UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

TEMA:

ANÁLISIS DE POSIBLES INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA CICLOOXIGENASA (COX)-2 EN PRINCIPIOS ACTIVOS DE PLANTAS MEDICINALES MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR.

AUTOR:

Rolando Israel Haro Artos

DOCENTE - TUTOR:

Ramírez-Iglesias Elizabeth, PhD

Puyo - Pastaza - Ecuador

2022

FORMATO 4
APROBACIÓN DE LOS TRABAJOS DE INTEGRACIÓN CURRICULAR
(Uno por cada evaluador)

En el siguiente cuadro se detalla un conjunto de criterios a evaluar con un total de cien (100) puntos.		
Criterios	**Puntaje**	**Argumentos de la calificación**
1. TÍTULO **Análisis de posibles inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (COX)-2 en principios activos de plantas medicinales mediante acoplamiento molecular**		
El título es conciso e informativo de la idea principal del escrito. Genera expectativas de lectura que se cumplen.	5/5	
2. RESUMEN		
Entrega información necesaria que oriente al lector a identificar de qué se trata la investigación y su relevancia. Incorpora los objetivos, metodología, principales hallazgos y conclusiones.	4/5	.nombres científicos mal escritos
3. INTRODUCCION		
Entrega información sobre la temática a tratar. Describe la relevancia del tema dentro de las temáticas de investigación, vinculación y docencia. Presentación del problema y objetivos del problema del artículo de manera clara y concisa.	20/20	
4. MARCO TEÓRICO		
Marco teórico coherente y articulado con los objetivos. Entrega conceptos de términos que son empleados en el estudio. Sustenta el referente conceptual con adecuadas fuentes de autoridad.	10/15	DEMASIADO BREVE
5. METODOLOGIA		
Describe el tipo de investigación a desarrollar. Expone con claridad el procesamiento de la información y obtención de los datos. Plantea los criterios de análisis con que se abordó la información.	12/15	Aparecen señalamientos de formato que no se eliminaron EN TODO EL TRABAJO

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS		
Entrega los resultados de manera organizada a partir del problema planteado, objetivos específicos, etc. Los cuadros y figuras son pertinentes y están claramente representados. El texto no repite información entregada en los cuadros y figuras.	25/25	
7. CONCLUSIONES		
Las conclusiones deben ser claras y precisas, acorde a los objetivos trazados. Discute, reflexiona sobre los resultados obtenidos.	10/10	
8. REFERENCIAS		
Atiende las normas APA en las citas, fuentes y referencias. Las referencias bibliográficas tienen la fuente en el texto y viceversa.	5/5	
VALORACIÓN TOTAL	91	

DICTAMEN

Marque la casilla correspondiente a su criterio de evaluación respecto al documentorevisado.

Recomendación	**Marque con X**
Aprobar	x
No Aprobar	
CALIFICACIÓN	91

Atentamente,

Firmado electrónicamente por:
MARIA ADELA VALDES SAENZ

Dra María Adela Valdés Sáenz

Dado en la ciudad de Puyo, a los 10 días del mes de agosto de 2022

FORMATO 4
APROBACIÓN DE LOS TRABAJOS DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

(Uno por cada evaluador)

En el siguiente cuadro se detalla un conjunto de criterios a evaluar con un total de cien (100) puntos.		
Criterios	**Puntaje**	**Argumentos de la calificación**
1. TÍTULO **Análisis de posibles inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (COX)-2 en principios activos de plantas medicinales mediante acoplamiento molecular**		
El título es conciso e informativo de la idea principal del escrito. Genera expectativas de lectura que se cumplen.	5/5	
2. RESUMEN		
Entrega información necesaria que oriente al lector a identificar de qué se trata la investigación y su relevancia. Incorpora los objetivos, metodología, principales hallazgos y conclusiones.	5/5	
3. INTRODUCCION		
Entrega información sobre la temática a tratar. Describe la relevancia del tema dentro de las temáticas de investigación, vinculación y docencia. Presentación del problema y objetivos del problema del artículo de manera clara y concisa.	20/20	
4. MARCO TEÓRICO		
Marco teórico coherente y articulado con los objetivos. Entrega conceptos de términos que son empleados en el estudio. Sustenta el referente conceptual con adecuadas fuentes de autoridad.	13/15	MUY ABREVIADO
5. METODOLOGIA		
Describe el tipo de investigación a desarrollar. Expone con claridad el procesamiento de la información y obtención de los datos. Plantea los criterios de análisis con que se abordó la información.	13/15	señalamientos de formato no eliminados

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS		
Entrega los resultados de manera organizada a partir del problema planteado, objetivos específicos, etc. Los cuadros y figuras son pertinentes y están claramente representados. El texto no repite información entregada en los cuadros y figuras.	25/25	
7. CONCLUSIONES		
Las conclusiones deben ser claras y precisas, acorde a los objetivos trazados. Discute, reflexiona sobre los resultados obtenidos.	10/10	
8. REFERENCIAS		
Atiende las normas APA en las citas, fuentes y referencias. Las referencias bibliográficas tienen la fuente en el texto y viceversa.	5/5	
VALORACIÓN TOTAL	96	

DICTAMEN

Marque la casilla correspondiente a su criterio de evaluación respecto al documento revisado.

Recomendación	**Marque con X**
Aprobar	X
No Aprobar	
CALIFICACIÓN	96

Atentamente,

Firmado electrónicamente por:
YAMILA LAZOPEREZ

MS, c. Yamila Lazo Pérez

Dado en la ciudad de Puyo, a los 10 días del mes de agosto de 2022

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Puyo, 04-08-2022

Por medio del presente CERTIFICO que:

El Trabajo de Integración Curricular correspondiente al estudiante: Rolando Israel Haro Artos, con C.I..1003447388, con el Tema: "Análisis de posibles inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (COX)-2 en principios activos de plantas medicinales mediante acoplamiento molecular.",.", de la carrera de BIOLOGIA. Docente- tutor del Trabajo de Integración Curricular, Ramírez-Iglesias Elizabeth, PhD, ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 4%, Informe generado con fecha 04
-08-2022por parte del director conforme archivo adjunto.

Particular que comunico a usted para los fines pertinentes

Atentamente,

Firmado electrónicamente por:
ELIZABETH DEL CARMEN RAMIREZ IGLESIAS

Ramírez-Iglesias Elizabeth, PhD

Docente-tutor del Trabajo de Integración Curricular CI: 1758180614

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Ouriginal by Turnitin

Document Information

Analyzed document	Selección de posibles inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (COX)-2 ii 04-8.pdf (D142664803)
Submitted	8/4/2022 11:30:00 PM
Submitted by	
Submitter email	blg2017149@uea.edu.ec
Similarity	4%
Analysis address	ec.ramirezi.uea@analysis.urkund.com

Sources included in the report

SA	**M0.178_20202_PEC4 -Cierre de la memoria_15210897.txt** Document M0.178_20202_PEC4 -Cierre de la memoria_15210897.txt (D108300030)	1
SA	**M0.177_20202_PEC4 - Cierre de la memoria_15302211.txt** Document M0.177_20202_PEC4 - Cierre de la memoria_15302211.txt (D109671216)	1
SA	**TESIS DOCKING MOLECULAR GONZALEZ DALTON.pdf** Document TESIS DOCKING MOLECULAR GONZALEZ DALTON.pdf (D140134797)	2
SA	**M0.177_20202_PEC4 - Cierre de la memoria_15212514.txt** Document M0.177_20202_PEC4 - Cierre de la memoria_15212514.txt (D108314387)	1
SA	**Tesis Luis Guevara FINAL.docx** Document Tesis Luis Guevara FINAL.docx (D127299593)	1

Análisis de posibles inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (COX)-2 en principios activos de plantas medicinales mediante acoplamiento molecular.

Haro Artos Rolando Israel
blg2017149@uea.edu.ec

Ramírez-Iglesias Elizabeth, PhD
ec.ramirezi@uea.edu.ec

Universidad Estatal Amazónica, Facultad de ciencias de la vida, Carrera de Biología

Resumen

La inflamación es un mecanismo de autorregulación y reparación de los tejidos ante un agente que puede afectar los procesos homeostáticos, al momento en que se desregulan los procesos inflamatorios por una sobre expresión de la enzima COX-2, la inflamación puede presentarse como una enfermedad autoinmune. El objetivo de este estudio fue encontrar posibles inhibidores de la COX-2 utilizando principios activos, en el cual se emplearon 50 principios activos de plantas medicinales de origen ecuatoriano, y un modelo PDB de la enzima COX-2, por medio de la técnica de Doking molecular o acoplamiento molecular en Virtual Screening, a través de softwares de acceso gratuito, los resultados que se encontraron en el estudio fueron definidos por el gasto energético que cuyos valores se encontraron entre -0.4 hasta -8.6 kcal/mol y las interacciones entre los aminoácidos del sitio activo y el ligando por medio de enlaces eléctricos, entre las mejores moléculas evaluadas se encontraron, Quercetin -8.6 kcal/mol (*Rivea corymbose* (L.) Hallier f.), Squalene -8.4 kcal/mol (*Marsdenia condurango* Rchb. f. Bark) y Tapsine -8.3 kcal/mol (*Uncaria tomentosa* (Will.) DC). Con esta técnica de Docking molecular se puede realizar experimentación a bajo costo y de alto valor científico en la búsqueda de nuevos fármacos.

Palabras Clave: Bioinformática**,** Docking molecular, Ácido araquidónico

Abstract

Inflammation is a mechanism of self-regulation and tissue repair when faced with an agent that can affect homeostatic processes. When inflammatory processes are deregulated by an overexpression of the COX-2 enzyme, inflammation can present itself as an autoimmune disease. The objective of this study was to find possible COX-2 inhibitors using active principles, in which 50 active principles of medicinal plants of Ecuadorian origin were used, and a PDB model of the COX-2 enzyme, by means of the technique of molecular Doking or molecular coupling in Virtual Screening, through free access software, the results that were found in the study were defined by the energy expenditure whose values were found between -0. 4 to -8.6 kcal/mol and the interactions between the amino acids of the active site and the ligand by means of electrical bonds, among the best evaluated molecules were Quercetin -8.6 kcal/mol (*Rivea corymbose* (L.) Hallier f.), Squalene -8.4 kcal/mol (*Marsdenia condurango* Rchb. f. Bark) and Tapsine -8.3 kcal/mol (*Uncaria tomentosa* (Will.) DC). With this molecular docking technique, low-cost experimentation of high scientific value can be carried out in the search for new drugs.

Keywords*:* Bioinformatics, Molecular docking, Arachidonic Acid

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es el sistema principal apto para la reparación del tejido tras una lesión como, traumatismos, contusiones incluso lesiones de índole viral, temperaturas extremas y radiación ionizante, cuya finalidad es combatir el agente que causa la lesión. Su actividad radica en una cascada bioquímica celular y microvascular que promueven la eliminación de tejido dañado y la restauración del tejido (Schmid-Schönbein, 2006; Daruna, 2012; Hill & Venna, 2014). La falla de este mecanismo provoca una inflamación desregulada, estimulando que una inflamación aguda

pueda derivar en crónica, producto de una migración descontrolada de células inflamatorias como linfocitos, macrófagos y células plasmáticas (King, 2007; McManus & Mitchell, 2014; Kradin et al., 2016).

En este contexto es importante destacar que parte del proceso que se desarrolla, es debido a la sobre expresión de mediadores inflamatorios que intervienen en la señalización celular y por consiguiente en migraciones desreguladas de células inflamatorias (Jantan et al.,2021). Provocando que la inflamación crónica se implique en enfermedades con altos niveles de morbilidad (Gopalan & Kirk, 2022).

Es así, que a nivel metabólico existen diferentes vías, por medio de las cuales el sistema inmunológico logra de forma natural y/o inducida controlar estos procesos. Entre las vías metabólicas se tienen lipoxigenasa (LOX), citocromo P450-CYP (CYP450), involucrados en la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas denominados eicosanoides proinflamatorios por su origen en el ácido eicosapolienoico. Por último, tenemos a las isoformas de la ciclooxigenasa (COX 1/2) importantes rectores de los procesos inflamatorios, que intervienen en la síntesis de prostaglandinas, prostanoides y tromboxanos, a través de la oxidación del ácido araquidónico (Piper & Garelnabi, 2020).

Por consiguiente, el ácido araquidónico (AA) y sus metabolitos sintetizados por la ciclooxigenasa-2 (COX-2) o, ciclooxigenasa-1 (COX-1) se convierten en las moléculas que intervienen en la señalización, control inflamatorio y la activación de células del sistema inmune (Tooker et al., 2022). Por medio de la llamada cascada de ácido araquidónico, que libera AA desde los fosfolípidos de membrana mediante la interacción con la enzima fosfolipasa A citosólica2α (cPLA) (Fabian et al., 2021).

A través de los diferentes metabolitos que se sintetizan mediante la interacción entre COX-1 y el

AA en la cascada de activación, se promueve una estabilización en múltiples procesos homeostáticos en una seria amplia de tejidos (Stachowicz, 2021). No obstante, la COX-2 se encargará de metabolizar el AA, en prostaglandinas y tromboxanos estimulado por procesos inflamatorios como el daño tisular, infecciones virales, y el desarrollo tumoral por medio de la sobreexpresión de prostaglandina E2 (PGE2) enzima que repercute en la metástasis celular (Dibia et al., 2022).

Si bien, ya existen tratamientos terapéuticos a base de fármacos, suelen presentar efectos adversos producto de una expresión no deseada en otros sistemas, por lo tanto, no solo se debe evaluar su especificidad, sino también la tolerancia y seguridad (Berger & Iyengar, 2010). Este es el motivo por el cual los principios activos de las plantas medicinales se convierten en los primeros agentes a estudiar, por sus cualidades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias, mediante la regulación de múltiples vías de señalización celular (Batiha et al., 2020; Wang et al., 2021).

A pesar de que en el Ecuador las inversiones en investigación y desarrollo no superan el 0.55% del PIB y en el 2018 disminuyó un 0,11% siendo incapaces de llegar al 1% cifra propuesta por la UNESCO (Senescyt 2018), los investigadores se ven en la obligación de buscar nuevas maneras de contribuir al desarrollo científico del país, entre las cuales podría encontrarse la Bioinformática. Bajo esta nueva herramienta se busca que al utilizar laboratorios virtuales con herramientas computacionales abrir la posibilidad de realizar modelos teóricos probabilísticos a base de software gratuitos o de paga, siendo usados en el análisis de bases moleculares, y la búsqueda de nuevos fármacos (Maloy, S., & Hughes, K., 2013; Ranganathan, et al., 2018).

Con respecto a la búsqueda de nuevos fármacos, destaca una herramienta, molecular docking o acoplamiento molecular, que por medio del mapeo de posibles interacciones estables entre el objetivo y la molécula que se desea acoplar a través de un modelo tridimensional de carácter

predictivo, que permite realizar diversas interacciones como proteína-ligando, proteína-proteína e incluso material genético entre proteína o ligando (Pagadala et al., 2017).

Por lo anteriormente expuesto el objetivo de este estudio teórico es evaluar los posibles inhibidores de la COX-2, mediante la interacción con 50 principios activos de 17 plantas medicinales de origen ecuatoriano con una amplia presencia en las regiones Sierra y Amazonía, mediante el uso de programas moleculares de acoplamiento, los cuales permitirán predecir la orientación, afinidad e interacción de un ligando en el sitio de unión especifico de una proteína.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño del estudio.

Estudio computacional de carácter comparativo, que evalúo las interacciones entre 50 principios activos y la enzima COX-2 tras el diseño tridimensional de los principios activos y su interacción con la proteína COX-2 en un entorno virtual, mediante la técnica de acoplamiento molecular.

2.2 Selección del modelo proteico

La selección de los potenciales modelos tridimensionales, se realizó por medio de la base de datos de estructuras proteicas PDB, Protein Data Bank (rcsb.org), especificando que su origen en la búsqueda sea enzimas COX-2 de Homo sapiens, puesto que los ensayos teóricos de las moléculas están destinados al posible uso en humanos.

Después de descargar las estructuras proteicas, se recurre al programa en línea PROCHECK (saves.mbi.ucla.edu), para determinar la calidad de los modelos mediante un análisis estereoquímico de las proteínas seleccionadas, como se observa en la **Tabla 1**, por medio de la

gráfica Ramachandran que predice distintos tipos de parámetros estereoquímicos de la organización proteica (Sobolev et al., 2020).

Tabla 1

Información de las Estructuras Tridimensionales de COX-2

Proteína	Ligando	Resolución	Método	Ramachandran	Referencias
5F19	2-acetamido-2-desoxi-beta-D-glucopiranosa	2.04 Å	X-ray diffraction	90.7%	Lucido, M.J., Orlando, B.J., Malkowski, M.G.
5IKV	2-[[3-(trifluoromethyl) phenyl]amino] benzoic acid	2.51 Å	X-ray diffraction	89.4%	Orlando, B.J., Malkowski, M.G.
5IKT	2-[(3-chloro-2-methylphenyl)amino]benzoic acid	2.45 Å	X-ray diffraction	89.5%	Orlando, B.J., Malkowski, M.G.
5IKR	2-[(2,3-dimethylphenyl)amino]benzoic acid	2.34 Å	X-ray diffraction	90.0%	Orlando, B.J., Malkowski, M.G.
5IKQ[a]	2-[(2,6-dichloro-3-methyl-phenyl)amino]benzoic acid	2.41 Å	X-ray diffraction	90.2%	Orlando, B.J., Malkowski, M.G.
5KIR	Rofecoxib	2.70 Å	X-ray diffraction	88.3%	Orlando, B.J., Malkowski, M.G.
5F1A	2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose	2.38 Å	X-ray diffraction	89.5%	Lucido, M.J., Orlando, B.J., Malkowski, M.G.

Nota. Los valores de la resolución obtenidos en el PDB en combinación con el porcentaje de Ramachandran que debe ser mayor al 90%, permite seleccionar el mejor modelo proteico.

[a] En este caso se seleccionó el modelo 5IKQ ya que, su resolución es alta y su porcentaje de Ramachandran es aceptable.

2.3 Digitalización de los principios activos

La digitalización se realizó utilizando información bibliográfica de los principios activos de plantas con usos farmacológicos presentados en la **Tabla 2**. En el proceso de construcción de los modelos estructurales de los principios activos, se recurrió a la base de datos

de moléculas químicas PubChem (pubchemdocs.ncbi.nlm.nih.gov). Para la obtención de los canonical SMILES de cada molécula con la finalidad de estructurarlas en un plano tridimensional con el software de dibujo de moléculas químicas Chemsketch (Norinder et al., 1997).

El diseño estructural de cada molécula se descargó en formato.mol que contiene la descripción de la estructura química de cada compuesto. Posteriormente, el archivo en formato. mol generado fue subido al programa de modelado molecular Vega ZZ versión 3.2.2.20 (Pedretti & Vistoli, 2006). Con la finalidad de optimizar la geometría, minimización de energía, fijar las cargas atómicas, atribución de cargas atómicas, el ajuste de las coordenadas tridimensionales y la posterior descarga en formato .pdb este formato es el descriptivo de las características completas de una molécula tridimensional basada en el Protein Data Bank.

Para finalizar el archivo de cada molécula en formato .pdb se subió al software AutoDockTools versión 1.5.6 Sep_17_14 (Morris et al., 2009). Y se modificó en un formato .pdbqt que es el formato de interacción para el proceso de Docking.

Tabla 2

Lista de Principios Activos con Posible Potencial Antiinflamatorio Presentes en Plantas del Ecuador.

Nombre científico	Principio activo
Arenaria jamesoniana Rohrb.	Arenarin A 1-(7-Methoxy-9H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)ethan-1-one
Annona squamosa L.	Bullatacin Murisolin Squamocin
Agave americana L.	Aloe emodin
Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken	Bryophyllin A Bryophyllin B
Banisteriopsis caapi (Spruce ex Griseb.) C.V. Morton	N,N-Dimethyltryptamine
Casearia sylvestris Sw. Leaves	Casearin L Casearin O Casearvestrin A

	Casearvestrin B
	Casearvestrin C
Cinchona officinalis L	Chloroquine
Croton lechleri Mull. Arg Sap Bark Leaves	3',4-O-Dimethylcedrusin
	4,5-Dihydroblumenol A
	4-O-Methylcedrusin
	Catechin
	Epigallocatechin
	Epigallocatechin-4-8
	Procyanidin B1
Licania intrapetiolaris Spruce ex Hook. f.	Cucurbitacin B
	Intrapetacin A
Marsdenia condurango Rchb. f. Bark	1-Caffeoylquinic acid
	4-Coumarate
	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde
	4-Hydroxycinnamic acid
	β-sitosterol
	Cichoriin
	Coumarin
	Saponarin
Minquartia guianensis Aubl.	Erythrodiol
	Minquartynoic acid
	Oleanolic acid
	Squalene
	Taraxerol
Monnina obtusifolia H.B.K. Aerial parts	1,3,6-Trihydroxy-2,5-dimethoxyxanthone
Prestonia mollis Kunth	Condurango glycoside A
	Tetrahydroharmine
Psychotria viridis Ruiz & Pav.	3,4-Methylenedioxymethamphetamine
	18,19-Dihydroangustine
Rivea corymbose (L.) Hallier f.	Psilocybine
	Quercetin
	Quinine
Senna multiglandulosa (Jacq.) H.S. Irwin & Barneby	Floribundone
	Physcion
Uncaria tomentosa (Will.) DC	Isomitraphylline
	Isopteropodine
	Tapsine
	Uncarine

Fuente. Esta tabla ha sido adaptada de ¨ Medicinal plants of Ecuador: a review of plants with anticancer potential and their chemical composition¨ de N. Moscoso, J. Benavides, F. Imaicela, P. Wegman, 2015, *Medicinal Chemistry Research 24*(6), 2283–2296. https://doi.org/10.1007/s00044-015-1335-7

2.4 Docking molecular

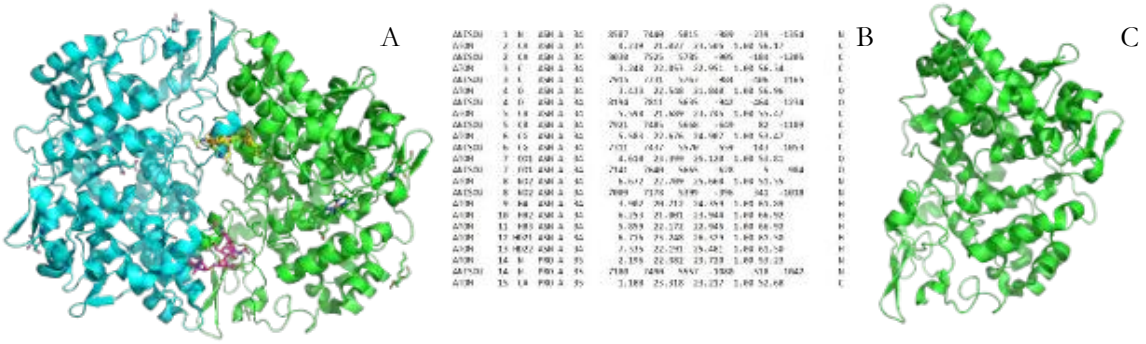
Se preparó la estructura proteica de COX-2 previamente seleccionada, con la finalidad de

limpiarla de moléculas de agua, cadenas proteicas que no son de interés para el objetivo de estudio. Posteriormente se ubicó la posición del ligando para removerlo del sitio activo en donde se realizó la interacción entre los principios activos y la proteína 5IKQ de COX-2.

Se abrió el archivo de la molécula proteica en formato .pdb en el bloc de notas de Windows, esto permitió editar la información de la molécula, con la finalidad de realizar un proceso de depurado que optimiza la proteína y disminuye el tiempo de procesamiento como se presenta en la **Figura 1**.

Figura 1

Optimización de la Estructura Proteica 5IKQ de COX-2 Mediante la Depuración de Información para el Docking Molecular



Nota. Estructura 3D de la molécula 5IKQ completa informacionalmente (A). Datos estructurales que serán suprimidos de la proteína modificada mediante el bloc de notas de Windows para su optimización (C). Cadena A de la proteína como resultado de la depuración del modelo proteico (B).

Con la proteína preparada se procedió a cambiar el formato del archivo de .pdb a .pdbqt y la incorporación de las cargas y la optimización de la molécula mediante el software gratuito AutoDockTools, con la finalidad de que el programa AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010) pueda interactuar sobre los datos de la proteína y del ligando.

Para este proceso de interacción entre la proteína 5IKQ y los 50 ligandos usamos la técnica Virtual Screening, mediate la cual se realizó las interacciones de los 50 ligandos con la proteína al mismo

tiempo. En este proceso se utilizó el ambiente virtual del programa de acceso gratuito VirtualBox versión 6.1.34 (GmbH, 2007). Simulando un sistema operativo versión Linux 64 bits, permitiendo un entorno virtual compatible con el programa AutoDock Vina, que fue usado para el acoplamiento molecular en el Virtual Screening.

Posteriormente se copió la proteína y los ligandos en una unidad USB externa en una carpeta que se ingresó en el VirtualBox en el cual previamente se integró el programa AutoDock Vina, mediante una ventana de comandos debe digitarse el código de activación del programa Vina " VINAv1.0.sh" posteriormente se abrirá una ventana de documentos, en la cual se guardó la información generada posterior al procesos de Virtual Screening en la misma unidad USB, en la misma ventana de documentos se seleccionó la proteína y la carpeta de ligandos.

Al final de este proceso se abre un fichero de configuraciones como se presenta en la **Figura 2**, en el cual se debe incorporar los datos del sitio activo de la proteína, mediante la localización del ligando que eliminamos de nuestra estructura proteica anteriormente, en el caso de la proteína 5IKQ es 2-[(2,6-dichloro-3-methyl-phenyl)amino] ácido benzoico, bajo la identificación de JMS en el archivo PDB previo a las modificaciones de la proteína, en el ligando de referencia se localizó el carbón central y extraemos la información en el fichero de configuraciones, cada proceso realizado se resume y esquematiza en la **Figura 3**.

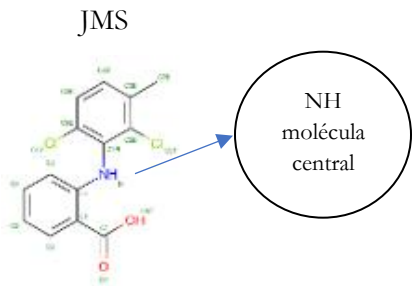
Figura 2

Fichero de Configuraciones del Sitio Activo de la Proteína 5IKQ para la realización del Virtual Screening

A center_x = 19.271
center_y = 55.089
center_z = 19.764

B size_x = 30
size_y = 30
size_z = 30

C exhaustiveness = 8

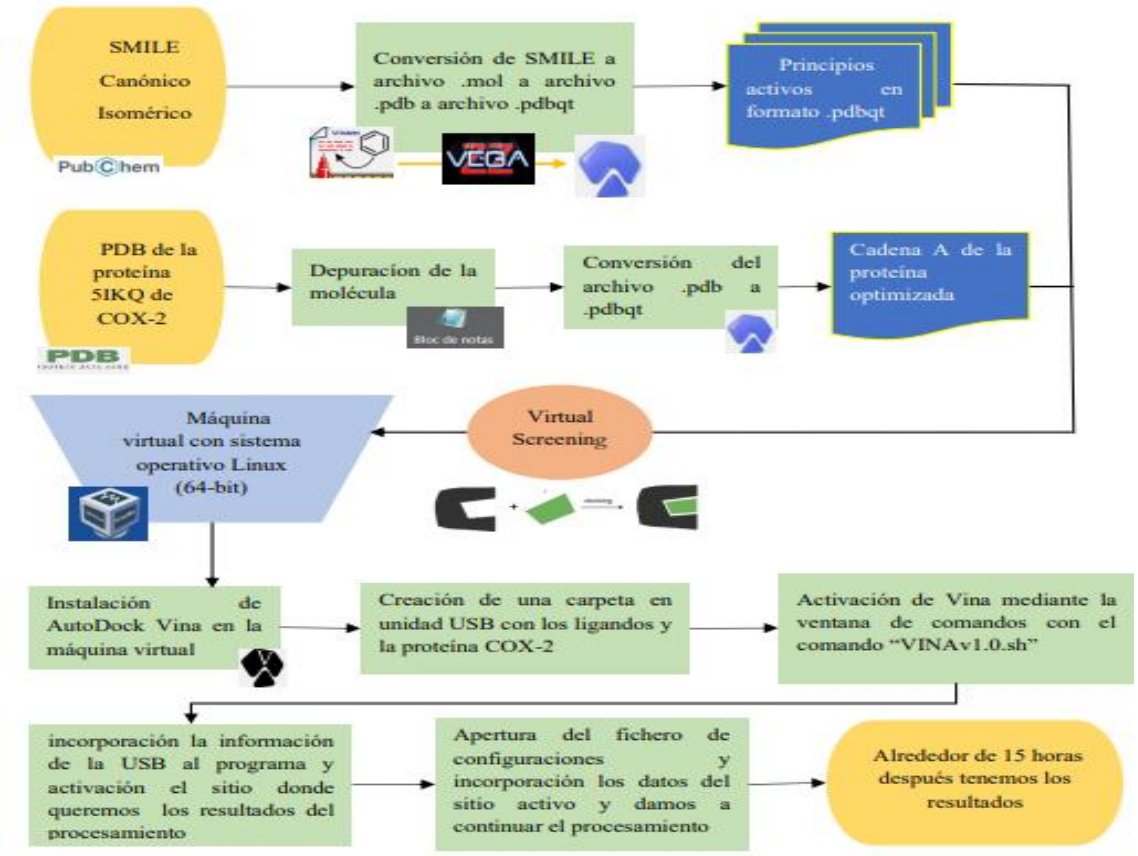


Nota. El fichero contiene la información del sitio activo de la proteína basado en la molécula central del ligando JMS. Representación en un Plano Tridimensional de la posición central del ligando en el pdb de la proteína COX-2 (A). Numero de moléculas que conforman el ligando (B). Numero de análisis sugerido por Vina (C).
Fuente. (Trott & Olson, 2010).

En el proceso de Virtual Screening se utilizó una laptop modelo HP Notebook con un tipo de sistema PC basado en x64 y un procesador Intel(R) Core (TM) i5-5200U CPU @ 2.20GHz, 2201 Mhz, 2 procesadores principales, 4 procesadores lógicos con una memoria física instalada (RAM) 4,00 GB. Limitando la capacidad de procesamiento y aumentando el tiempo de espera en 15 horas para obtener los resultados experimentales.

Figura 3

Procedimiento de Dicking Molecular en Virtual Screening

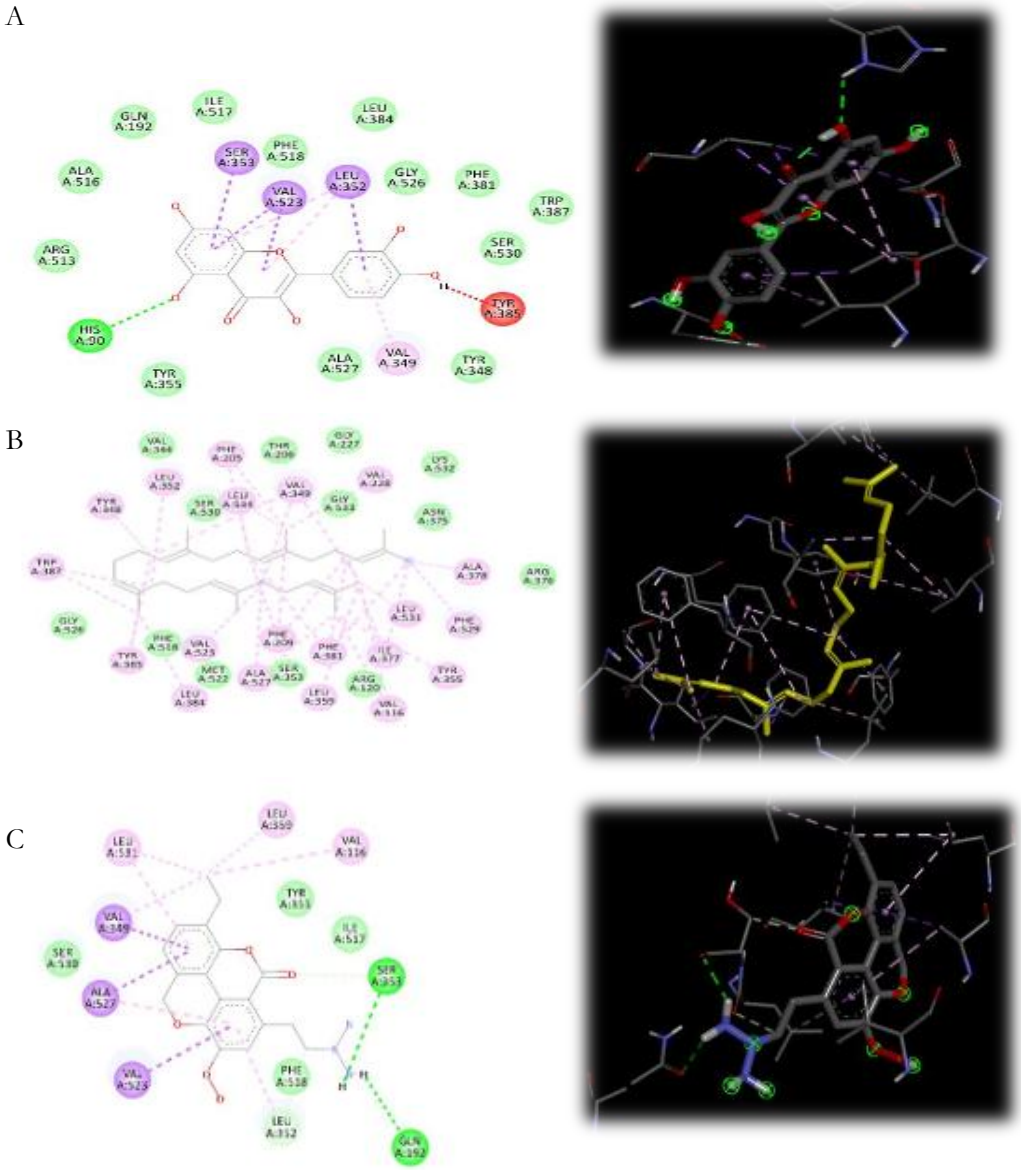


3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis de las interacciones ligando receptor, posterior al Virtual Screening de las mejores interacciones moleculares.

Figura 4

Diagrama de Acoplamiento Molecular de Compuestos Bioactivos a Objetivo Central de la Proteína COX-2.



Nota. Diagrama de interacción 2D de la proteína COX-2 con Quercetin (A) Squalene (B) Tapsine (C)

En el diagrama de las interacciones de los ligandos con la proteína COX-2 **Figura 4**. Imagen A, se encontró que la Quercetina una Pentahidroxiflavona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3, 3'-, 4'-, 5- y 7 que en interacción con los aminoácidos (aa) del sitio activo de la proteína COX-2 intervinieron, SER-A:353, VAL-A:523, LEU-A:352 con enlaces de tipo π-sigma en interacción con el grupo funcional fenilo y el Benzopirano para LEU-A:352 mientras que para, VAL-A:523, SER-A:353 las interacciones se produjeron con el Benzopirano, que al ser un anillo aromático se promovió una región de abundantes electrones que aumentaron las fuerzas de interacción. Mientras que las interacciones de tipo π-alquilo entre la VAL-A:349 y la estructura aromática del grupo funcional fenilo mantuvieron un enlace débil y poco estable. TYR-A:385 presentó una interacción negativa que no produjo actividad receptora favorable, mientras que HIS-A:90 tuvo una interacción con el Hidróxido presente en el Benzopirano que promovió un enlace de tipo puente de hidrogeno que facilitó una gran estabilidad, debido a la fuerza de interacción que promueve este tipo de puente convirtiéndola en la interacción que mejor se acomodó al acoplamiento.

Con respecto a la **Figura 4**. Imagen B, se observa una representación bidimensional de las interacciones entre el ligando Squaleno, triterpeno que tiene seis dobles enlaces en las posiciones 2, 6, 10, 14, 18 y 22 de su estructura en cadena que al pasar por el proceso de acoplamiento molecular adquirió una conformación semi aromática y por ende una interacción con múltiples aa con enlaces de tipo π-alquilo por medio de una interacción de una nube de electrones que se superpone en un grupo aromático de electrones de tipo alquilo.

Por último, la representación 2D de las interacciones de la **Figura 4**. Imagen C, está el ligando Tapsine, en donde se observó múltiples interacciones de tipo π-sigma y enlaces de tipo π-alquilo

que presentaron una interacción con grupos aromáticos de tipo alquilo, para SER-A:353, GLN-A:192 se observó una interacción de tipo puentes de hidrogeno que represento la interacción de mayor fuerza de enlace y por ende el más estable.

3.2 Afinidad de los principios activos en el sitio activo de la proteína COX-2.

En el experimento se utilizó 50 principios activos de especies botánicas con amplia distribución en el Ecuador, los resultados tras el proceso de acoplamiento molecular fueros valores entre -0.4 hasta -8.6 kcal/mol, de los cuales se tomaron los resultados con mejor rango de interacción presentados en la **Tabla 3**, los valores proporcionados posteriores al Virtual Screening fueron representativos en cuanto sus valores sean más negativo (tendencia hacia los negativos) indicando mayor afinidad en este caso fue de -8.6 kcal/mol, pero en ocasiones se presentas de hasta -20 kcal/mol.

Tabla 3

Resultados del Acoplamiento Molecular de los Mejores Principios Activos en el Objetivo Central de la Proteína COX-2

Nombre científico	Principio activo	La energía de unión/kcal•mol−1	Sitio de enlace
Rivea corymbose (L.) Hallier f.	Quercetin	-8.6	HIS-A:90 SERA:353 VAL-A:523 LEU-A:352 VAL-A:349 TYR-A:385
Marsdenia condurango Rchb. f. Bark	Squalene	-8.4	TRP-A:387 TYR-A:348 LEU-A:352 LEU-A:534 PHE-A:205 VAL-A:349 VAL-A:228 ALA-A:378 TYR-A:385 LEU-A:384
Uncaria tomentosa (Will.) DC	Tapsine	-8.3	VAL-A:349 ALA-A:527 VAL-A:523 LEU-A:357 GLN-A:192 SER-A:353 VAL-A:116

3.3 Discusión de resultados.

Las herramientas bioinformáticas son cruciales para el cribado de grandes cantidades de información de posibles candidatos terapéuticos (Xia, 2017). Producto de la predicción in silico en el estudio de afinidades entre proteína-ligando (Meli et al., 2022). Estos recursos permiten el análisis comparativo de diversos compuestos químicos con orígenes amplios. Por lo tanto, se vuelve cada vez más importante incorporar el estudio in silico en los ámbitos experimentales de laboratorio.

La Tabla 3 presenta los valores máximos posteriores al virtual screening realizado en el sitio activo de la proteína COX-2 con resultados de un rango energético en Quercetin con -8.6 kcal/mol, en Squalene con -8.4 kcal/mol y Tapsine con -8.3 kcal/mol. Puesto que los valores más negativos son indicios de una interacción favorable, los resultados indican una satisfactoria posible capacidad inhibidora de la actividad enzimática de la proteína COX-2. Los valores se asemejan a experimentos similares en los cuales los rangos energéticos fueron de -7.8 a -10.6 kcal/mol en Docking con análogos de la fluorocurcumina (Padhye et al., 2009).

4. CONCLUSIONES

La actividad inhibidora de la Cox-2 fue evaluada mediante el análisis de 50 principios activos dando como resultado valores de interacción que se encontraron entre los rangos energéticos de -0.4 y -8.6 kcal/mol, permitiendo un mejor acoplamiento y estabilidad molecular en tres posibles inhibidores, Quercetin -8.6 kcal/mol (*Rivea corymbose* (L.) Hallier f.), Squalene -8.4 kcal/mol (*Marsdenia condurango* Rchb. f. Bark) y Tapsine -8.3 kcal/mol (*Uncaria tomentosa* (Will.) DC). El estudio señaló el potencial farmacológico de los principios activos presentes en especies botánicas de origen ecuatoriano, mediante la técnica de acoplamiento molecular en el descarte de compuestos de bajo potencial terapéutico. Sin embargo, es importante incluir estudios

de tipo (Q)SAR, dinámica molecular y estudios in vitro antes de permitir su producción.

REFERENCIAS

1. Hill, J. A., & Venna, N. (2014). Human herpesvirus 6 and the nervous system. Neurovirology, 327–355. https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53488-0.00016-x
2. McManus, L. M., & Mitchell, R. (2014). Pathobiology of Human Disease. Elsevier Gezondheidszorg. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01808-6.
3. Kradin, M. D. D. T. M. H., & Richard L. Kradin, M. D. D. T. M. H. (2016). Understanding Pulmonary Pathology. Elsevier Gezondheidszorg. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801304-5.00003-4.
4. King, T. C. (2007). Elsevier's Integrated Pathology. Elsevier Gezondheidszorg. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04328-1.50008-5.
5. Jantan, I., Haque, M. A., Arshad, L., Harikrishnan, H., Septama, A. W., & Mohamed-Hussein, Z. A. (2021). Dietary polyphenols suppress chronic inflammation by modulation of multiple inflammation-associated cell signaling pathways. The Journal of Nutritional Biochemistry, 93, 108634. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108634
6. Gopalan, C., & Kirk, E. (2022). Biology of Cardiovascular and Metabolic Diseases. Elsevier Gezondheidszorg. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823421-1.00014-7.
7. Piper, K., & Garelnabi, M. (2020). Eicosanoids: Atherosclerosis and cardiometabolic health. Journal of Clinical & Translational Endocrinology, 19, 100216. https://doi.org/10.1016/j.jcte.2020.100216

8. Tooker, B. C., Kandel, S. E., Work, H. M., & Lampe, J. N. (2022). Pseudomonas aeruginosa cytochrome P450 CYP168A1 is a fatty acid hydroxylase that metabolizes arachidonic acid to the vasodilator 19-HETE. Journal of Biological Chemistry, 298(3), 101629. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101629

9. Fabian, J., Mergemeier, K., & Lehr, M. (2021). Evaluation of inhibitors of the arachidonic acid cascade with intact platelets using an on-line dilution and on-line solid phase extraction HPLC–MS method. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *155*, 106551. https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2021.106551

10. Stachowicz, K. (2021). Deciphering the mechanisms of regulation of an excitatory synapse via cyclooxygenase-2. A review. Biochemical Pharmacology, 192, 114729. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114729

11. Dibia, K. T., Igbokwe, P. K., Ezemagu, G. I., & Asadu, C. O. (2022). Exploration of the quantitative Structure-Activity relationships for predicting Cyclooxygenase-2 inhibition bioactivity by Machine learning approaches. Results in Chemistry, 4, 100272. https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100272

12. Berger, S. I., & Iyengar, R. (2010). Role of systems pharmacology in understanding drug adverse events. WIREs Systems Biology and Medicine, 3(2), 129–135. https://doi.org/10.1002/wsbm.114

13. Wang, W., Yao, Q., Teng, F., Cui, J., Dong, J., & Wei, Y. (2021). Active ingredients from Chinese medicine plants as therapeutic strategies for asthma: Overview and challenges. Biomedicine & Pharmacotherapy, 137, 111383. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111383

14. Batiha, G. E., Beshbishy, A. M., Ikram, M., Mulla, Z. S., El-Hack, M., Taha, A. E., Algammal, A. M., & Elewa, Y. (2020). The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. Foods (Basel, Switzerland), 9(3), 374. https://doi.org/10.3390/foods9030374

15. Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación. Senescyt (2018). Proyectos de I+D+i (4.a ed.). https://www.educacionsuperior.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/Proyecto-IDI_Senplades.pdf ep, 6.

16. Ranganathan, S., Nakai, K., & Schonbach, C. (2018). Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology. Elsevier Gezondheidszorg. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20410-X

17. Maloy, S., & Hughes, K. (2013). Brenner's Encyclopedia of Genetics. Elsevier Gezondheidszorg. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00155-8.

18. Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. Biophysical Reviews, 9(2), 91–102. https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1

19. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. (2000) The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242.

20. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of Applied Crystallography, 26(2), 283–291. https://doi.org/10.1107/s0021889892009944

21. Sobolev, O. V., Afonine, P. V., Moriarty, N. W., Hekkelman, M. L., Joosten, R. P., Perrakis, A., & Adams, P. D. (2020). A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. Structure, 28(11), 1249–1258.e2.

https://doi.org/10.1016/j.str.2020.08.005

22. Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2019). PubChem en 2021: nuevo contenido de datos e interfaces web mejoradas. Ácidos nucleicos Res., 49(D1), D1388–D1395. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971

23. Norinder, R., Osterberg, T., & Artursson, P. (1997). Chemsketch (Nº de versión versión 12.1.0.31258). Windows. Toronto, Canadá: ACD/Labs. Recuperado de https://www.acdlabs.com/resources/free-chemistry-software-apps/chemsketch-freeware/

24. Pedretti, A., & Vistoli, G. (2006). Vega ZZ (Nº de versión 3.2.2.20). Windows . Milán, Italia: Università degli Studi di Milano. Recuperado de https://www.ddl.unimi.it/cms/index.php?Software_projects:VEGA_ZZ

25. Morris, G., Huey, R., Lindstrom, G., Sanner, M., Belew, R., Goodsell, D., & Olson, A. (2009). AutoDockTools (Nº de versión 1.5.6 Sep_17_14). Windows . La Jolla, California: The Scripps Research Institute. Recuperado de https://autodock.scripps.edu/

26. Bailon-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., Tinitana-Imaicela, F., & Ostrosky-Wegman, P.(2015). Medicinal plants of Ecuador: a review of plants with anticancer potential and their chemical composition. *Medicinal Chemistry Research*, *24*(6), 2283–2296. https://doi.org/10.1007/s00044-015-1335-7

27. GmbH, I. (2007). VirtualBox (Nº de versión 6.1.34). Windows. Austin, Texas: Oracle Corporation. Recuperado de https://www.virtualbox.org/

28. O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with

a new scoring function, efficient optimization and multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) 455-461. Recuperado de https://vina.scripps.edu

29. Xia, X. (2017). Bioinformatics and Drug Discovery. Current Topics in Medicinal Chemistry, 17(15), 1709–1726. https://doi.org/10.2174/1568026617666161116143440
30. Meli, R., Morris, G. M., & Biggin, P. C. (2022). Scoring Functions for Protein-Ligand Binding Affinity Prediction Using Structure-based Deep Learning: A Review. *Frontiers in Bioinformatics*, *2*. https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.885983
31. Padhye, S., Banerjee, S., Chavan, D., Pandye, S., Swamy, K., Ali, S., Li, J., Dou, Q. P., & Sarkar, F. H. (2009). Fluorocurcumins as Cyclooxygenase-2 Inhibitor: Molecular Docking, Pharmacokinetics and Tissue Distribution in Mice. Pharmaceutical Research, 26(11), 2438–2445. https://doi.org/10.1007/s11095-009-9955-6
32. Kumar Vishwakarma, R., Negi, A., & Singh Negi, D. (2022). Anti-oxidant, COX inhibition activity of different extract of bark of Betula utilis and molecular docking analysis of its phytochemicals against COX-1 and COX-2 isoenzyme. Materials Today: Proceedings, 57, 251–258. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.02.497
33. Zilani, M. N. H., Islam, M. A., Biswas, P., Anisuzzman, M., Hossain, H., Shilpi, J. A., Hasan, M. N., & Hossain, M. G. (2021). Metabolite profiling, anti-inflammatory, analgesic potentials of edible herb Colocasia gigantea and molecular docking study against COX-II enzyme. Journal of Ethnopharmacology, 281, 114577. https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114577
34. Day, R. O., & Graham, G. G. (2004). The vascular effects of COX-2 selective inhibitors.

Australian Prescriber, 27(6), 142–145. https://doi.org/10.18773/austprescr.2004.119

35. Tołoczko-Iwaniuk, N., Dziemiańczyk-Pakieła, D., Nowaszewska, B. K., Celińska-Janowicz, K., & Miltyk, W. (2019). Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention – Review. Current Drug Targets, 20(3), 302–315. https://doi.org/10.2174/1389450119666180803121737

36. Wongrakpanich, S., Wongrakpanich, A., Melhado, K., & Rangaswami, J. (2018). A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. Aging and disease, 9(1), 143. https://doi.org/10.14336/ad.2017.0306

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Antecedentes

Kumar et al (2022). En el artículo: Antioxidante, actividad de inhibición de COX de diferentes extractos de corteza de Betula y análisis de acoplamiento molecular de sus fitoquímicos contra la isoenzima COX-1 y COX-2. Se analizo las posibles características inhibitorias selectivas de la proteína COX-2 de los principios activos de la planta Betula utilis. Mediante la técnica de acoplamiento molecular entre las moléculas derivadas de la corteza de la planta y el sitio activo de la proteína. Dando como resultado un alto potencial de inhibir la COX.2 llegando a requerir un estudio de tipo in vitro para el desarrollo de un fármaco antiinflamatorio.

Mientras que Zilani et al (2021). Realizaron la investigación: Perfilado de metabolitos, antiinflamatorios, potenciales analgésicos de la hierba comestible Colocasia gigantea y estudio de acoplamiento molecular contra la enzima COX-2. Estudio que pretendió reconocer compuestos con potencial farmacológico, antiinflamatorio y analgésico derivados de la planta

Colocasia gigantea mediante el análisis de las interacciones con la proteína COX-2. Los principios activos fueron analizados por cromatografía líquida (HPLC) y Cromatografía de gases (GCMS) además la actividad antiinflamatoria y la actividad analgésica fueron evaluadas por experimentación in vitro, además de incorporar el acoplamiento molecular en las interacciones proteína-ligando. En los resultados del acoplamiento la biomolécula epicatequina resulto tener la mayor afinidad entre los compuestos encontrados.

5.2 Bases teóricas.

5.2.1 Inhibidores selectivos de la COX-2

Compuestos bioquímicos de diversos orígenes, que tienen como finalidad aliviar los síntomas inhibiendo eficazmente la síntesis de los catalizadores proteicos adversos, evitando efectos desfavorables producto de su especificidad al blanco terapéutico, mejorando su potencial uso farmacológico (Day & Graham, 2004).

5.2.2 Tipos de inhibidores selectivos

Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs)

Diversos fármacos de origen biológico, caracterizados por su potencialidad en el tratamiento antiinflamatorio, analgésico y antipiréticos, convirtiéndose en mediadores cruciales externos de la inhibición de prostaglandinas (Ho et al.,2018).

5.2.3 (NSAIDs) selectivos COX-2 aprobados por la FDA

Celecoxib

Disminuye el dolor y la inflamación, actuando como un inhibidor específico de la COX-2, lo que le atribuye funciones terapéuticas en enfermedades como dolor agudo, la gota, osteoartritis y artritis reumatoide entre otras afecciones vinculadas con la sobre expresión de prostaglandinas (Tołoczko et al., 2019).

5.2.4 Efectos adversos de los (NSAIDs)

Pueden presentarse una variedad de efectos adversos vinculados con la especificidad de los inhibidores, entre los efectos tenemos, problemas gasticos producto de la inhibición de la COX-, problemas cardiovasculares, problemas hepáticos (Wongrakpanich et al.,2018).