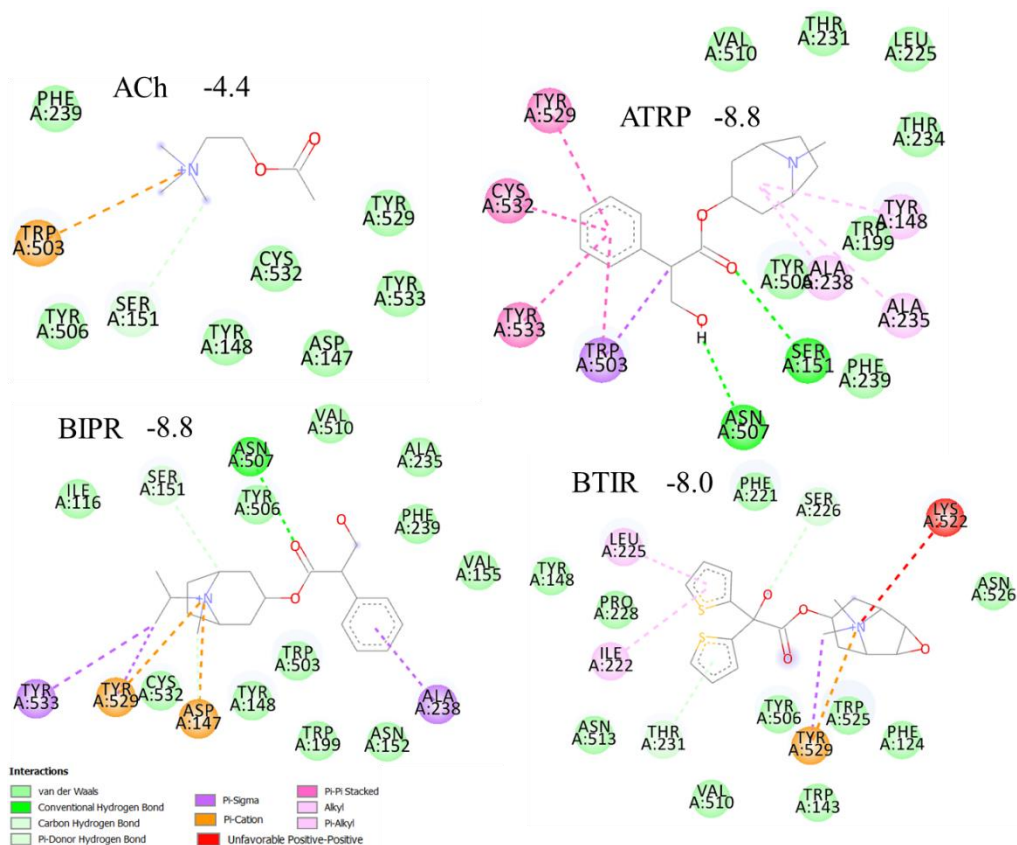


Figura 43. Diagramas de interacción ligando endógeno y fármacos con M3

Con respecto a los derivados de diosgenina (AD2, AD04, AD06, AD08, AD09, AD10 y AD12) con el receptor M3, cabe señalar que todas superaron la EA tanto del ligando endógeno como de los fármacos. Lo anterior se explica si se observa individualmente cada diagrama de interacción, que es necesario mencionar que se omitió el diagrama de AD10 ya que presenta una gran homología en sus interacciones con el resto de moléculas, así como mencionar que en el caso de AD09 se utilizó como un control al no poseer el grupo protector ftalamidato para analizar como este factor cambia sus interacciones, de esta forma comprobando el porqué de una de las dudas que existió en los estadísticos realizados que terminó con la conclusión de que sí existe una diferencia en la presencia del grupo protector.

De esta manera, como se observa en la Figura 44, así como en la Tabla 17, para el caso de AD02 comparte con la ACh 3 interacciones de 12 totales que posee, AD04 presenta 3/15, AD06 con 3/18, AD08 tiene 3/18, AD09 3/17, AD10 3/15 y finalmente AD12 con 3/18. De lo anterior, se puede inferir que efectivamente todas las moléculas se acoplan en el sitio activo del receptor M3 al presentar interacciones con algunos residuos aminoacídicos que la ACh también posee, pero para el caso de AD02, AD04, AD08 y AD12, 3 de 3 interacciones que presentan son puentes de hidrógeno. Además, algo que es notable es la importancia del grupo ftalamidato en aquellas que lo poseen, al tener entre 3 a 5 interacciones por puente de hidrogeno con residuos aminoacídicos, incluso estos residuos son aquellos que comparte con

la ACh y que en todos de los casos poseen la misma interacción entre el grupo protector y TYR A:529.

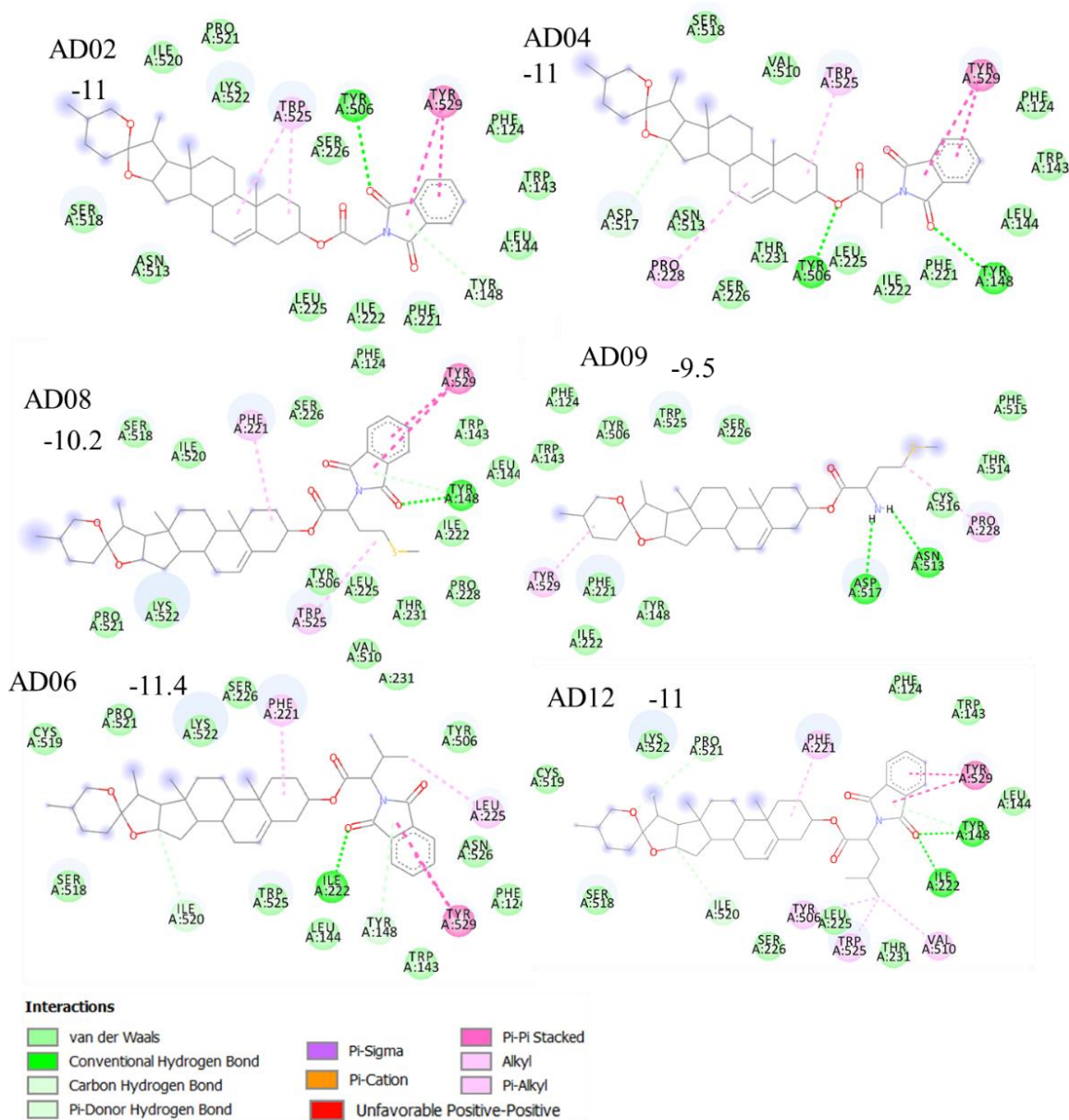


Figura 44. Diagramas de interacciones de derivados de diosgenina con el receptor M3.

Así mismo, con respecto a los derivados de laxogenina (AL2, AL04, AL05, AL06, AL08, AL10 y AL12) con el receptor M3, cabe señalar que todas superaron la EA tanto del ligando endógeno como de los fármacos. Lo anterior se explica si se observa individualmente cada diagrama de interacción, que es necesario mencionar que se omitió el diagrama de AL10 ya que presenta una gran homología en sus interacciones con el resto de moléculas, así como mencionar que en el caso de AL05 se utilizó como un control al no poseer el grupo protector ftalamidato para analizar como este factor cambia sus interacciones, de esta forma

comprobando el porqué de una de las dudas que existió en los estadísticos realizados que terminó con la conclusión de que sí existe una diferencia en la presencia del grupo protector.

De esta manera, como se observa en la Figura 45, así como en la Tabla 17, para el caso de AL02 comparte con la ACh 3 interacciones de 16 totales que posee, AL04 presenta 3/18, AL05 2/17, AL06 con 3/17, AL08 tiene 3/17, AL10 3/17 y finalmente AL12 con 5/18. De lo anterior, se puede inferir que efectivamente todas las moléculas se acoplan en el sitio activo del receptor M3 al presentar interacciones con algunos residuos aminoacídicos que la ACh también posee, pero para el caso de AL02, AL04, AL06, AL08, AL 10 y AL12, 3 de 3 interacciones que presentan son puentes de hidrógeno, agregando que para AL12 presentó 5 interacciones siendo TRP A:503 una destacable al ser uno de los puentes de hidrogeno con los que la ACh se une con M3, siendo la única molécula de las evaluadas que realizó esta interacción aunque cabe señalar fue por fuerzas de Van der Waals. Además, algo que es notable es la importancia del grupo ftalamidato en aquellas que lo poseen, al tener entre 3 a 5 interacciones por puente de hidrogeno con residuos aminoacídicos, incluso estos residuos son aquellos que comparte con la ACh y que en mayoría de los casos poseen la misma interacción entre el grupo protector y TYR A:529, con excepción de AL12 que, aunque sí presento la interacción, fue el aminoácido presente el que la realizó y no su grupo protector.

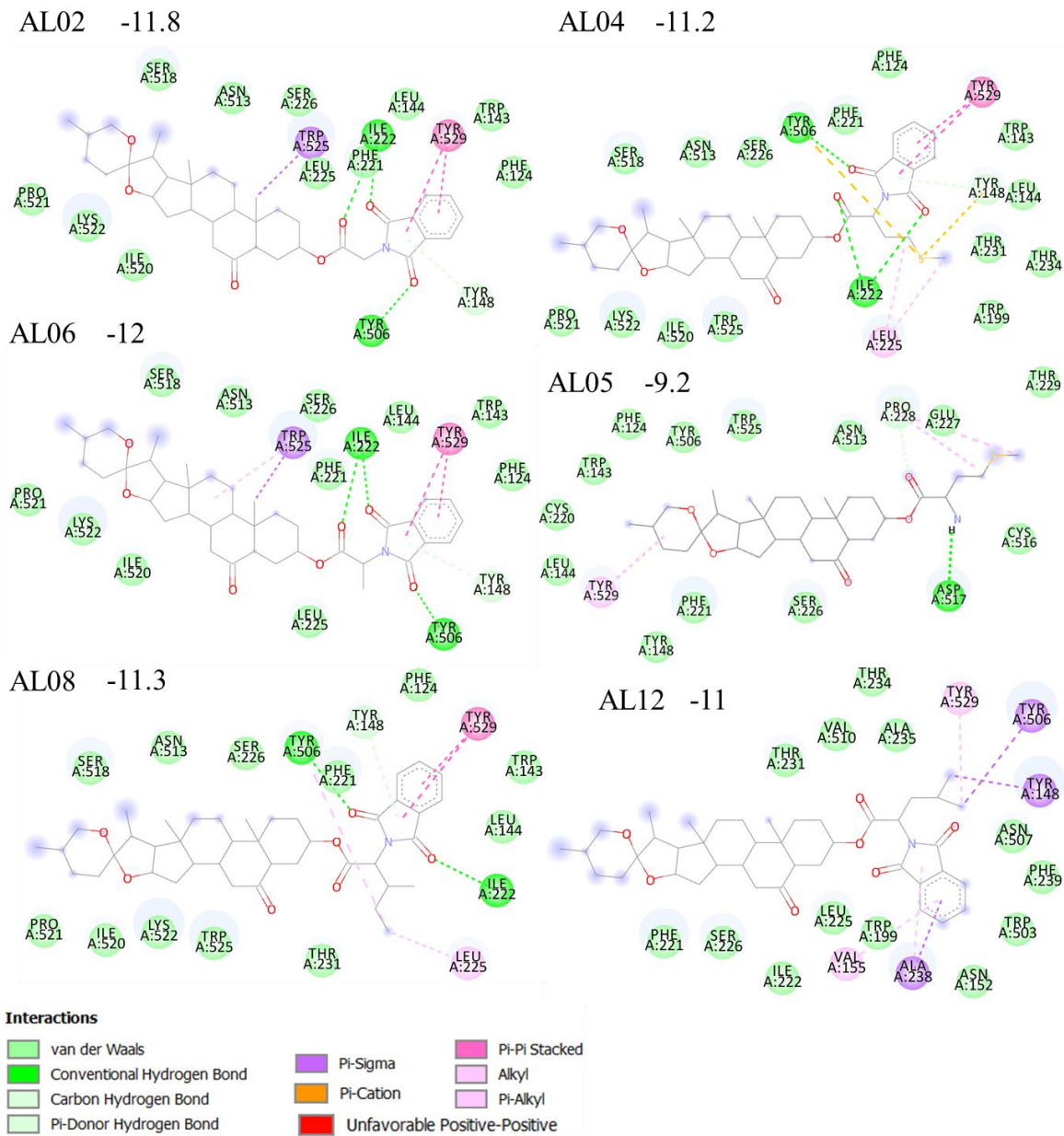


Figura 45. Diagramas de interacciones de derivados de laxogenina con el receptor M3

Tabla 17. Interacción de los residuos aminoacídicos del receptor M3 con ligando endógeno, fármacos y moléculas propuestas

Compuesto (EA,kcal/mol)	Van der Walls, interacciones PI	Puente de hidrogeno	Otros
ACh (-4.4)	PHE A:239, TYR A:506, TYR A:148, CYS A:532, ASP A:147, TYR A:529, TYR A:533, TRP A:503, SER A:151		

BIPR (-8.8)	CYS A:532, TYR A:148, TRP A:503, TRP A:199, ASN A:152, VAL A:155, PHE A:239, ALA A:235, VAL A:510, TYR A:506, SER A:151, ILE A:116, TYR A:533, ALA A:238, TYR A:529	ASN A:507	ASP A:147
BTIR (-8)	TYR A:148, PRO A:228, ASN A:513, VAL A:510, TYR A:506, TRP A:143, TRP A:525, PHE A:124, ASN A:526, PHE A:221, LEU A:225, ILE A:222, THR A:231, SER A:226, TYR A:529		LYS A:522
ATRP (-8.8)	PHE A:239, TYR A:506, TRP A:199, THR A:234, LEU A:225, THR A:231, VAL A:510, TRP A:503, TYR A:148, TYR A:529, CYS A:532, TYR A:533	ASN A:507, SER A:151	ALA A:235, ALA A:238,
AD02 (-11)	PRO A:521, ILE A:520, LYS A:522, SER A:518, ASN A:513, SER A:226, LEU A:225, ILE A:222, PHE A:221, TRP A:525, TYR A:529, TYR A:148	TYR A:506	
AD04 (-11)	SER A:518, VAL A:510, ASN A:513, SER A:226, THR A:231, LEU A:225, ILE A:222, PHE A:221, LEU A:144, TRP A:143, PHE A:124, TRP A:525, TYR A:529	TYR A:506, TYR A:148	PRO A:228
AD06 (-11.4)	CYS A:519, SER A:518, PRO A:521, LYS A:522, ILE A:520, SER A:226, TRP A:525, LEU A:144, TYR A:148, TRP A:143, ASN A:526, PHE A:124, TYR A:506, THR A:231, TYR A:529, PHE A:221	ILE A:222	LEU A:225
AD08 (-10.2)	PRO A:521, LYS A:522, TYR A:506, LEU A:225, VAL A:510, THR A:231, PRO A:228, ILE A:222, LEU A:144, TRP A:143, PHE A:124, SER A:226, ILE A:520, SER A:518, TYR A:529, TRP A:525, PHE A:221	TYR A:148	
AD09 (-9.5)	LEU A:144, PHE A:221, ILE A:222, TYR A:148, CYS A:516, THR A:514, PHE A:515, SER A:226, TRP A:525, TYR A:506, PHE A:124, TRP A:143, CYS A:220, TYR A:529	ASP A:517, ASN A:513	PRO A:228

AD10 (-10.7)	PRO A:521, LYS A:522, TRP A:525, TYR A:506 , ASN A:526, PHE A:124, TYR A:148 , ILE A:222, THR A:231, SER A:226, ILE A:520, SER A:518, TYR A:529 , PHE A:221		LEU A:225
AD12 (-11)	SER A:518, ILE A:520, SER A:226, LEU A:225, THR A:231, LEU A:144, TRP A:143, PHE A:124, PRO A:521, LYS A:522, CYS A:519, TYR A:529 , TYR A:506 , TRP A:525, PHE A:221	TYR A:148 , ILE A:222	VAL A:510
AL02 (-11.8)	PRO A:521, LYS A:522, ILE A:520, TYR A:148 , PHE A:124, TRP A:143, LEU A:144, PHE A:221, LEU A:225, SER A:226, ASN A:513, SER A:518, TYR A:529 , TRP A:525	TYR A:506 , ILE A:222	
AL04 (-11.2)	PRO A:521, LYS A:522, ILE A:520, TRP A:525, TRP A:199, THR A:231, THR A:234, LEU A:144, TYR A:148 , TRP A:143, PHE A:124, PHE A:221, SER A:226, ASN A:513, SER A:518, TYR A:529	ILE A:222, TYR A:506	LEU A:225, TYR A:148 , TYR A:506
AL05 (-9.2)	TYR A:148 , PHE A:221, SER A:226, CYS A:516, THR A:229, GLU A:227, ASN A:513, TRP A:525, TYR A:506 , PHE A:124, TRP A:143, CYS A:220, LEU A:144, PRO A:228	ASP A:517	PRO A:228
AL06 (-12)	PRO A:521, LYS A:522, ILE A:520, LEU A:225, TYR A:148 , PHE A:124, TRP A:143, LEU A:144, PHE A:221, SER A:226, ASN A:513, SER A:518, TYR A:529 , TRP A:525	TYR A:506 , ILE A:222	
AL08 (-11.3)	PRO A:521, ILE A:520, LYS A:522, TRP A:525, THR A:231, LEU A:144, TRP A:143, PHE A:124, TYR A:148 , PHE A:221, SER A:226, ASN A:513, SER A:518, TYR A:529 , TYR A:506	TYR A:506 , ILE A:222	LEU A:225
AL10 (-11.6)	PRO A:521, LYS A:522, ILE A:520, TRP A:525, LEU A:225, THR A:231, LEU A:144, TRP A:143, PHE A:124, TYR	TYR A:506 , ILE A:222	

	A:148 , PHE A:221, SER A:226, ASN A:513, SER A:518, TYR A:529		
AL12 (-11)	PHE A:221, SER A:226, ILE A:222, LEU A:225, TRP A:199, ASN A:152, TRP A:503 , PHE A:239 , ASN A:507, ALA A:235, THR A:234, VAL A:510, THR A:231, ALA A:238, TYR A:148 , TYR A:506 , VAL A:155, TYR A:529		

Finalmente, al analizar las interacciones se llegó a la conclusión que los candidatos idóneos para el bloqueo del receptor M3 son con respecto a derivados de diosgenina AD06 y AD12, y de aquellos derivados de laxogenina AL06 y AL12. Esta decisión se tomó debido que para los derivados de diosgenina AD06 obtuvo el mejor puntaje de EA (-11.4), en cambio AD12 tuvo un empate en cuanto a su EA (-11), pero su elección fue debido a 2 factores, primero que presentó 8 interacciones por puente de hidrógeno, además que, de la misma forma que AD06, presentó 3 interacciones con los mismos residuos aminoacídicos que la ACh en el sitio de acoplamiento. Para el caso de los derivados de laxogenina, en el caso de AL06 obtuvo el mejor puntaje de EA (-12), por otro lado, para AL12 aunque no tuvo una EA de las más altas (-11), presentó una interacción interesante con TRP A:503, aunque fue de van der Waals, única entre todas las moléculas de estudio con el receptor muscarínico M3, además de que su EA es aceptable al ser superior que los fármacos e igual que la que presenta la selección de AD12.

2.2. Sobre PDE4A

Posteriormente, para PDE4A se analizó las interacciones del ligando endógeno y sus fármacos inhibidores para usarlo de referencia para las moléculas propuestas, ya que de esta forma se puede observar aquellos residuos aminoacídicos que son clave en la correcta función del receptor.

Como se puede observar en la Figura 46, así como en la Tabla 18, el cAMP que es el ligando endógeno, será la principal referencia para los análisis de las moléculas posteriores, y esta presenta 18 interacciones (HIS A:412, ZN A:1, HIS A:376, HIS A:416, PHE A:552, ASN A:533, TRP A:544, TYR A:371, LEU A:531, MET A:485, THR A:483, ILE A:548, HIS A:372, GLN A:581, MG A:2, ASP A:530, ASP A:413, GLU A:442) de las cuales se puede explicar la EA resultante del docking (-9), cabe destacar que GLU A:442, ASP A:413, ASP A:530, HIS A:372, ILE A:548 y GLN A:581, fueron interacciones por puente de hidrogeno, siendo las demás interacciones más débiles al ser fuerzas de van der Waals, además cabe resaltar la interacción con MG A:2 al ser fundamental para la catálisis de cAMP. Los

fármacos que se usan actualmente para EPOC, en el caso de RFLT no coincidieron en sus interacciones al receptor endógeno esto puede deberse a que haga una inhibición alostérica con una EA de 8.5, y para el caso de CLMT presentó 9 interacciones con los mismos residuos aminoacídicos de 15 interacciones totales con una EA de -9.3, pero cabe señalar que no presento la interacción con el ion Mg. De lo anterior se ve reflejado que el número de interacciones es proporcional a una mayor EA, pero donde como el caso de CLMT que posee una EA ligeramente superior, pero menor número de interacciones que el ligando endógeno, deja en claro también que el tipo de interacción importa.

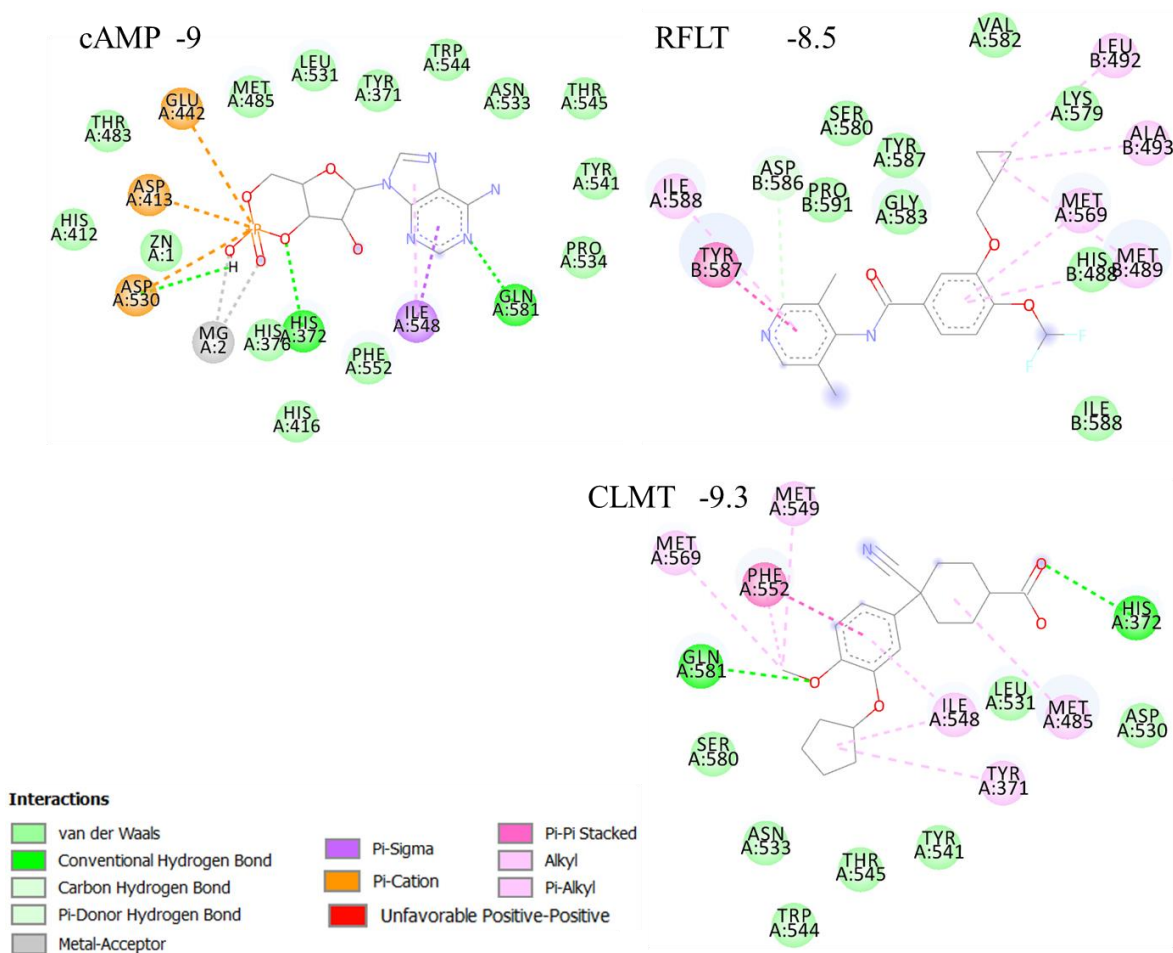


Figura 46. Diagramas de interacciones ligando endógeno y fármacos con PDE4A.

Con respecto a los derivados de diosgenina (AD2, AD04, AD06, AD08, AD09, AD10 y AD12) con PDE4, cabe señalar que todas superaron la EA tanto del ligando endógeno como de los fármacos. Lo anterior se explica si se observa individualmente cada diagrama de interacción, que es necesario mencionar que se omitió el diagrama de AD10 ya que no presenta interacciones homologas al cAMP, así como mencionar que en el caso de AD09 se utilizó como un control al no poseer el grupo protector ftalamidato para analizar como este factor cambia sus interacciones, de esta forma comprobando el porqué de una de las dudas que existió en los estadísticos realizados que terminó con la conclusión de que sí existe una diferencia en la EA con la presencia del grupo protector.

De esta manera, como se observa en la Figura 47, así como en la Tabla 18, para el caso de AD02 comparte con el cAMP 6 interacciones de 18 totales que posee, AD04 presenta 7/21, AD06 con 12/29, AD08 tiene 8/22, AD09 14/25, AD10 0/21 y finalmente AD12 con 11/24. De lo anterior, se puede inferir que casi todas las moléculas se acoplan en el sitio activo de PDE4 al presentar interacciones con algunos residuos aminoacídicos que cAMP también posee, con excepción de AD10 que no tuvo ninguna. Además, para el caso de AD02, AD04, AD08 y AD12, el número de interacciones que presentan son mayores a 5 y corresponden a puentes de hidrógeno. Además, algo que es notable es la importancia del grupo ftalamidato en aquellas que lo poseen, al tener entre 4 a 6 interacciones por puente de hidrogeno con residuos aminoacídicos, siendo estos algunos con los que comparten con cAMP. Asimismo, AD06 y AD12 poseen interacción con MG A:2, pero solo AD06 es de tipo metal aceptor, mientras tanto AD12 es de tipo van der Waals

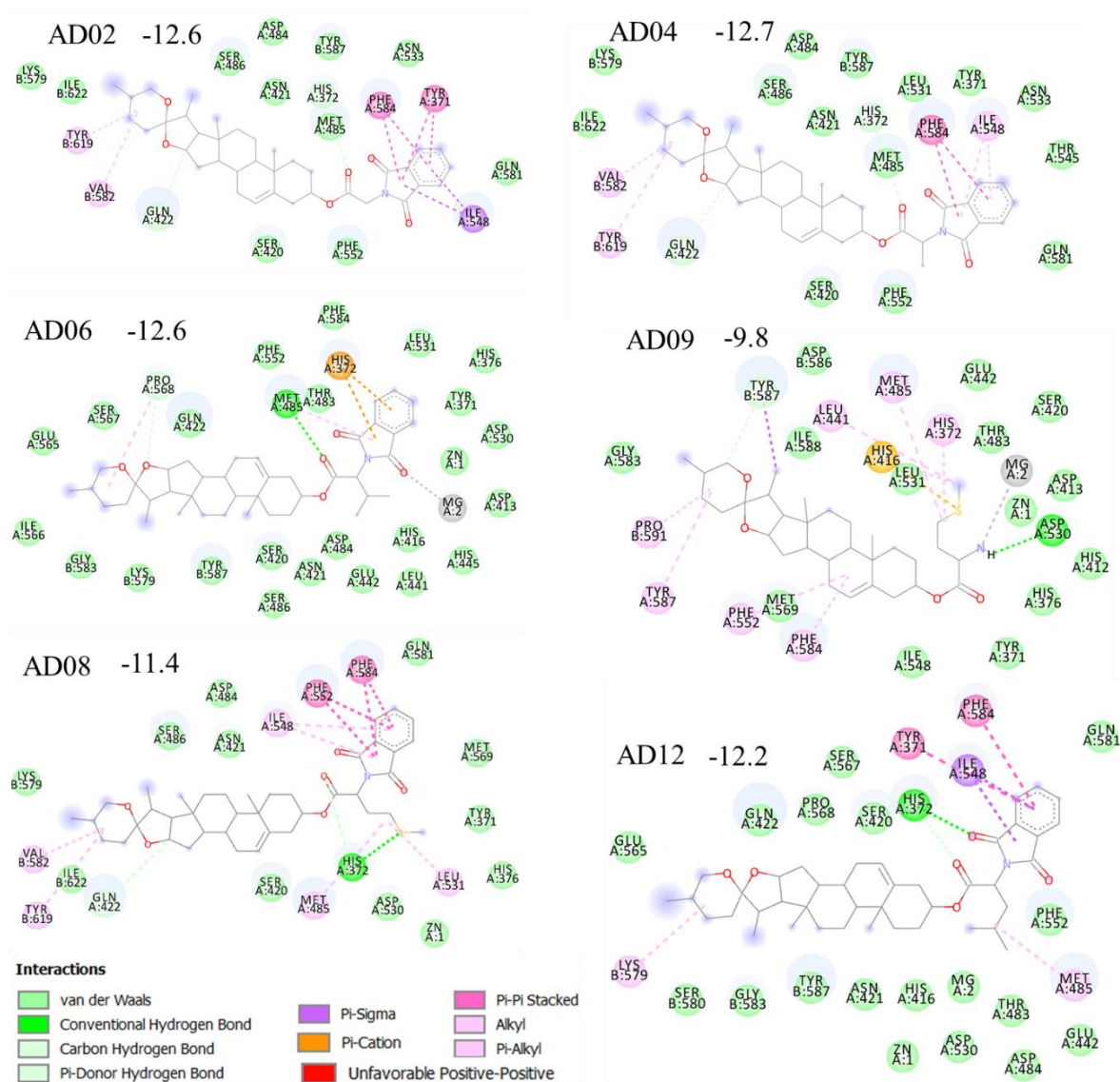


Figura 47. Diagrama de interacción de derivados de diosgenina con el receptor PDE4A

Así mismo, con respecto a los derivados de laxogenina (AL2, AL04, AL05, AL06, AL08, AL10 y AL12) con PDE4A, cabe señalar que todas superaron la EA tanto del ligando endógeno, así como de los fármacos. Lo anterior se explica si se observa individualmente cada diagrama de interacción, que es necesario mencionar que se omitió el diagrama de AL10 ya que presenta una gran homología en sus interacciones con el resto de moléculas, así como mencionar que en el caso de AL05 se utilizó como un control al no poseer el grupo protector ftalamidato para analizar como este factor cambia sus interacciones, de esta forma comprobando el porqué de una de las dudas que existió en los estadísticos realizados que terminó con la conclusión de que sí existe una diferencia en la presencia del grupo protector.

De esta manera, como se observa en la Figura 48, así como en la Tabla 18, para el caso de AL02 comparte con la cAMP 13 interacciones de 28 totales que posee, AL04 presenta 12/30, AL05 12/27, AL06 con 13/28, AL08 tiene 12/28, AL10 7/19 y finalmente AL12 con 10/24. De lo anterior, se puede inferir que efectivamente todas las moléculas se acoplan en el sitio activo de PDE4A al presentar interacciones con algunos residuos aminoacídicos que la cAMP también posee. Además, para el caso de AL02, AL04, AL06, AL08 y AD12, el número de interacciones que presentan son mayores a 3 y corresponden a puentes de hidrógeno. Además, algo que es notable es la importancia del grupo ftalamidato en aquellas que lo poseen, al tener entre 2 a 5 interacciones por puente de hidrogeno con residuos aminoacídicos, siendo estos algunos con los que comparten con cAMP. Asimismo, AL02, AL04, AL06 y AL08 poseen interacción metal acceptor con MG A:2.

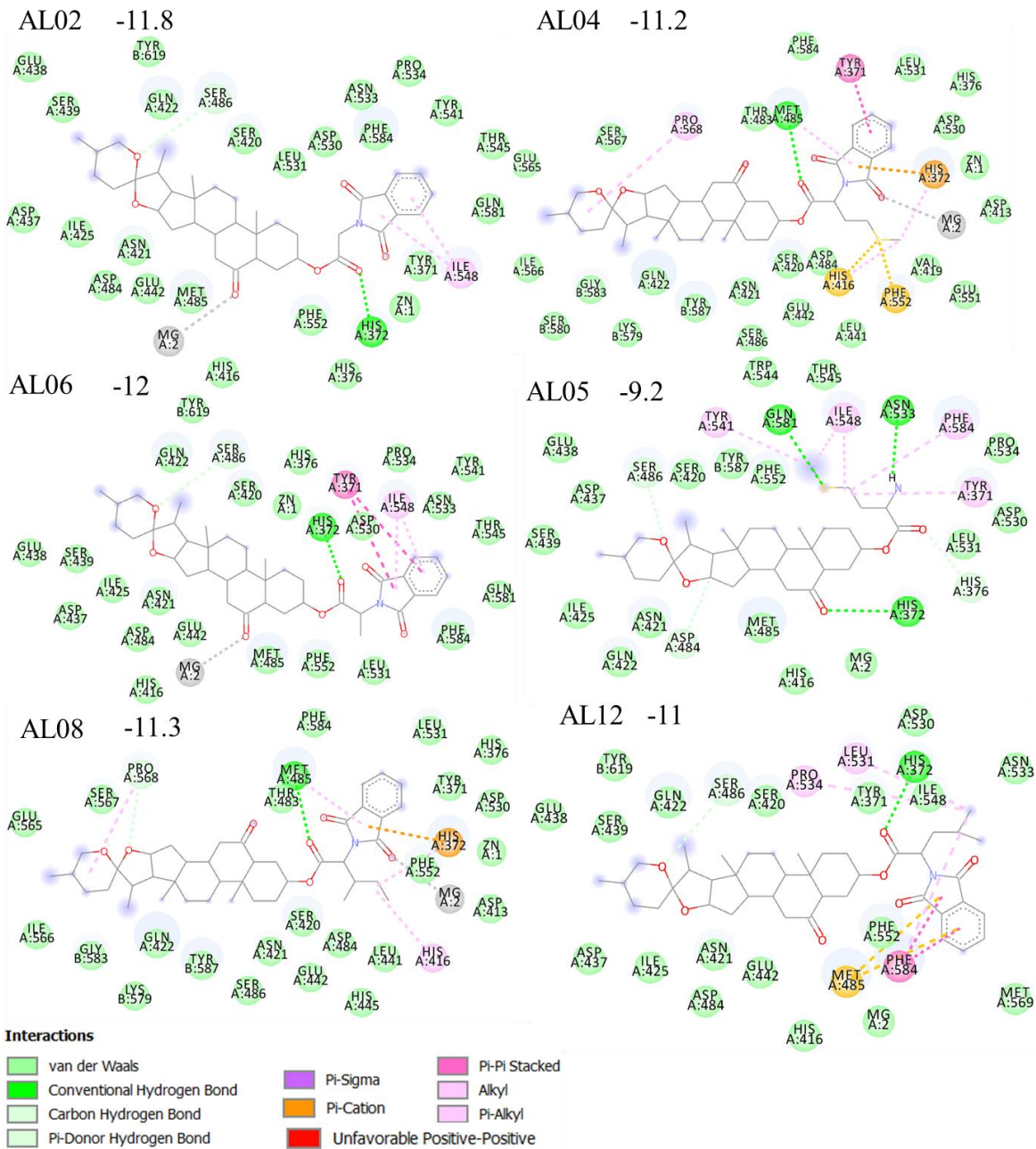


Figura 48. Diagramas de interacción de derivados de laxogenina con PDE4A

Tabla 18. Interacciones de los residuos aminoacídicos del receptor PDE4A con ligando endógeno, fármacos y moléculas propuestas

Compuesto (EA, kcal/mol)	Van der Waals y carbono PI	Puente de hidrogeno	Otros
cAMP (-9)	HIS A:412, ZN A:1, HIS A:376, HIS A:416, PHE A:552, ASN A:533, TRP	HIS A:372, GLN A:581	MG A:2, ASP

	A:544, TYR A:371, LEU A:531, MET A:485, THR A:483, ILE A:548		A:530, ASP A:413, GLU A:442
RFLT (-8.5)	ILE B:588, HIS B:488, LYS A:579, VAL A:582, TYR A:587, GLY A:583, SER A:580, PRO B:591, ASP B:586, TYR B:587, MET:489, MET A:569,		ILE A:588, MET B:489, ALA B:493, LEU B:492
CLMT (-9.3)	SER A:580, ASN A:533, TRP A:544, THR A:545, TYR A:541, LEU A:531, ASP A:530, PHE A:552, TYR A:371, ILE A:548,	GLN A:581, HIS A:372	MET A:485, MET A:549, MET A:569
AD02 (-12.6)	GLN A:422, SER A:420, PHE A:552, GLN A:582, ASN A:533, MET A:485, HIS A:372, TYR B:587, ASN A:421, ASP A:484, SER A:486, ILE B:622, LYS B:579, ILE A:548, TYR A:371, PHE A:582, TYR B:619		VAL B:582
AD04 (-12.7)	GLN A:422, SER A:420, PHE A:552, GLN A:581, THR A:545, ASN A:533, TYR A:371, LEU A:531, MET A:485, HIS A:372, TYR B:587, ASN A:421, ASN A:421, ASP A:484, SER A:486, LYS B:579, ILE B:622, PHE A:584, ILE A:548		VAL B:582, TYR B:619
AD06 (-12.6)	ILE A:566, GLY B:583, LYS B:579, TYR B:587, SER A:420, SER A:486, ASN A:421, ASP A:484, GLU A:442, LEU A:441, HIS A:416, HIS A:445, ASP A:413, ASP A:530, TYR A:371, HIS A:376, LEU A:531, PHE A:584, THR A:483, PHE A:552, GLN A:422, PRO A:568, SER A:567, GLU A:565, HIS A:372, ZN A:1	MET A:485	MG A:2, PRO A:568

AD08 (11.4)	LYS B:579, ILE B:622, GLN A:422, SER A:420, ASP A:530, HIS A:376, ZN A:1, TYR A:371 , MET A:569, GLN A:581 , ASN A:421, ASP A:484, SER A:486, PHE A:552 , PHE A:584, TYR B:619, ILE A:548	HIS A:373	VAL B:582, MET A:485 , LEU A:531,
AD09 (-9.8)	GLY A:583, MET A:569, ILE A:548, TYR A:371, HIS A:376, HIS A:412, ZN A:1, ASP A:413, SER A:410, THR A:483, GLU A:442 , LEU A:531, ASP B:586, ILE A:588, TYR B:587, TYR A:587, PHE A:552 , PHE A:584, HIS A:372 ,	ASP A:530	HIS A:416, MG A:2 , PRO B:591, MET A:485 , LEU A:441,
AD10 (-12.3)	ALA A:575, THR A:574, PRO B:568, SER A:567, SER B:580, GLU A:565, ASN A:426, GLN A:422, TYR B:619, GLY B:583, PRO A:568, ILE A:566, TYR B:587, ILE B:588, MET A:569, SER B:486, LYS B:579, VAL B:582, ILE B:622,		MET B:489, MET B:569
AD12 (-12.2)	SER B:580, GLY B:583, TYR B:587, ASN A:421, HIS A:416, ZN A:1, ASP A:530, MG A:2, THR A:483 , ASP A:484, GLU A:442, PHE A:552 , GLN A:481, SER A:420, SER A:567, PRO A:568, GLN A:422, GLU A:565, ILE A:548 , PHE A:584, TYR A:371	HIS A:372	LYS B:579, MET A:485
AL02 (-13.1)	ASP A:437, ILE A:425, ASN A:421, ASP A:484, GLU A:442, MET A:485, HIS A:416, PHE A:552, HIS A:376, ZN A:1, TYR A:371, GLN A:581 , THR A:545, TYR A:541, PRO A:534, ASN A:533 , PHE A:584, ASP A:530 , LEU A:531, SER A:420, SER A:486, GLN A:422, TYR B:619, SER A:439, GLU A:438, ILE A:548	HIS A:372	MG A:2
AL04 (-11.9)	ILE A:566, SER B:580, GLY B:583, LYS B:579, GLN A:422, TYR B:587, ASN	MET A:485	HIS A:416 ,

	A:421, SER A:486, SER A:420, GLU A:442 , ASP A:484, LEU A:441, VAL A:419, GLU A:551, ASP A:413 , ZN A:1 , ASP A:530 , HIS A:376 , LEU A:531, PHE A:584, THR A:483 , SER A:567, GLU A:565, TYR A:371		PHE A:552 , HIS A:372 , MG A:2 , PRO A:568
AL05 (-10.8)	ILE A:425, ASN A:421, GLN A:422, ASP A:484, MET A:485 , HIS A:416 , MG A:2 , HIS A:376 , LEU A:531, ASP A:530 , PRO A:534, THR A:545, TRP A:544 , PHE A:552 , TYR B:587, SER A:420, SER A:486, ASP A:437, GLU A:438, SER A:439, TYR A:371 , PHE A:584, TYR A:541	HIS A:372 , ASN A:533 , GLN A:581	ILE A:548 ,
AL06 (-13.4)	GLU A:438, SER A:439, ASP A:437, ILE A:425, ASN A:421, ASP A:484, GLU A:442 , HIS A:416 , MET A:485 , PHE A:552 , LEU A:531, PHE A:584, GLN A:581 , THR A:545, ASN A:533 , TYR A:541, PRO A:534, ASP A:530 , HIS A:376 , ZN A:1 , SER A:420, SER A:486, TYR B:619, GLN A:422, TYR A:371 , ILE A:548	HIS A:372	MG A:2
AL08 (-12.5)	ILE A:566, GLY B:583, GLN A:422, LYS B:579, TYR B:587, SER A:486, ASN A:421, SER A:420, GLU A:442 , ASP A:484, HIS A:445, LEU A:441, ASP A:413 , PHE A:552 , ZN A:1 , ASP A:530 , TYR A:371 , HIS A:376 , LEU A:531, PHE A:584, THR A:483 , SER A:567, GLU A:565, HIS A:416	MET A:485	MG A:2 , HIS A:372 , PRO A:568
AL10 (-12.4)	GLN A:581 , MET A:569, LEU A:531, MET A:485 , MG A:2 , TYR B:587, GLN A:422, GLU A:565, SER B:580, GLY B:583, SER A:567, PRO A:568, TYR A:371 , SER A:420, HIS A:372 , PHE A:552 , PHE A:584, ILE A:548		LYS B:579
AL12 (-12.5)	ASP A:437, ILE A:425, ASN A:421, ASP A:484, GLU A:442 , HIS A:416 , MG A:2 ,	HIS A:372	MET A:485 ,

PHE A:552, MET A:569, ASN A:533, ILE A:548, ASP A:530, TYR A:371, SER A:420, SER A:486, GLN A:422, TYR B:619, SER A:439, GLU A:438, PHE A:584	LEU A:531, PRO A:534
--	-----------------------------

Finalmente, al analizar las interacciones se llegó a la conclusión que los candidatos idóneos para el bloqueo de PDE4A con respecto a derivados de diosgenina son AD06 y AD12, y de aquellos derivados de laxogenina AL06 y AL08. Esta decisión se tomó debido que para los derivados de diosgenina AD06 obtuvo un buen puntaje de EA (-12.6) además de poseer la interacción clave con el MG A:2 mediante interacción metal-aceptor, en cambio AD12 tuvo una EA (-12.2) siendo un buen puntaje, pero además solamente junto con AD06 presentó interacción con MG A:2 aunque cabe señalar que fue por fuerzas de van der Waals. Para el caso de los derivados de laxogenina, en el caso de AL06 obtuvo el mejor puntaje de EA (-13.4) así como presenta interacción con MG A:2, por otro lado, para AL08, aunque tuvo un empate en su EA (-12.5), presentó una interacción metal-aceptor con MG A:2, además sus interacciones con los residuos aminoácidos son 12, colocándola como una mejor opción.

Por ende, las moléculas que presentan mejores características con respecto al análisis de sus interacciones para ambas proteínas son AD06, AD12, AL06, AL08 y AL12.

Al comparar proteínas se había observado un efecto mayor PDE4 al eliminar estructuras dado su nivel interacción se queda con 3 grupo, aquellos específicos para PDE4, los específicos para M3 y finalmente los que tienen potencial en ambas dianas.

3. Análisis ADME y toxicológico

En análisis ADME permite analizar las características fisicoquímicas que posee una molécula para elucidar su posible comportamiento como fármaco al compararlo con propiedades fisicoquímicas de fármacos en una base de datos, dando información como su solubilidad, lipofiliidad, si es inhibidor de algún citocromo, su absorción gastro intestinal, si es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, así como algunos parámetros empíricos tal como el parámetro de Limpinski. Este proceso se realizó en la plataforma gratuita SwissADME y cuyos resultados se pueden encontrar en la Tabla 19.

Con respecto al peso molecular (PM), tal como se aprecia en la Tabla 19, las moléculas candidatas presentaron una diferencia de más de 240 g/mol con respecto a los ligandos endógenos, así como fármacos, observándose una diferencia notable que es debido a su origen natural de los compuestos propuestos como posibles fármacos, tal como se puede apreciar en la Figura 49.

Sobre la característica TPSA todas las moléculas están dentro del rango aceptable que corresponde entre 20 a 130 Å², con excepción de cAMP que obtuvo un puntaje de 164.65 Å², esto se puede observar de mejor manera en la Figura 49.

Referente a la lipofiliidad, las moléculas candidatas presentaron un gran puntaje con respecto a los ligandos endógenos, así como los fármacos, que con excepción de ACh, todos se encontraban en la zona aceptable como se aprecia en la Figura 49, pero cabe mencionar que esto no es un aspecto negativo, ya que pensando en hacer un fármaco de inhalación uno de los requisitos deseables es que la molécula presente una lipofiliidad alta ya que de esta manera se puede aglomerar en las mucosas pulmonares sirviendo de reservorio para una liberación prolongada así como menor necesidad de una alta dosificación.

En cuanto a la solubilidad, las moléculas candidatas a fármaco presentaron una muy baja, a diferencia de los ligandos endógenos y fármacos que todos presentaron una solubilidad dentro de los rangos aceptable (zona roja) como se observa en la Figura 49.

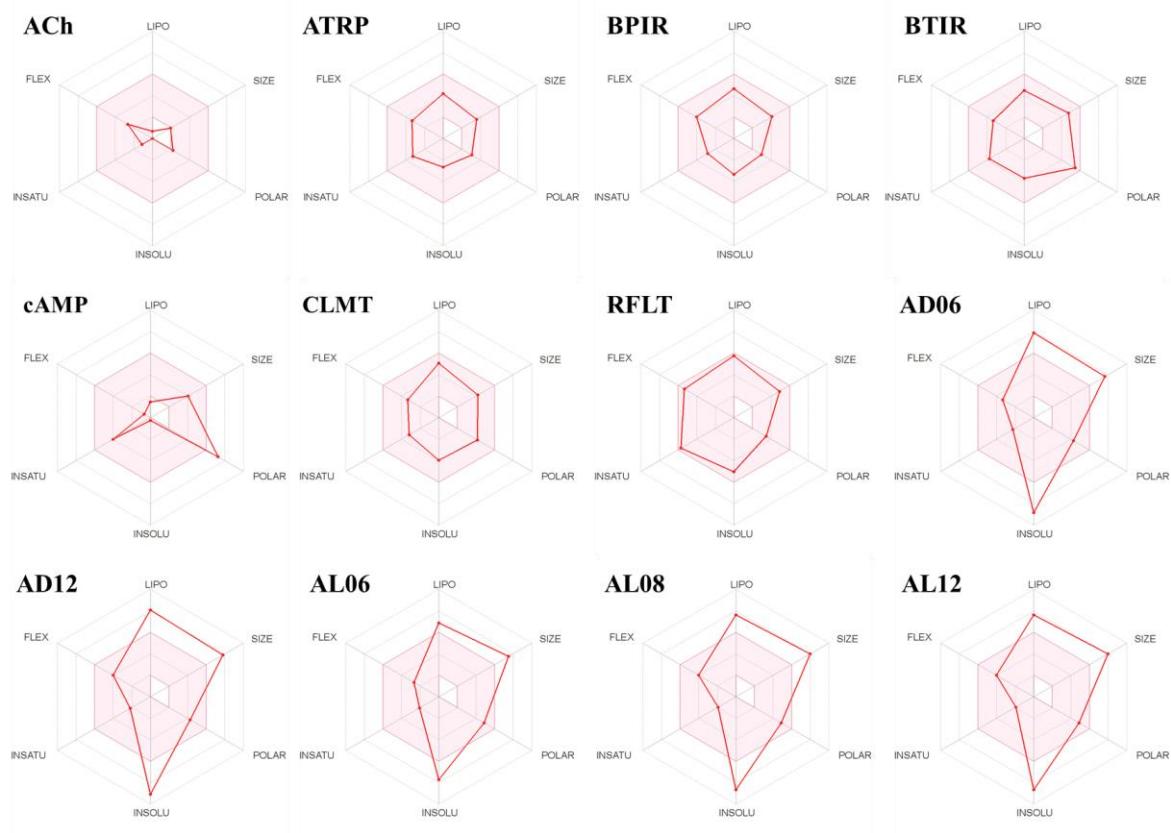


Figura 49. Diagramas propiedades fisicoquímicas por SwissADME.

Con relación a las propiedades farmacocinéticas, las moléculas de estudio presentaron una baja absorción gastrointestinal, así como no atraviesan barra hematoencefálica, siendo esto último importante debido a la presencia de M3 en cerebro. Además, son sustratos para la glucoproteína-P al igual que la ACh, BTIR, BPIR y CLMT. Cabe destacar que ninguna

molécula parte del estudio tuvo coincidencia con ser sustrato para algún citocromo a diferencia de fármacos como BTIR, ATRP, RFLT y CLMT (Tabla 19).

Tabla 19. Resultados SwissADME de ligandos endógenos, fármacos y moléculas candidatos a fármaco

Propiedad	ACh	BTIR	BIPR	ATRP	CAMP	RFLT	CLMT	AD06	AD012	AL06	AL08	AL12
PM (g/mol)	146.21	392.51	332.46	289.37	329.21	403.21	343.42	643.85	657.88	63.8	673.88	673.88
TPSA (Å ²)	26.30	115.54	46.53	49.77	164.65	60.45	79.55	82.14	82.14	99.21	99.21	99.21
Lipofiliidad (MLOGP)	-2.25	-2.19	-0.97	2.02	-1.9	2.84	2.34	5.65	5.82	4.52	5.03	5.03
Solubilidad (ESOL)	2.23	-3.71	-3.36	-2.67	-0.25	-5.04	-3.95	-8.83	-9.08	-7.72	-8.67	-8.67
Absorción GI	Alta	Alta	Alta	Alta	Baja	Alta	Alta	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja
Permeable barrera hematoencefálica	No	No	Sí	Sí	No	No	No	No	No	No	No	No
Sustrato P-gp	Sí	Sí	Sí	No	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Inhibidor CYP	No	CYP 2C19	No	CYP 2D6	No	CYP 1A2, 2C19, 2D6, 3A4	CYP 2C9, 2D6, 3A4	No	No	No	No	No
Lipinski	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No, 2	No, 2	No, 2	No, 2	No, 2
Ghose	No, 2	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No, 3	No, 3	No, 3	No, 3	No, 3
Veber	Sí	Sí	Sí	Sí	No, 1	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Egan	Sí	Sí	Sí	Sí	No, 1	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Muegge	No, 1	Sí	Sí	Sí	No, 1	Sí	Sí	No, 2	No, 2	No, 2	No, 2	No, 2
Biodisponibilidad	0.55	0.55	0.55	0.55	0.11	0.55	0.56	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
PAINS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	No	0
Leadlikeness	No, 1	No, 1	Sí	Sí	Sí	No, 2	Sí	No, 1	No, 1	No, 1	No, 1	No, 1

Otra herramienta que brinda el análisis en SwissADME para observar de manera más visual es el diagrama de huevo hervido o boiled-egg en la Figura 50, debido a su semejanza con dicho producto. En dicho gráfico se compara la lipofilicidad vs TPSA, donde si entra en la zona amarilla indica que atraviesa barrera hematoencefálica, zona blanca denota que tiene una alta absorción gastrointestinal, por ultimo los círculos azules o rojos indica si es sustrato o no para la glucoproteína-P, respectivamente. Con apoyo del anterior, se puede observar que las moléculas de estudio están en una zona gris que indicaría no necesariamente que no funcionan como fármaco, sino que no poseen cualidades necesarias para ser un fármaco oral o que puedan funcionar en alguna diana que este ubicada en el cerebro, ambas cosas no son de consideración para el presente estudio debido a que se buscan fármacos de administración inhalatoria.

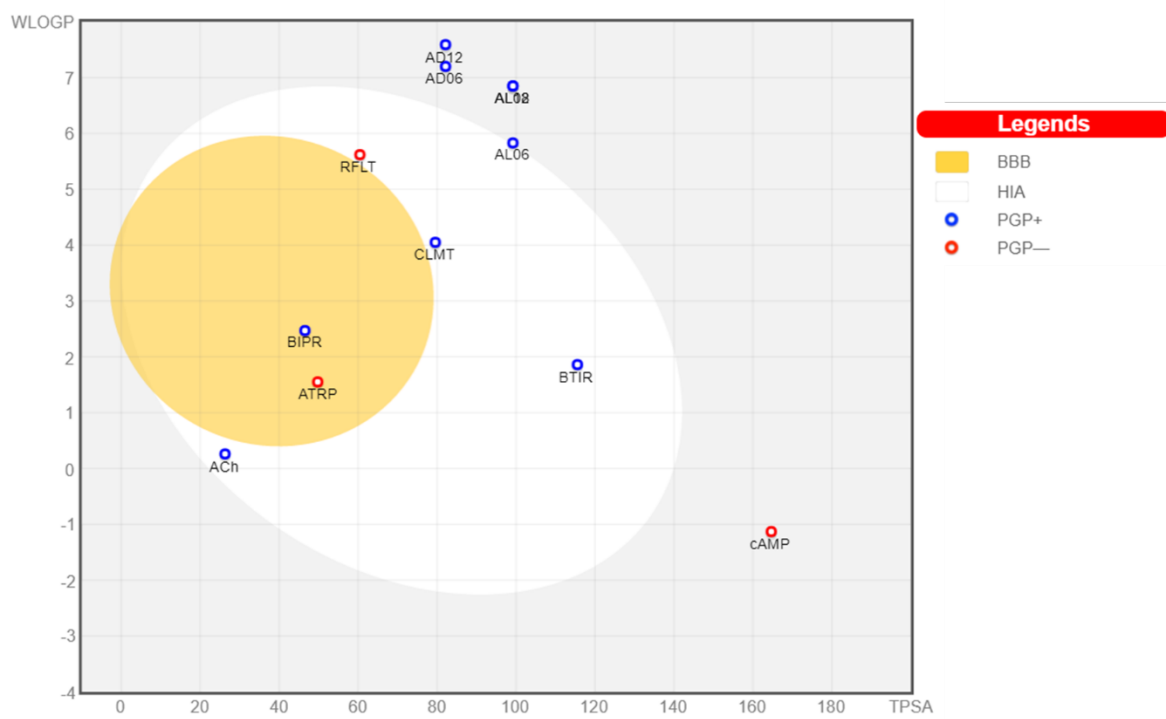


Figura 50. Diagrama BOILED-Egg de ligandos endógenos, fármacos y moléculas candidatas a fármaco

Toxicidad gastrointestinal	-	0.831	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dolor de cabeza	-	0.823	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Debilidad	-	0.819	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dolor	-	0.813	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taquicardia	-	0.797	0.747	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Debilidad muscular	-	0.789	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glaucoma	-	0.773	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disartria	-	0.778	0.772	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia	-	0.710	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conjuntivitis	-	0.707	0.853	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fallo respiratorio	-	-	0.832	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parálisis	-	-	0.819	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Teratógeno	-	-	0.772	-	0.705	-	-	-	-	-	-	-
Retención urinaria	-	-	0.771	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Delirio	-	-	0.767	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Embriotóxico	-	-	0.763	-	0.701	-	-	-	-	-	-	-
Queratopatía	-	-	0.737	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coma	-	-	0.726	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desmielinización	-	-	-	-	0.927	-	-	-	-	-	-	-

Citotóxico	-	-	-	-	0.78 5	-	-	-	-	-	-	-
Acidosis	-	-	-	-	0.70 6	-	-	-	-	-	-	-

Finalmente, después del análisis estadístico, interaccional y ADMET, se llegó a un reducido número de moléculas que son candidatos óptimos para fármacos contra EPOC, siendo AD06, AD12, AL06, AL08 y AL10.

CONCLUSIONES

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una enfermedad de gran importancia social por lo que es necesaria la continua investigación para su diagnóstico y tratamiento, cuyos tratamientos farmacológicos se centran en dos importantes aspectos, la broncodilatación y la disminución de la inflamación, siendo su tratamiento paralelo. Por esta razón se evaluaron 26 moléculas aminoéster esteroideas que puedan fungir como fármacos duales mediante la inhibición del receptor muscarínico M3 para la acción broncodilatadora y la inhibición de la proteína PDE4 para la acción antiinflamatoria. La evaluación fue mediante la herramienta de acoplamiento molecular y debido al análisis estadístico de los resultados de este se encontró que la presencia del grupo protector ftalamidato es importante para la obtención de valores de EA superiores. El porqué de lo anterior se elucidó mediante un análisis interaccional que también dio pauta para la identificación de aquellos residuos aminoacídicos esenciales en el sitio de acoplamiento de las dianas, con esto se halló que el grupo ftalamidato realiza varias interacciones dentro del sitio de acoplamiento. De esta forma, se explica la importancia de la presencia del grupo ftalamidato en las moléculas de estudio, así como también sirvió para seleccionar aquellas moléculas que presenten interacciones significativas dentro del sitio de la diana farmacológica. En consecuencia, las moléculas seleccionadas fueron AD06, AD12, AL06, AL08 y AL12, de las cuales se sometieron a un análisis ADMET, del cual se puede inferir que presentan cualidades suficientes para convertirse en posible fármaco para la EPOC.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] GOLD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, (2021) 1–164.
- [2] J.C. Vázquez-García, R. de J. Hernández-Zenteno, J.R. Pérez-Padilla, M. del C. Cano-Salas, M. Fernández-Vega, J. Salas-Hernández, M.A. Figueroa-Morales, R.E. Benítez-Pérez, L.A. Rendón-Pérez, J. Vázquez-Cortés, M.E. Mejía-Ávila, J.L. Mayorga-Butrón, M. Acuña-Kaldman, Rocío Barriga-Acevedo, A.R. Bizarrón-Muro, R. Camargo-Ángeles, C. Casillas-Suárez, C.O. Castañeda-Hernández, R.P. Castañón-Rodríguez, J.F. Castillo-Sánchez, A. Cortés-Télles, Jesús Javier Díaz-Castañón, A. Elizondo Ríos, M.G. Espitia-Hernández, M.A. García-Avilés, Rogelio García-Torrentera, J.E. González Aguirre, F.C. Guillén-Ortega, J.C. Herrera-García, M.A. Loustaunau-Andrade, G.E. Magdalena Maldonado, L.A. Mendoza Topete, J. Padua-García, Andrés Palomar-Lever, Rafael Francisco Páramo-Arroyo, S. del C. Toral-Freyre, J.F. Villegas-Elizondo, E.G. Zozoaga-Velázquez, Guía de Práctica Clínica Mexicana para el diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
GUÍA MEXICANA DE EPOC, 2020, NCT Neumol. y Cirugía Tórax. 78 (2019) 4–76. <https://doi.org/10.35366/nts191a>.
- [3] M. Martínez Luna, A. Rojas Granados, R.I. Lázaro Pacheco, J.E. Meza Alvarado, L. Ubaldo Reyes, M. Ángeles Castellanos, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) Bases para el médico general, Rev. la Fac. Med. 63 (2020) 28–35. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.3.06>.
- [4] I. Yang, E. Dabscheck, G. Jhonson, S. Jenkins, C. Mcdonald, V. Mcdonald, B. Smith, N. Zwar, The COPDX plan: Australian and New Zealand guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease 2021, Med. J. Aust. 63 (2021) 1–240.
- [5] B.G. Cosío, J. Rodríguez Rosado, Importancia de la vía aérea pequeña en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, Arch. Bronconeumol. 47 (2011) 32–37. [https://doi.org/10.1016/s0300-2896\(11\)70019-9](https://doi.org/10.1016/s0300-2896(11)70019-9).
- [6] J. Pérez, Bronquitis y bronquiolitis, Pediatría Integr. XX (2016) 28–37.
- [7] V. Kumar, A. Abbas, J. Aster, Robbins. Patología Humana, 10ed ed., Elsevier, 2018.
- [8] P.J. Barnes, P.G.J. Burney, E.K. Silverman, B.R. Celli, J. Vestbo, J.A. Wedzicha, E.F.M. Wouters, Chronic obstructive pulmonary disease, Nat. Rev. Dis. Prim. 1 (2015) 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.76>.
- [9] WHO, The top 10 causes of death, (2020). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (consultado el 26 de julio de 2021).
- [10] INEGI, COMUNICADO DE PRENSA INEGI NÚM. 61/21, 2021. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf (consultado el 26 de julio de 2021).
- [11] WHO, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), www.WHO.int. (2021). [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)) (consultado el 27 de septiembre de 2021).
- [12] O.A. Bravo-Gutiérrez, R. Falfán-Valencia, A. Ramírez-Venegas, R.H. Sansores, G. Ponciano-Rodríguez, G. Pérez-Rubio, Lung damage caused by heated tobacco products and electronic nicotine delivery systems: A systematic review, Int. J. Environ. Res. Public Health. 18 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijerph18084079>.

- [13] B. Velazquez, *Aprovechamiento de la biomasa para uso energético*, 2ed ed., Reverté, Barcelona, 2018.
- [14] R. Silva, M. Oyarzún, J. Olloquequi, Pathogenic Mechanisms in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Due to Biomass Smoke Exposure, *Arch. Bronconeumol.* 51 (2015) 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2015.04.013>.
- [15] R. Kodgule, S. Salvi, Exposure to biomass smoke as a cause for airway disease in women and children, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 12 (2012) 82–90. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32834ecb65>.
- [16] J. Díez, Factores de riesgo ambiental en la EPOC, *Med. Respir.* 13 (2020) 9–16. www.neumologiaysalud.es.
- [17] B. Furlow, Occupational exposures are important factors in COPD and other lung diseases, *Lancet. Respir. Med.* 7 (2019) 840. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30304-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30304-2).
- [18] N. Gao, C. Li, J. Ji, Y. Yang, S. Wang, X. Tian, K.F. Xu, Short-term effects of ambient air pollution on chronic obstructive pulmonary disease admissions in Beijing, China (2013–2017), *Int. J. COPD.* 14 (2019) 297–309. <https://doi.org/10.2147/COPD.S188900>.
- [19] E. Moore, L. Chatzidiakou, M.O. Kuku, R.L. Jones, L. Smeeth, S. Beevers, F.J. Kelly, B. Barratt, J.K. Quint, Global associations between air pollutants and chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations: A systematic review, *Ann. Am. Thorac. Soc.* 13 (2016) 1814–1827. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201601-064OC>.
- [20] R. Harding, G. Maritz, Maternal and fetal origins of lung disease in adulthood, *Semin. Fetal Neonatal Med.* 17 (2012) 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2012.01.005>.
- [21] I. Narang, A. Bush, Early origins of chronic obstructive pulmonary disease, *Semin. Fetal Neonatal Med.* 17 (2012) 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2012.01.002>.
- [22] F. Polverino, J.B. Soriano, Small airways and early origins of COPD: Pathobiological and epidemiological considerations, *Eur. Respir. J.* 55 (2020) 6–9. <https://doi.org/10.1183/13993003.02457-2019>.
- [23] J.M.D. Piña, A.R. Carrasco, L.S. Pérez, Evaluación nutricional en el paciente con EPOC. Fenotipos metabólicos., *Rev. Patol. Respir.* 21 (2018) 172–181.
- [24] B.M. Fischer, J.A. Voynow, A.J. Ghio, COPD: Balancing oxidants and antioxidants, *Int. J. COPD.* 10 (2015) 261–276. <https://doi.org/10.2147/COPD.S42414>.
- [25] F.F. Rahaghi, M. Miravitlles, Long-term clinical outcomes following treatment with alpha 1-proteinase inhibitor for COPD associated with alpha-1 antitrypsin deficiency: A look at the evidence, *Respir. Res.* 18 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0574-1>.
- [26] R.E. Benítez-Pérez, L. Torre-Bouscoulet, N. Villca-Alá, R.F. Del-Río-hidalgo, R. Pérez-Padilla, J.C. Vázquez-García, M. Silva-Cerón, S. Cid-Juárez, L. Gochicoa-Rangel, Spirometry: Recommendations and procedure, *Neumol. y Cir. Torax(Mexico).* 78 (2019) S97–S112. <https://doi.org/10.35366/NTS192C>.
- [27] J. Vázquez, R. Pérez, *Manual de Espirometría*, 3ed ed., Graphimedica, México, 2018.
- [28] P. Lorenzo, A. Moreno, I. Lizasoain, A. Portolés, C. Leza, M. Moro, *Velázquez Farmacología Básica y Clínica*, 19ed ed., Editorial Medica Panamericana, 2018.
- [29] R. Hilal, L. Brunton, Goodman & Gilman. *Manual de farmacología y terapéutica*, 2ed ed.,

McGrawHill Interamericana, México, 2015.

- [30] J. Álvarez, P. Casan, F. Rodriguez, J. Rodriguez, V. Villena, *Neumología Clínica*. 2 ed., 2 ed, Elsevier, Barcelo, 2017.
- [31] C. Esteban, M. Aburto, Seguridad de los corticoides inhalados en la EPOC, *Arch. Bronconeumol.* 46 (2010) 28–35. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(10\)70030-2](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(10)70030-2).
- [32] B. Alcázar, P. Romero, Actualidad de los corticoides inhalados en la EPOC, *Med. Respir.* 8 (2015) 59–64. www.neumologiaysalud.es.
- [33] J. Cho, C.H. Lee, S.S. Hwang, K.U. Kim, S.H. Lee, H.Y. Park, S.J. Park, K.H. Min, Y.M. Oh, K.H. Yoo, K.S. Jung, Risk of acute exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease associated with biomass smoke compared with tobacco smoke, *BMC Pulm. Med.* 19 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0833-7>.
- [34] J.A. Martínez, M.D.L.G. Guillén, Evidencia del uso de metilxantinas en las exacerbaciones de la EPOC, *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.* 19 (2006) 309–315.
- [35] R. Ranjani, A.. T.S. Vinotha, A prospective randomized controlled study: Theophylline on oxidative stress and steroid sensitivity in chronic obstructive pulmonary disease patients, *Int. J. Pharm. Investig.* 7 (2017) 119. https://doi.org/10.4103/jphi.jphi_58_17.
- [36] E. Pleguezuelos, E. Gimeno-Santos, C. Hernández, M. del C. Mata, L. Palacios, P. Piñera, J. Molina, E. Chiner, M. Miravittles, Recommendations on non-Pharmacological Treatment in Chronic Obstructive Pulmonary Disease From the Spanish COPD Guidelines (GesEPOC 2017), *Arch. Bronconeumol.* 54 (2018) 568–575. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2018.06.001>.
- [37] J.M. Michalski, G. Golden, J. Ikari, S.I. Rennard, PDE4: A novel target in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease, *Clin. Pharmacol. Ther.* 91 (2012) 134–142. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.266>.
- [38] D. Hernández-Flórez, L. Valor, Selective Phosphodiesterase Inhibitors: A New Therapeutic Option in Inflammation and Autoimmunity, *Reumatol. Clínica (English Ed.* 12 (2016) 303–306. <https://doi.org/10.1016/j.reumae.2016.07.004>.
- [39] J. Gea, The Future of Biological Therapies in COPD, *Arch. Bronconeumol.* 54 (2018) 185–186. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.11.004>.
- [40] J. Luo, K. Wang, D. Liu, B.M. Liang, C.T. Liu, Can roflumilast, a phosphodiesterase-4 inhibitor, improve clinical outcomes in patients with moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease? A meta-analysis, *Respir. Res.* 17 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0330-y>.
- [41] M. Corvalán, El tabaquismo: una adicción, *Rev. Chil. Enfermedades Respir.* 33 (2017) 186–189. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482017000300186.
- [42] K. Leiva Gabriel, V. Quesada Vargas, Nuevas estrategias farmacológicas para el tratamiento de cesación de tabaco, *Rev. Medica Sinerg.* 4 (2019) 73–80. <https://doi.org/10.31434/rms.v4i6.246>.
- [43] M.P. Corvalán B., Terapia de reemplazo de nicotina, *Rev. Chil. enfermedades Respir.* 33 (2017) 206–208. <https://doi.org/10.4067/s0717-73482017000300206>.
- [44] W.C. Paz-Ballesteros, L. Zavala-Arciniega, D.S. Gutiérrez-Torres, G. Ponciano-Rodríguez,

- L.M. Reynales-Shigematsu, Evaluation of physical and psychological dependence in Mexican adult smokers, *Encodat* 2016, *Salud Publica Mex.* 61 (2019) 136–146. <https://doi.org/10.21149/9858>.
- [45] L. García-Gómez, R.H. Sansores, V.N. Díaz, E. Urdapilleta-Herrera, G. González-Rojas, L.E. Pérez-Márquez, A.R. Venegas, Impacto del consejo breve para dejar de fumar, *Salud Publica Mex.* 57 (2015) 366–367.
- [46] Secretaria de Salud México, Prevención, diagnóstico y tratamiento del consumo del tabaco y humo ajeno en el primer nivel de atención., (2013) 66. <http://www.cenotec-difusion.com/CMGPC/SS-108-08/ER.pdf>.
- [47] V. Almadana Pacheco, C. Benito Bernáldez, E. Luque Crespo, R. Perera Louvier, J.C. Rodríguez Fernández, A.S. Valido Morales, Do COPD patients lie about their smoking habit?, *Aten. Primaria.* 52 (2020) 523–528. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2020.05.014>.
- [48] N. Martinez, Efectividad de los programas de rehabilitación pulmonar mediante el entrenamiento muscular inspiratorio en pacientes con EPOC, *Universitas Miguel Hernandez*, 2020. https://online210.psych.wisc.edu/wp-content/uploads/PSY-210_Unit_Materials/PSY-210_Unit01_Materials/Frost_Blog_2020.pdf%0Ahttps://www.economist.com/special-report/2020/02/06/china-is-making-substantial-investment-in-ports-and-pipelines-worldwide%0Ahttp://.
- [49] E. Paz Fernández, A. López García, L. González Doniz, S. Souto Camba, R. Fernández Cervantes, Efectos de la rehabilitación pulmonar de corta duración en pacientes con EPOC, *Fisioterapia.* 37 (2015) 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.ft.2014.10.003>.
- [50] C. Bulley, M. Donaghy, S. Howden, L. Salisbury, S. Whiteford, E. Mackay, A prospective qualitative exploration of views about attending pulmonary rehabilitation, *Physiother. Res. Int.* 14 (2009) 181–192. <https://doi.org/10.1002/pri.435>.
- [51] P.Y. Patel, D. Sorani, An Evidence-Based Study : Effect of Physiotherapy Treatment on Exercise Capacity in Patients with, *Int. J. Heal. Sci. Res.* 10 (2020) 103–108.
- [52] I. Martin, M. Martinez, M. Calero, EPOC fenotipo no agudizador con enfisema, *Rev. Española Casos Clínicos en Med. Interna.* 3 (2017) 146–147.
- [53] J.L.I. Alonso, C.M. Paredes, Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), *Med.* 12 (2018) 3699–3709. <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.09.011>.
- [54] A. Alonso, S. Gando, D. Violi, H. Defranchi, E. Barimboim, P. Saez, P. Grynblat, Nuevos procedimientos broncoscópicos en Argentina: Reducción volumétrica pulmonar endoscópica con válvulas endobronquiales., *Rev. Am. Med. Respir.* (2016) 258–268. <https://alatorax.org/es/articulos-comentados/articulo-comentado-febrero-2017-nuevos-procedimientos-broncoscopicos-en-argentina-reduccion-volumetrica-pulmonar-endoscopica-con-valvulas-endobronquiales-3>.
- [55] A. Sanabria, L. Alvarado, C. Monge, Neurotransmisión Colinérgica Central: Aspectos Moleculares, *Rev. Mex. Neurocienc.* 18 (2017) 76–87. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2017/rmn172h.pdf>.
- [56] M. Flores, J. Segura, Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico, *Rev. Mex.* 6 (2005).
- [57] K.S. Buels, A.D. Fryer, Muscarinic receptor antagonists: Effects on pulmonary function, *Handb. Exp. Pharmacol.* 208 (2012) 317–341. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274->

- [58] F. Abad Santos, J. Novalbos, S. Gallego Sandín, M.A. Gálvez Múgica, Regulación del tono bronquial en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC): Papel de los receptores muscarínicos, *An. Med. Interna.* 20 (2003) 201–205. <https://doi.org/10.4321/s0212-71992003000400010>.
- [59] A.E. Berizzi, C. Goudet, *Strategies and considerations of G-protein-coupled receptor photopharmacology*, 1a ed., Elsevier Inc., 2020. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.12.001>.
- [60] M. Ishii, Y. Kurachi, Muscarinic Acetylcholine Receptors, *Curr. Pharm. Des.* 12 (2006) 3573–3581. <https://doi.org/1381-6128/0650.00+.00>.
- [61] A.J. Butcher, K.C. Kong, R. Prihandoko, A.B. Tobin, Physiological role of g-protein coupled receptor phosphorylation, *Handb. Exp. Pharmacol.* 208 (2012) 79–94. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9_5.
- [62] D.A. Brown, Acetylcholine and cholinergic receptors, *Brain Neurosci. Adv.* 3 (2019) 239821281882050. <https://doi.org/10.1177/2398212818820506>.
- [63] D. Yang, Q. Zhou, V. Labroska, S. Qin, S. Darbalaei, Y. Wu, E. Yuliantie, L. Xie, H. Tao, J. Cheng, Q. Liu, S. Zhao, W. Shui, Y. Jiang, M.W. Wang, G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery, *Signal Transduct. Target. Ther.* 6 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00435-w>.
- [64] R.M. Eglén, Overview of muscarinic receptor subtypes, *Handb. Exp. Pharmacol.* 208 (2012) 3–28. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9_1.
- [65] R.M. Eglén, Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function, *Auton. Autacoid Pharmacol.* 26 (2006) 219–233. <https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.2006.00368.x>.
- [66] G. Karakiulakis, M. Roth, Muscarinic receptors and their antagonists in COPD: Anti-inflammatory and antiremodeling effects, *Mediators Inflamm.* 2012 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/409580>.
- [67] E. Naline, S. Grassin Delye, H. Salvator, M. Brollo, C. Faisy, T. Victoni, C. Abrial, P. Devillier, Comparison of the in vitro pharmacological profiles of long-acting muscarinic antagonists in human bronchus, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 49 (2018) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2018.01.003>.
- [68] L. Calzetta, A. Coppola, B.L. Ritondo, M. Matino, A. Chetta, P. Rogliani, The impact of muscarinic receptor antagonists on airway inflammation: A systematic review, *Int. J. COPD.* 16 (2021) 257–279. <https://doi.org/10.2147/COPD.S285867>.
- [69] L.E.M. Kistemaker, R. Gosens, Acetylcholine beyond bronchoconstriction: Roles in inflammation and remodeling, *Trends Pharmacol. Sci.* 36 (2015) 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.11.005>.
- [70] H. Meurs, B.G.J. Dekkers, H. Maarsingh, A.J. Halayko, J. Zaagsma, R. Gosens, Muscarinic receptors on airway mesenchymal cells: Novel findings for an ancient target, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 26 (2013) 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.07.003>.
- [71] A.C. Kruse, B.K. Kobilka, D. Gautam, P.M. Sexton, A. Christopoulos, J. Wess, Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 549–560. <https://doi.org/10.1038/nrd4295>.

- [72] N. Greig, M. Reale, A. Tata, New Pharmacological Approaches to the Cholinergic System: An Overview on Muscarinic Receptor Ligands and Cholinesterase Inhibitors, *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 8 (2013) 123–141. <https://doi.org/10.2174/1574889811308020003>.
- [73] S.C. Dulawa, D.S. Janowsky, Cholinergic regulation of mood: from basic and clinical studies to emerging therapeutics, *Mol. Psychiatry.* 24 (2019) 694–709. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0219-x>.
- [74] A.C. Kruse, J. Hu, A.C. Pan, D.H. Arlow, D.M. Rosenbaum, E. Rosemond, H.F. Green, T. Liu, P.S. Chae, R.O. Dror, D.E. Shaw, W.I. Weis, J. Wess, B.K. Kobilka, Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor, *Nature.* 482 (2012) 552–556. <https://doi.org/10.1038/nature10867>.
- [75] M. Uhlén, L. Fagerberg, B.M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I.M. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A.K. Szigyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J.M. Schwenk, M. Hamsten, K. Von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. Von Heijne, J. Nielsen, F. Pontén, Tissue-based map of the human proteome, *Science* (80-.). 347 (2015). <https://doi.org/10.1126/science.1260419>.
- [76] P.J. Barnes, New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 543–559. <https://doi.org/10.1038/nrd4025>.
- [77] D.H. Maurice, H. Ke, F. Ahmad, Y. Wang, J. Chung, V.C. Manganiello, Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 290–314. <https://doi.org/10.1038/nrd4228>.
- [78] G.B. Bolger, The PDE-Opathies: Diverse Phenotypes Produced by a Functionally Related Multigene Family, *Trends Genet.* 37 (2021) 669–681. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.03.002>.
- [79] D.M.G. Halpin, ABCD of the phosphodiesterase family: Interaction and differential activity in COPD, *Int. J. COPD.* 3 (2008) 543–561. <https://doi.org/10.2147/copd.s1761>.
- [80] C.L. Miller, C. Yan, Targeting cyclic nucleotide phosphodiesterase in the heart: Therapeutic implications, *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 3 (2010) 507–515. <https://doi.org/10.1007/s12265-010-9203-9>.
- [81] J. Cortijo Gimeno, Inhibidores de fosfodiesterasa 4: un nuevo grupo farmacológico en el tratamiento de la inflamación crónica de las vías aéreas, *Arch. Bronconeumol.* 46 (2010) 3–7. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(10\)70046-6](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(10)70046-6).
- [82] F. Ahmad, T. Murata, K. Shimizu, E. Degerman, D. Maurice, V. Manganiello, Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Important signaling modulators and therapeutic targets, *Oral Dis.* 21 (2015) e25–e50. <https://doi.org/10.1111/odi.12275>.
- [83] B. Fernandez, M. Choi, M. Rodriguez, NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS (AMPc Y GMPc) COMO SEGUNDOS MENSAJEROS, en: *Hipertensión Arter. Epidemiol. Fisiol. Fisiopatol. diagnóstico y Ter.*, 1ed ed., Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial, Buenos Aires, 2013: pp. 76–80.
- [84] E. Klussmann, Protein-protein interactions of PDE4 family members - Functions, interactions and therapeutic value, *Cell. Signal.* 28 (2016) 713–718. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.10.005>.

- [85] A.M. Vignola, PDE4 inhibitors in COPD - A more selective approach to treatment, *Respir. Med.* 98 (2004) 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2003.12.012>.
- [86] T. Peng, B. Qi, J. He, H. Ke, J. Shi, Advances in the Development of Phosphodiesterase-4 Inhibitors, *J. Med. Chem.* 63 (2020) 10594–10617. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02170>.
- [87] J.L. Izquierdo Alonso, Phosphodiesterase-4 inhibitors: Roflumilast, *Rev. Clin. Esp.* 211 (2011) 22–30. [https://doi.org/10.1016/S0014-2565\(11\)70008-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2565(11)70008-X).
- [88] F.J. Martinez, P.M.A. Calverley, U.M. Goehring, M. Brose, L.M. Fabbri, K.F. Rabe, Effect of roflumilast on exacerbations in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease uncontrolled by combination therapy (REACT): A multicentre randomised controlled trial, *Lancet.* 385 (2015) 857–866. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62410-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62410-7).
- [89] A.M. Mulhall, C.A. Droege, N.E. Ernst, R.J. Panos, M.A. Zafar, Phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: A review of current and developing drugs, *Expert Opin. Investig. Drugs.* 24 (2015) 1597–1611. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1094054>.
- [90] C. Wang, J. Zhou, J. Wang, S. Li, A. Fukunaga, J. Yodoi, H. Tian, Progress in the mechanism and targeted drug therapy for COPD, *Signal Transduct. Target. Ther.* 5 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00345-x>.
- [91] C. Lugnier, H.M. Al-Kuraishy, E. Rousseau, PDE4 inhibition as a therapeutic strategy for improvement of pulmonary dysfunctions in Covid-19 and cigarette smoking, *Biochem. Pharmacol.* 185 (2021) 114431. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114431>.
- [92] S. Janjua, R. Fortescue, P. Poole, Phosphodiesterase-4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease, *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020 (2020). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002309.pub6>.
- [93] N.J. Press, K.H. Banner, 2 PDE4 Inhibitors - A Review of the Current Field, Elsevier, 2009. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)00202-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)00202-6).
- [94] Z. Diamant, D. Spina, PDE4-inhibitors: A novel, targeted therapy for obstructive airways disease, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 24 (2011) 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2010.12.011>.
- [95] L.G. Ferreira, R.N. Dos Santos, G. Oliva, A.D. Andricopulo, Molecular docking and structure-based drug design strategies, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- [96] A. Baldi, Computational approaches for drug design and discovery: An overview, *Syst. Rev. Pharm.* 1 (2010) 99–105. <https://doi.org/10.4103/0975-8453.59519>.
- [97] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- [98] A. Kryshchak, J. Moulton, R. Albrecht, G.A. Chang, K. Chao, A. Fraser, J. Greenfield, M.D. Hartmann, O. Herzberg, I. Josts, P.G. Leiman, S.B. Linden, A.N. Lupas, D.C. Nelson, S.D. Rees, X. Shang, M.L. Sokolova, H. Tidow, Computational models in the service of X-ray and cryo-electron microscopy structure determination, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 89 (2021) 1633–1646. <https://doi.org/10.1002/prot.26223>.
- [99] M.G. Ghany, T.M. Block, Disease Pathways and Mechanisms of Potential Drug Targets, *Clin.*

Liver Dis. 12 (2018) 12–18. <https://doi.org/10.1002/cld.735>.

- [100] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S.A.A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*. 596 (2021) 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- [101] G. Del Río, Challenges in the computational modeling of the protein structure—activity relationship, *Computation*. 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/computation9040039>.
- [102] J.M. Thornton, R.A. Laskowski, N. Borkakoti, AlphaFold heralds a data-driven revolution in biology and medicine, *Nat. Med.* 27 (2021) 1666–1669. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01533-0>.
- [103] N. Olivero-Deibe, L. Tomé-Poderti, F. Carrión, S. Bianchi, M. Fló, D. Prieto, F. Rammauro, A. Addiego, N. Ibañez, M. Portela, R. Duran, M. Berois, O. Pritsch, Expression, Purification, and Characterization of Bovine Leukemia Virus-Like Particles Produced in *Drosophila* S2 Cells, *Front. Virol.* 1 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fviro.2021.756559>.
- [104] Z. Wang, H. Sun, X. Yao, D. Li, L. Xu, Y. Li, S. Tian, T. Hou, Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: The prediction accuracy of sampling power and scoring power, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 12964–12975. <https://doi.org/10.1039/c6cp01555g>.
- [105] N.S. Pagadala, K. Syed, J. Tuszynski, Software for molecular docking: a review, *Biophys. Rev.* 9 (2017) 91–102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>.
- [106] F.D. Prieto-Martínez, M. Arciniega, J.L. Medina-Franco, Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos, *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*. 21 (2018) 65–87. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>.
- [107] R.E. Amaro, J. Baudry, J. Chodera, Ö. Demir, J.A. McCammon, Y. Miao, J.C. Smith, Ensemble Docking in Drug Discovery, *Biophys. J.* 114 (2018) 2271–2278. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.038>.
- [108] T. Patsar, A. Poso, Binding affinity via docking: Fact and fiction, *Molecules*. 23 (2018) 1DUMMY. <https://doi.org/10.3390/molecules23081899>.
- [109] J. Li, A. Fu, L. Zhang, An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking, *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* 11 (2019) 320–328. <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>.
- [110] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2009) NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [111] D.S. BIOVIA, BIOVIA discovery studio visualizer, Softw. version. 20 (2016) 779.
- [112] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [113] L. Schrödinger, The PyMOL Molecular Graphics System, Version~4.6.0, 2015.

- [114] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- [115] R. Islam, M.R. Parves, A.S. Paul, N. Uddin, M.S. Rahman, A. Al Mamun, M.N. Hossain, M.A. Ali, M.A. Halim, A molecular modeling approach to identify effective antiviral phytochemicals against the main protease of SARS-CoV-2, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 39 (2021) 3213–3224. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1761883>.
- [116] E. Armani, A. Rizzi, C. Capaldi, R. De Fanti, M. Delcanale, G. Villetti, G. Marchini, A.R. Pisano, V. Pitozzi, M.G. Pittelli, M. Trevisani, M. Salvadori, V. Cenacchi, P. Puccini, F. Amadei, A. Pappani, M. Civelli, R. Patachini, C.A.G. Baker-Glenn, H. Van de Poël, W.P. Blackaby, K. Nash, G. Amari, Discovery of M 3 Antagonist-PDE4 Inhibitor Dual Pharmacology Molecules for the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease , *J. Med. Chem.* (2021). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00204>.
- [117] M. Al-Nema, A. Gaurav, V.S. Lee, Docking based screening and molecular dynamics simulations to identify potential selective PDE4B inhibitor, *Heliyon.* 6 (2020) e04856. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04856>.
- [118] L. Wu, Y. Chen, J. Yi, Y. Zhuang, L. Cui, C. Ye, Mechanism of action of Bu-fei-yi-shen formula in treating chronic obstructive pulmonary disease based on network pharmacology analysis and molecular docking validation, *Biomed Res. Int.* 2020 (2020). <https://doi.org/10.1155/2020/9105972>.
- [119] G.F. Sousa Carvalho, L.K. Marques, H.G. Sousa, L.R. Silva, D.C. Leão Ferreira, F. Pires de Moura do Amaral, A.L. Martins Maia Filho, J. Figueredo-Silva, W. dos S. Alves, M. das D.A. de Oliveira, J. Soares da Costa Júnior, F.L. Cardoso Costa Junior, R.M. Ramos, M. Rai, V.T. Uchôa, Phytochemical study, molecular docking, genotoxicity and therapeutic efficacy of the aqueous extract of the stem bark of *Ximenia americana* L. in the treatment of experimental COPD in rats, *J. Ethnopharmacol.* 247 (2020) 112259. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112259>.
- [120] C. Srikanth, R. BharadwaJ, Docking Studies of Serine Protease Inhibitor with Various SPI Activators to Treat COPD, *Helix.* 7 (2017) 1473–1478. <https://doi.org/10.29042/2017-1473-1478>.
- [121] Mexican Hormones, *Fortune.* (1951) 162.
- [122] G.S. Laveaga, *Jungle laboratories: Mexican peasants, national projects, and the making of the pill*, Duke University Press, 2009.
- [123] C. Djerassi, Chemical birth of the pill, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194 (2006) 290. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.06.009>.
- [124] C. Zhang, L. Qin, B. Sun, Y. Wu, F. Zhong, L. Wu, T. Liu, Transcriptome analysis of the effect of diosgenin on autoimmune thyroiditis in a rat model, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85822-1>.
- [125] R. Zhang, B. Huang, D. Du, X. Guo, G. Xin, Z. Xing, Y. Liang, Y. Chen, Q. Chen, Y. He, W. Huang, Anti-thrombosis effect of diosgenyl saponins in vitro and in vivo, *Steroids.* 78 (2013) 1064–1070. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.07.003>.
- [126] L. Sánchez-Sánchez, M.G. Hernández-Linares, M.L. Escobar, H. López-Muñoz, E. Zenteno, M.A. Fernández-Herrera, G. Guerrero-Luna, A. Carrasco-Carballo, J. Sandoval-Ramírez,

Antiproliferative, cytotoxic, and apoptotic activity of steroidal oximes in cervicouterine cell lines, *Molecules*. 21 (2016) 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules21111533>.

- [127] W.C. Wang, S.F. Liu, W.T. Chang, Y.L. Shiue, P. fang Hsieh, T.J. Hung, C.Y. Hung, Y.J. Hung, M.F. Chen, Y.L. Yang, The effects of diosgenin in the Regulation of renal proximal tubular fibrosis, *Exp. Cell Res.* 323 (2014) 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.028>.
- [128] Z.J. Mao, Q.J. Tang, C.A. Zhang, Z.F. Qin, B. Pang, P.K. Wei, B. Liu, Y.N. Chou, Anti-proliferation and anti-invasion effects of diosgenin on gastric cancer BGC-823 cells with HIF-1 α shRNAs, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 6521–6533. <https://doi.org/10.3390/ijms13056521>.
- [129] T.H. Kang, E. Moon, B.N. Hong, S.Z. Choi, M. Son, J.H. Park, S.Y. Kim, Diosgenin from *Dioscorea nipponica* ameliorates diabetic neuropathy by inducing nerve growth factor, *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 1493–1498. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1493>.
- [130] Z. He, Y. Tian, X. Zhang, B. Bing, L. Zhang, H. Wang, W. Zhao, Anti-tumour and immunomodulating activities of diosgenin, a naturally occurring steroidal saponin, *Nat. Prod. Res.* 26 (2012) 2243–2246. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.648192>.
- [131] C.H. Huang, D.Z. Liu, T.R. Jan, Diosgenin, a plant-derived sapogenin, enhances regulatory T-Cell immunity in the intestine of mice with food allergy, *J. Nat. Prod.* 73 (2010) 1033–1037. <https://doi.org/10.1021/np900690z>.
- [132] M.A. Fernández-Herrera, J. Sandoval-Ramírez, H. López-Muñoz, L. Sánchez-Sánchez, Formation of the steroidal 3 β -hydroxy-6-oxo-moiety. synthesis and cytotoxicity of glucolaxogenin, *Arkivoc.* 2009 (2009) 170–184. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0010.d15>.
- [133] M.A. Iglesias-Arteaga, E.M. Símuta-Lopez, S. Xochihua-Moreno, O. Viñas-Bravo, S.M. Smith, S.M. Reyes, J. Sandoval-Ramírez, A convenient procedure for the synthesis of 3 β -hydroxy-6-oxo-5 α -steroids. Application to the synthesis of laxogenin, *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2005) 381–385. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000300011>.
- [134] K. Pérez-Labrada, I. Brouard, S. Estévez, M.T. Marrero, F. Estévez, J. Bermejo, D.G. Rivera, New insights into the structure-cytotoxicity relationship of spirostan saponins and related glycosides, *Bioorganic Med. Chem.* 20 (2012) 2690–2700. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.02.026>.
- [135] J.R. Stokes, T.B. Casale, Characterization of asthma endotypes: implications for therapy, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 117 (2016) 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2016.05.016>.
- [136] B.N. Lambrecht, H. Hammad, The immunology of asthma, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 45–56. <https://doi.org/10.1038/ni.3049>.
- [137] F.M. De Benedictis, A. Bush, Corticosteroids in respiratory diseases in children, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185 (2012) 12–23. <https://doi.org/10.1164/rccm.201107-1174CI>.
- [138] L. Zhang, L.B. Lasmar, J.A. Castro-Rodriguez, The impact of asthma and its treatment on growth: an evidence-based review, *J. Pediatr. (Rio. J.)*. 95 (2019) 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2018.10.005>.
- [139] M. Korppi, Therapeutic strategies for pediatric bronchiolitis, *Expert Rev. Respir. Med.* 13 (2019) 95–103. <https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1554439>.
- [140] T.P. Hansen, A. Oschman, E. K. Pallotto, R. Palmer, D. Younger, A. Cuna, Using quality

improvement to implement consensus guidelines for postnatal steroid treatment of preterm infants with developing bronchopulmonary dysplasia, *J. Perinatol.* 41 (2021) 891–897. <https://doi.org/10.1038/s41372-020-00862-1>.

- [141] J.J. Coalson, Pathology of new bronchopulmonary dysplasia, *Semin. Neonatol.* 8 (2003) 73–81. [https://doi.org/10.1016/S1084-2756\(02\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S1084-2756(02)00193-8).
- [142] I.M. Balfour-Lynn, K. Welch, S. Smith, Inhaled corticosteroids for cystic fibrosis, *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001915.pub6>.
- [143] K. Patterson, M.E. Streck, Allergic bronchopulmonary aspergillosis, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 7 (2010) 237–244. <https://doi.org/10.1513/pats.200908-086AL>.
- [144] American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), Practice Bulletin 713. Antenatal Corticosteroid Therapy for Fetal Maturation, *Obstet. Gynecol.* 133 (2017) 404–405.
- [145] G. Huang, X.C. Xu, J. Sen Zhou, Z.Y. Li, H.P. Chen, Y. Wang, W. Li, H.H. Shen, Z.H. Chen, Neutrophilic Inflammation in the Immune Responses of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Lessons from Animal Models, *J. Immunol. Res.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/7915975>.
- [146] Y. Zhou, X. Fu, X. Liu, C. Huang, G. Tian, C. Ding, J. Wu, L. Lan, S. Yang, Use of corticosteroids in influenza-associated acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia: a systemic review and meta-analysis, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59732-7>.
- [147] C. Rodrigo, J. Leonardi-Bee, J. Nguyen-Van-Tam, W.S. Lim, Corticosteroids as adjunctive therapy in the treatment of influenza, *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013 (2013) 1–9. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010406>.
- [148] F. Ferràù, F. Ceccato, S. Cannavò, C. Scaroni, What we have to know about corticosteroids use during Sars-Cov-2 infection, *J. Endocrinol. Invest.* 44 (2021) 693–701. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01384-5>.
- [149] S. Sinha, N.L. Rosin, R. Arora, E. Labit, A. Jaffer, L. Cao, R. Farias, A.P. Nguyen, L.G.N. de Almeida, A. Dufour, A. Bromley, B. McDonald, M.R. Gillrie, M.J. Fritzler, B.G. Yipp, J. Biernaskie, Dexamethasone modulates immature neutrophils and interferon programming in severe COVID-19, Springer US, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01576-3>.