

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Diseño *in silico* de una nueva molécula antagonista de la VIH proteasa basada en
Calixaminas y Calixolanos



María Estefanía González Álvarez

Química Farmacéutica

Guatemala, agosto de 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Diseño *in silico* de una nueva molécula antagonista de la VIH proteasa basada en
Calixaminas y Calixolanos



Informe final

Presentado por
María Estefanía González Álvarez

Para optar al título de
Química Farmacéutica

Guatemala, agosto de 2015

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Lcda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores de León	Vocal V

“Καλεπα τά καλα”
“Khalera tà kalá”

AGRADECIMIENTOS

A Dios	Por ser mi norte, no dejarme caer y estar a mi lado siempre. Porque juntos tu y yo somos mayoría aplastante. x Xto +, + y +.
A la Virgen María	Por cubrirme siempre con tu manto y no abandonarme.
A mi papá Ramiro	Porque no todos los héroes usan capa, el mío usa boinas, gracias por su apoyo incondicional, porque sin su “poco a poco” no hubiera podido llegar tan lejos. Lo amo.
A mi mamá Julia	Porque te volviste a graduar de maestra conmigo hace unos años y hoy te estas graduando de QF conmigo, gracias por tu paciencia infinita y tu amor incondicional. Te amo.
A mis hermanas Dany y Liza	Mis niñas, gracias por estar conmigo siempre, por sus porras, su preocupación, por estar en los buenos y en los malos momentos. Las amo.
Mis abuelitas Haydeé y Carmen	Por sus sabios consejos, por sus historias, por su amor, su rica comida, por consentirnos siempre. Patía si algún día llego a tener la mitad de la fe que tu tienes me considerare una mujer afortunada. Abuelita Carmen gracias por hacer las vacaciones más alegres y divertidas. Las amo.
Tío Agustín	Gracias por su apoyo, sus consejos, por compartir sus conocimientos, por además de tío, ser hermano grande y amigo. Lo amo.
A mi familia	Tía Elisita y Adelita gracias por ser ejemplo de dedicación, ser ejemplo de amar lo que se hace y sobre todo por ser ejemplo de seguidoras de Cristo, y dar ese sí como la

Virgen María. Gracias a todos mis tíos y primos por estar siempre pendientes y por sus porras.

A Juan Antonio

Por darme el último empujoncito que necesitaba. Gracias por compartir tu vida conmigo, espero que sea el primero de muchos logros que compartamos juntos.

A mis amigos

Azu, Sintia, Karen, Julia, Margarita, Ana, Byron, Sara, Gaby, Cazali, Carmen, Noemí, Andrea, Pablo, Carlos, Sergio, Josselyn, Maggie, Nadia, Heidi, Renato, José, Rafa, gracias por compartir risas, estreses buenos y malos momentos, gracias a los que iniciaron este viaje conmigo, gracias a los que se unieron en el camino, y a los que lo están terminando hoy conmigo, es el inicio de muchos otros.

A Rony Letona

Gracias por tus conocimientos, por tu apoyo, por ser mi asesor extraoficial y no dejarme tirada a medio camino. Siempre estaré agradecida.

Al Departamento de Toxicología

Lcda. Magda, Lcda. Mayte, Faby, Gaby, Cinthya, Stella, Evelyn, Betty, Freddy y Don Víctor, en especial a la Lcda. Carolina Guzmán, por confiar en una extraña y brindarme una de las mejores oportunidades y experiencias de mi vida. Gracias por compartir sus conocimientos e incluirme en la familia de Toxi.

A mis asesores Lic. Omar Velásquez y Dra. Sully Cruz

Gracias por su ayuda, su apoyo y sus consejos.

A mi revisora Lcda. Lucrecia de Madriz

Gracias por sus sabios consejos para hacer este trabajo de investigación un mejor trabajo.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

Por brindarme un lugar entre sus miles de estudiantes.

A la Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacia

A todos

En especial a la Escuela de Química
Farmacéutica por formarme
profesionalmente en estos años.

Los que de alguna manera fueron parte de
este maravilloso viaje.

Perdón si por las prisas no escribí su
nombre, todos tienen un lugar especial en mi
corazón.

DEDICATORIA

τί κοινότατον; Ἐλπίς. Καὶ γὰρ οἷς ἄλλο μηδέν, αὕτη παρέσθη
Tí koinótaton? Elpís. Kai gàr hoís állo mēdén, aútē paréstē

"Because even to those who have nothing else, it is still nearby." — Thales

El filósofo y científico griego Tales de Mileto dejó un rico legado de frases, una de las más conocidas es “¿Qué es lo más común? La esperanza, pues la tienen incluso quienes no tienen nada más”.

En la Antigua Grecia, Elpis, la diosa griega de la esperanza jugó un rol principal en el mito de Pandora.

En la Antigua Roma era conocida como Spes a quien le construyeron múltiples templos.

Siguiendo adelante en la historia, miles de años después más al occidente el escritor Jostein Gaarder en su libro ‘La joven de las naranjas’ escribió “El soñar con algo improbable tiene un nombre. Lo llamamos esperanza”.

Hasta llegar a la actualidad en donde escritores como Rick Riordan en su serie ‘Los héroes del Olimpo’, le rinde tributo al Día de la esperanza celebrado el 1 de agosto, en este día la humanidad pone su esperanza al máximo.

Finalmente llegando al presidente Snow en la película de Los Juegos del Hambre, quien afirma “Esperanza... es lo único más fuerte que el miedo”.

A pesar de provenir de diferentes culturas y creencias, en el paso de miles de años, todas estas frases, historias y nombres tienen algo en común “Esperanza”, esta ha jugado un papel importante en la humanidad y ha inspirado a muchos a no darse por vencidos, brindándoles la fuerza que necesitaban para seguir adelante.

Así que este trabajo está dedicado a todas las personas que tenemos nuestra esperanza puesta en algo, sin importar que tan grande o que tan pequeño sea. A las que tenemos esperanza en encontrar una cura para el VIH. Los que tenemos la

esperanza de encontrar un tratamiento más accesible, para todas las enfermedades alrededor del mundo. Para los que tenemos la esperanza de cambiar el mundo con trabajos de investigación. Los que tenemos la esperanza de cambiar vidas dando amor a los bebés en los hospitales. Los que tenemos la esperanza que un día dejaran de haber personas en las calles y en los semáforos sufriendo. Los que tenemos la esperanza de cambiar el mundo de las personas que nos rodean, brindando ayuda y amor. Los que tenemos la esperanza de construir colegios, asilos y orfanatos para poder hacer la diferencia en el mundo de alguien. Los que tenemos la esperanza de escribir un libro que le cambie la vida a alguien. Para los que tenemos la esperanza de que este mundo sea un lugar mejor a través de nuestros actos de caridad y de amor. Para todos los corazones que han olvidado creer, porque cuando no hay nada más, la esperanza es lo único que queda.

“Que el Dios de la esperanza los llene de toda alegría y paz a ustedes que creen en Él, para que rebosen de esperanza por el poder del Espíritu Santo”.

Romanos 15:13

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE IMÁGENES	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1 Investigaciones sobre Tamizaje Molecular Virtual y VIH en Guatemala:	5
3.2 Investigaciones sobre Calixaminas y Calixolanos:.....	7
3.2.1 Calixaminas:.....	7
3.2.2 Calixolanos:.....	9
3.3 VIH Proteasa:.....	10
3.3.1 Descripción de la VIH proteasa:.....	10
3.3.2 Complejos de VIH Proteasa:	12
3.3.3 Subsitios de los sitios de Unión de los Inhibidores:	12
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 General	16
5.2 Específicos.....	16
6. HIPÓTESIS.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
7.1 Hardware.....	18
7.2 Software	18
7.3 Procedimiento	19
7.4 Metodología y Diseño Estadístico	19
8. RESULTADOS	21
9. DISCUSIÓN	54
10. CONCLUSIONES	58
11. RECOMENDACIONES.....	60
12. REFERENCIAS.....	61
13. ANEXOS	65

13.1 Marco Teórico	65
13.2 Virus de Inmunodeficiencia Humana VIH	65
13.2.1 Epidemiología:	66
13.2.2 Manifestaciones Clínicas:	69
13.2.3 Diagnóstico de la Infección por VIH:	71
13.2.4 Fisiopatología y Patogenia:	74
13.2.5 Genoma del VIH:	81
13.3 Antiretrovirales que Inhiben a la VIH Proteasa:	85
13.4 Rol de Los Productos Naturales en el Descubrimiento de Nuevos Medicamentos:	90
13.5 Tamizaje Molecular Virtual:	93
13.6 Diseño de Novo:	97
13.7 Docking:	102
13.7.1 Pasos para el Docking.....	103
13.7.2 Comparación entre AutoDock 4 y AutoDock Vina:	104
13.8 Bibliotecas Virtuales:	106
13.9 QSAR y ADME/Tox	107
13.10 Bioenergética y termodinámica.....	111
13.10.1 Las transformaciones biológicas de energía obedecen las leyes de la termodinámica.....	111
13.10.2 Las células precisan fuentes de energía libre	114

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1 Molécula 1 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A.....	28
Imagen 2 Molécula 2 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A.....	28
Imagen 3 Molécula 3 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A.....	29
Imagen 4 Molécula 4 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A.....	29
Imagen 5 Molécula 5 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A.....	30
Imagen 6 Molécula 6 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A.....	30
Imagen 7 Molécula 7 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A.....	31
Imagen 8 Molécula 8 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A.....	31
Imagen 9 Molécula 9 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A.....	32
Imagen 10 Molécula 10 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A.....	32
Imagen 11 Comparación de las 10 mejores moléculas creadas utilizando LigBuilder a partir de la Calixamina A.....	33
Imagen 12 Molécula 1 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B.....	34
Imagen 13 Molécula 2 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B.....	34
Imagen 14 Molécula 3 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B.....	35
Imagen 15 Molécula 4 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B.....	35
Imagen 16 Molécula 5 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B.....	36
Imagen 17 Molécula 6 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B.....	36
Imagen 18 Molécula 7 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B.....	37
Imagen 19 Molécula 8 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B.....	37
Imagen 20 Molécula 9 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B.....	38
Imagen 21 Molécula 10 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B.....	38
Imagen 22 Comparación de las 10 mejores moléculas creadas utilizando LigBuilder a partir de la Calixamina B.....	39
Imagen 23 Molécula 1 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A.....	40
Imagen 24 Molécula 2 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A.....	40
Imagen 25 Molécula 3 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A.....	41
Imagen 26 Molécula 4 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A.....	41
Imagen 27 Molécula 5 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A.....	42
Imagen 28 Molécula 6 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A.....	42

Imagen 29 Molécula 7 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A.....	43
Imagen 30 Molécula 8 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A.....	43
Imagen 31 Molécula 9 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A.....	44
Imagen 32 Molécula 10 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A.....	44
Imagen 33 Comparación de las 10 mejores moléculas creadas utilizando LigBuilder a partir de la Calixolano A.....	45
Imagen 34 Molécula 1 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B.....	46
Imagen 35 Molécula 2 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B.....	46
Imagen 36 Molécula 3 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B.....	47
Imagen 37 Molécula 4 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B.....	47
Imagen 38 Molécula 5 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B.....	48
Imagen 39 Molécula 6 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B.....	48
Imagen 40 Molécula 7 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B.....	49
Imagen 41 Molécula 8 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B.....	49
Imagen 42 Molécula 9 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B.....	50
Imagen 43 Molécula 9 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B.....	50
Imagen 44 Comparación de las 10 mejores moléculas creadas utilizando LigBuilder a partir de la Calixolano B.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Función de Evaluación (Kcal/mol), Amprenavir	21
Tabla 2 Función de Evaluación (Kcal/mol), Atazanavir	21
Tabla 3 Función de Evaluación (Kcal/mol), Darunavir	22
Tabla 4 Función de Evaluación (Kcal/mol), Indinavir.....	22
Tabla 5 Función de Evaluación (Kcal/mol), Lopinavir	23
Tabla 6 Función de Evaluación (Kcal/mol), Nelfinavir	23
Tabla 7 Función de Evaluación (Kcal/mol), Ritonavir	24
Tabla 8 Función de Evaluación (Kcal/mol), Saquinavir	24
Tabla 9 Función de Evaluación (Kcal/mol), Tipranavir	25
Tabla 10 Función de Evaluación (Kcal/mol), Calyxamina A	25
Tabla 11 Función de Evaluación (Kcal/mol), Calyxamina B	26
Tabla 12 Función de Evaluación (Kcal/mol), Calyxolano A	26
Tabla 13 Función de Evaluación (Kcal/mol), Calyxolano B	27
Tabla 14 Función de Evaluación (Kcal/mol), 10 mejores moléculas creadas de Calyxamina A, Calyxamina B, Calyxolano A, Calyxolano B.....	27
Tabla 15 Medidas de similitud de las huellas digitales de las nuevas 20 mejores moléculas creadas vs. Los antiretrovirales ya existentes	52
Tabla 16.....	67
Tabla 17.....	67
Tabla 18.....	85
Tabla 19 Diferencias y Similitudes entre AutoDock Vina y AutoDock 4.....	105

1. RESUMEN

En este trabajo de investigación "Diseño *in silico* de una nueva molécula antagonista de la VIH proteasa basada en Calixaminas y Calixolanos" se buscó crear nuevas moléculas utilizando técnicas basadas en química computacional, con el objetivo de encontrar al menos una molécula derivada de las calixaminas y de los calixolanos capaz de inhibir a la VIH proteasa y que pudiera funcionar como un posible antiretroviral.

Las calixaminas y los calixolanos son compuestos que presentan características de alcaloides y de compuestos que podrían tener actividad biológica, por esta razón se utilizaron como fragmentos para crear nuevas moléculas que puedan funcionar como antiretrovirales que inhiban a la VIH proteasa.

Primero se utilizó el programa Autodock Vina se realizó el Docking de los antiretrovirales ya existentes y de las calixaminas y los calixolanos para tener una energía base con la cual comparar las energías de nuestros compuestos finales. Luego utilizando la técnica de Diseño de Novo, con el programa LigBuilder se crearon un total de 4,133 moléculas nuevas a partir de las calixaminas y de los calixolanos, al ya tener estas moléculas se les realizó un Docking para obtener su energía y compararla con la de los antiretrovirales ya existentes. Se tomaron las diez moléculas con mejor energía (es decir con energía mínima) de cada molécula y a estas moléculas se les realizó un análisis de similaridad de huellas digitales para evaluar que tan similar era la forma de las nuevas moléculas con la de los antiretrovirales que están en el mercado, en este análisis se tomaron en cuenta características como lo son: el peso molecular, los pares de átomos, etc.

Se encontraron 10 moléculas nuevas con energías cercanas y pesos moleculares similares a las energías de la línea base y a los pesos moleculares de los antiretrovirales ya existentes, siendo un derivado de la Calixamina A la que presentó una mejor energía con -12.2 Kcal/mol y siendo un derivado del Calixolano A el que

presentó mayor energía -10.6 Kcal/mol, estos entran en el rango de energía obtenidas de los antirretrovirales existentes, con pesos moleculares que van en el rango de 530.4076 g/mol a 719.6547 /mol siendo el del derivado de la Calixamina A con menor energía 695.3929 /mol. La similitud de las nuevas moléculas se evaluó utilizando un análisis QSAR, pero la similitud de las huellas digitales de las moléculas fue muy baja.

El parámetro que se utilizó para poder predecir el comportamiento de las nuevas moléculas fue el de la energía mínima (que se obtiene realizando los Dockings) y no el de la similaridad de huellas digitales debido a que se obtuvo una muy baja similaridad.

Se encontró al menos una molécula derivada de las calixaminas y calixolanos que mostraron afinidad por la VIH proteasa, estas no presentaron mayor similitud molecular con los inhibidores de la VIH proteasa ya existentes en el mercado, a excepción de los pesos moleculares que si mostraron similitud, para esto se utilizó tamizaje molecular virtual.

2. INTRODUCCIÓN

El VIH- SIDA es una patología que actualmente muchas personas la padecen y otras muchas han escuchado hablar de ella. Lamentablemente esta patología no tiene cura hasta el día de hoy y el tratamiento existente únicamente consiste en la administración de antiretrovirales. Estos les dan a las personas una mejor calidad de vida y la prolongan por algún tiempo indefinidamente dependiendo del avance de la enfermedad.

Existen diferentes tipos de antiretrovirales que actúan en diferentes partes del virus, como lo son los inhibidores de la VIH proteasa. Estos antiretrovirales se encargan de inhibir esta enzima y como consecuencia, las cadenas de aminoácidos no son cortadas. De este modo se inhibe la replicación del virus dentro de las células del huésped y únicamente se detiene la infección.

Es importante mencionar que este virus muta muy rápidamente, por esta razón es recomendable investigar nuevos fármacos que inhiban la replicación del virus, ya que este se vuelve inmune a los medicamentos con mucha rapidez. El desarrollo de un nuevo fármaco ha sido extremadamente costoso y ha llevado mucho tiempo.

En un país en desarrollo como Guatemala, no existen laboratorios farmacéuticos que se dediquen a la investigación de nuevos fármacos por la inversión inicial que se necesita. Sin embargo, en la actualidad se han ido creando nuevas técnicas de investigación que permiten que el desarrollo de estos fármacos no sea ni tan costoso ni tan prolongado. Una de estas técnicas se conoce como Tamizaje Molecular Virtual. Esta técnica consiste en evaluar ciertas moléculas que tienen o pueden tener bioactividad hasta encontrar una que cumpla con las expectativas

deseadas, basándose en un producto natural que será posteriormente derivatizado *in silico*.

Esta investigación se inició a partir de productos naturales que fueron derivatizados, con el objetivo de crear una base de datos de compuestos que fueron evaluados como posibles inhibidores de la VIH proteasa. Los productos naturales estudiados fueron los alcaloides Calixaminas y Calixolanos que provienen de la esponja marina *Calix podatypa*. De cada uno de estos alcaloides se obtuvo diez moléculas nuevas que pueden servir como posibles antiretrovirales que inhiban a la VIH proteasa.

3. ANTECEDENTES

Nuevas técnicas para el desarrollo de medicamentos se han ido desarrollando a lo largo de los años a nivel Internacional y una de estas técnicas es el Tamizaje Molecular Virtual. Esta consiste en evaluar ciertas moléculas que tienen o pueden tener bioactividad hasta encontrar una que cumpla con las expectativas deseadas, basándose en un producto natural que será posteriormente derivatizado *in silico*. Sin embargo al ser una técnica bastante nueva no se han realizado muchas investigaciones utilizando esta técnica. En Guatemala son muy pocas las personas que conocen acerca de este tema por lo que los trabajos de investigación realizados también son muy pocos.

3.1 Investigaciones sobre Tamizaje Molecular Virtual y VIH en Guatemala:

Vargas, R. (2012) realizó una investigación, en el cual su objetivo principal era obtener un diseño *in silico* de un fármaco que pueda ser utilizado como tratamiento antirretroviral contra el VIH-1 mediante la inhibición de la proteasa. Para esto el autor utilizó técnicas de nanotecnología computacional, que se fundamentan en relaciones cuantitativas de actividad- estructura en 3 dimensiones (3D-QSAR). Utilizó tres fármacos inhibidores de la proteasa (Lopinavir, Darunavir, Tipranavir), modeló sus estructuras en tres dimensiones y se evaluaron contra una enzima tridimensional, todo se realizó virtualmente. Posteriormente se diseñaron derivados de cada uno de los fármacos originales, los cuales fueron evaluados y probados, para dar como productos finales compuestos diseñados *in silico* con propiedades que cumplen biológicamente con varios factores y a que a su vez pueden ser sintetizados en un laboratorio químico.

Otro proyecto realizado por Carrazcosa, F. (2009) buscó obtener al igual que en la investigación anteriormente mencionada, el diseño de un fármaco que pudiera ser utilizado como tratamiento antirretroviral contra el VIH-1, mediante la inhibición eficaz de la proteasa. Esta investigación también se realizó utilizando

nanotecnología computacional y fue pionera en Guatemala. A partir de esta investigación el tema de nanotecnología computacional empezó a abrirse un pequeño camino en el mundo de la investigación.

Carrascoza J. y Paz M. (2008) describieron por medio de programas computacionales de enlace molecular automatizado (Autodock 4.01) cómo ocurren los mecanismos químicos de reacción entre los linfocitos TCD4+ y la glicoproteína gp120 presente en la cubierta de VIH-1, este primer acercamiento a los programas de modelaje molecular como herramienta nano tecnológica de descripción teórica, permitió observar los detalles bioquímicos de los mecanismos de reacción química que ocurren al interactuar el VIH y el linfocito TCD4 en sus membranas viral-celular (Vargas, R., 2012).

Carrascoza y colaboradores en 2009 desarrollaron un diseño molecular piloto para un análogo de un inhibidor de la Transcriptasa Reversa de tipo nucleosídicos, basado en las descripciones bioquímicas de la superficie molecular de la misma Transcriptasa Reversa presente en el VIH-1 y usando como plantilla de diseño las características farmacofóricas de Tenofovir. En este estudio adicionalmente se logró comprender los mecanismos de reacción bioquímicos que producen resistencia en la Transcriptasa Reversa a Tenofovir, para lo cual se pudo utilizar esta información para diseñar un fármaco que evadiera estos mecanismos de resistencia (Vargas, R., 2012).

Carrascoza (2008) en su informe final de tesis realizó una investigación titulada “Integración de linfocitos T CD4 con el segmento V3 de la glicoproteína 120 presente en el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1”, propuso una explicación a la conducta de la glicoproteína gp120, para ello utilizó programas computacionales de enlace proteína-ligando con el fin de obtener detalles de las reacciones bioquímicas existentes entre los epítopos de gp120 en VIH con el correceptor CCR5, con el fin de explicar la orientación entre CCR5 y gp120 que forman el complejo CCR5-gp120.

Esta investigación realizada es de suma importancia ya que la formación del complejo CCR5-gp 120 es una parte determinante en el ciclo de replicación del virus del VIH.

3.2 Investigaciones sobre Calixaminas y Calixolanos:

3.2.1 Calixaminas:

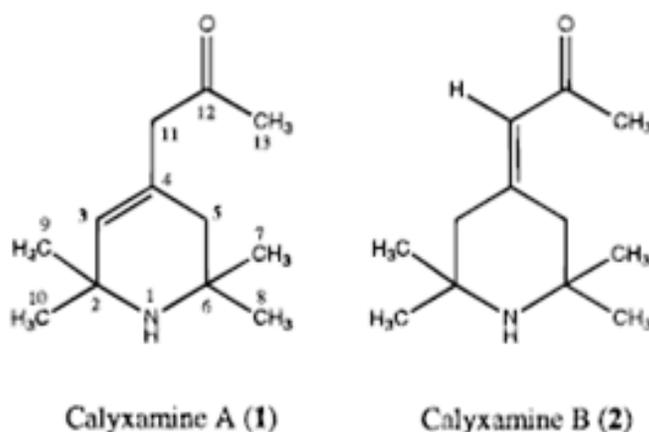
En 1982 se recolectó en el Mar Caribe, cerca de la Isla Mona en la costa oeste de Puerto Rico a la esponja marina *Calyx podatypa*, estos especímenes fueron guardados y liofilizados. Esta esponja es conocida por poseer una variedad de esteroides y series de compuestos heterocíclicos de seis miembros que contienen nitrógeno, como lo son las dicetopiperacinas y sales trisustituídas de N-metilpiridinio.

Se realizó una extracción de metabolitos utilizando varios solventes. En esta extracción se descubrieron nuevas moléculas de alcaloides conocidos como Calixaminas, como se determinaron dos tipos de calixaminas que posteriormente se identificaron como Calixaminas A y B, sus estructuras se pueden observar en la Imagen 8. Estas moléculas son alcaloides 2,2,4,6,6-pentasustituídos de piperidina y poseen un esqueleto de carbono nuevo.

El método más simple para la extracción de Calixaminas A y B en el laboratorio requiere la condensación de Me₂CO con NH₃ en presencia de un ácido catalizador, en este caso el ácido utilizado fue ácido trifluoroacético, luego estas estructuras fueron determinadas por los siguientes métodos espectroscópicos: la difracción de rayos X, cromatografía en capa fina y resonancia magnética nuclear. La Calixamina A se cristalizó a partir de mezclas de CHCl₃ - hexano, como agujas incoloras con una molécula de C₁₂H₂₁NO. CF₃CO₂H. La estructura de la Calixamina B también fue obtenida como un sólido blanco cristalino cuya estructura fue resuelta por Resonancia Magnética Nuclear.

Se realizaron diferentes pruebas utilizando Cromatografía en Capa Fina, la cual produjo resultados que aseguraban que estas moléculas no eran derivadas de alguna reacción de las diferentes extracciones que se realizaron, sino que eran moléculas que pertenecían a la esponja *Calyx podatypa* y que eran nuevos alcaloides que no habían sido descubiertos antes. Sin embargo no se puede descartar la posibilidad que la Calixamina B puede surgir de la isomeración inducida por un medio ácido de la Calixamina A. También es importante destacar que no se pudo determinar la bioactividad de las calixaminas en ese estudio, por falta de materiales (Rodríguez, Cóbar, Padilla, & Barnes, 1997).

Imagen 1
Calixaminas A y B



Fuente: Abimael D. Rodríguez O. M., 1997

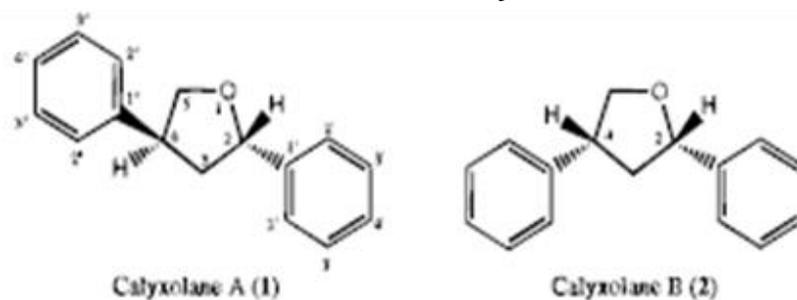
El interés particular en las calixaminas fue la nueva estructura hallada. Su actividad no se pudo comprobar, pero por su estructura de alcaloide, se esperaba que estas presenten alguna alguna actividad sobre algún proceso biológico. Posteriormente, estas moléculas se sintetizaron en un laboratorio y su bioactividad fue probada, al lado de la del eugenol, contra la acetilcolinesterasa. Los resultados apuntaron a que las calixaminas no presentaron actividad inhibitoria por sí mismas, únicamente el eugenol, demostrando así que las calixaminas no presentan actividad en lo que se refiere a efectos relacionados con trastornos neurológicos (Cóbar & Mencos, 2004).

3.2.2 Calixolanos:

Los Calixolanos A y B (sus estructuras se pueden observar en la Imagen 9) son compuestos 1,3-difenilbutanoides, también aislados de la esponja marina *Calyx podatypa* de Laubenfels (clase Demospongiae, orden Haplosclerida, familia Oceanapiidae). Estos especímenes fueron recaudados en Puerto Rico. Estas estructuras, al igual que las calixaminas, fueron determinadas a través de diferentes extracciones y el uso de métodos espectroscópicos.

De los especímenes liofilizados se extrajo la muestra por medio de extracciones con diferentes solventes, cromatografía en columna y finalmente por cromatografía en capa fina. La fracción de avance más lento fue obtenida fue purificada por cromatografía en columna utilizando silica gel y HPLC, obteniéndose así calixolanos A y B puros. Desafortunadamente, debido a la escasez de estos compuestos, no fue posible evaluar las actividades biológicas. Existen otros compuestos de este tipo, Colpol y Aplysillin, que han sido extraídos también de otros organismos marinos Alga marina Roja Colpomenia sinuosa y de la esponja marina *Aplysina fistularis fulva* respectivamente pero los calixolanos poseen características estructurales que no han sido reportadas por compuestos del mismo tipo (Rodríguez, Cobar, & Padilla, 1997).

Imagen 2
Calixolanos A y B



Fuente: Abimael D. Rodríguez O. M., 1997

3.3 VIH Proteasa:

Varios análisis que se le han realizado a la secuencia de nucleótidos del genoma de VIH-1 llevó al descubrimiento de que el virus codifica una proteasa aspártica, conocida como VIH proteasa (HIV-1 PR). La inactivación de HIV-1 PR por una mutación o inhibición química conduce a la producción de partículas virales inmaduras, no infecciosas, por lo que la función de esta enzima ha demostrado ser esencial para el ensamblaje del virión adecuado y la maduración (Wlodawer & Vondrasek, 1998).

Las proteínas que constituyen el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) se sintetizan como precursores en largas cadenas protéicas que deben ser cortadas para dar lugar a los componentes proteicos activos del virus maduro. La proteasa del VIH-1 es una proteasa con dos ácidos aspárticos en el centro activo cuya función es cortar las cadenas peptídicas que se sintetizan al traducir a proteínas el código genético del virus. Su naturaleza es homodimérica, es decir, se trata de un dímero formado por dos subunidades idénticas (Wlodawer & Vondrasek, 1998).

La topología general del monómero de la VIH-1 proteasa es similar a la de un único dominio en proteasas de tipo pepsina y aspártica, con la principal diferencia de que la interfaz del primer dímero se compone de cuatro hebras cortas, en lugar de seis filamentos largos presentes en las pepsinas (Wlodawer & Vondrasek, 1998).

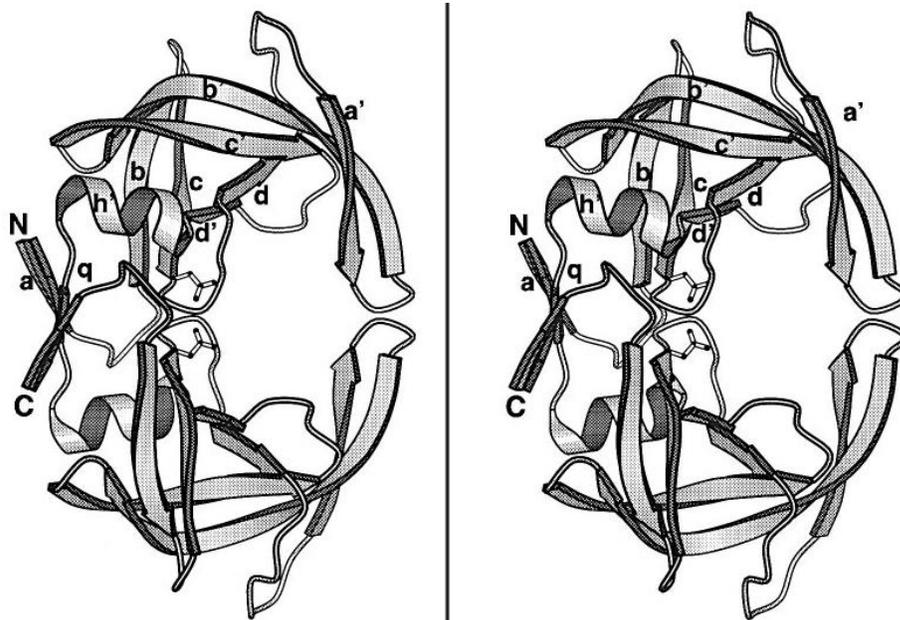
3.3.1 Descripción de la VIH proteasa:

La hebra- β *a* de la terminal N (residuos 1-4), forma la parte exterior de la interface de la lámina- β . La hebra- β *b* (residuos 5-9), continúa a través de un giro en la hebra- β *c*, que termina en el triple sitio activo (Asp25-Thr26-Gly27) como se observa en la Imagen 7. Siguiendo la vuelta del sitio activo, está la hebra- β *d*, que contiene residuos 30-35. En proteasas de tipo pepsinas, la hebra *d* es seguida por una hélice *h*. La segunda mitad de la molécula, está relacionada con la primera mitad por un eje doble intramolecular. Los residuos 43-49 forman la hebra- β *a'*, de la solapa. La otra hebra en la solapa (Residuos 52-58) forma parte de la larga cadena- β *b'* (Residuos 52-66). La cadena- β *c'* comprende los residuos 69-78, después de una

vuelta en los residuos 79-82, continua la hebra *d'* (Residuos 83-85) que lleva directamente a la hélice *h'* (Residuos 86-94). El patrón de enlaces de hidrogeno dentro de esta hélice es intermedio entre una hélice α y una hélice 3_{10} . A la hélice *h'* le sigue una hebra recta de terminal -C (Residuos95-99), que puede ser designada como *q* y que forma parte interna de la interfase del dímero. El triple sitio activo (Asp25-Thr26-Gly27) está localizado en una vuelta cuya estructura es estabilizada por un canal de enlaces de hidrogeno (Wlodawer & Vondrasek, 1998).

Los grupos carboxilatos de Asp25 de ambas cadenas muestran contacto cercano. El canal es bastante rígido debido a las interacciones (llamado fireman's grip), en el que cada Thr26 OG1 acepta un enlace de hidrogeno de la cadena principal NH de Thr26, de la vuelta opuesta. Thr26 también dona un enlace de hidrogeno al átomo O del grupo carbonil del residuo 24 de la vuelta opuesta (Wlodawer & Vondrasek, 1998).

Imagen 3
VIH Proteasa



Fuente: Alexander Wlodawer, 1998

3.3.2 Complejos de VIH Proteasa:

La unión de un inhibidor introduce importantes cambios conformacionales a la enzima. El movimiento global de las subunidades puede ser descrito como una rotación de hasta aproximadamente 2° alrededor de un eje de bisagra situado en la subunidad de la lámina- β de la interface. Este movimiento de rotación aprieta ligeramente la cavidad del sitio activo, también se acompaña de otro movimiento muy grande en la región de la solapa. La mayoría de los inhibidores, se unen en el sitio activo de la enzima en una conformación extendida de manera que cuando se superponen una sobre otra, sus elementos funcionales se alinean bastante bien en general. Los contactos entre la cadena principal de los inhibidores de la proteasa son casi uniformes para todos los complejos. Siguiendo un patrón similar, los enlaces de hidrogeno se hacen en su mayoría, entre las cadenas principales de ambos la enzima y el inhibidor. El grupo hidroxilo en la unión no divisible presente en los inhibidores, a excepción de los que contienen enlaces péptido reducidos isósteros, está posicionado entre los grupos carboxilos Asp25/Asp25' de la proteasa, dentro de los enlaces de hidrógeno a una distancia de al menos un oxígeno carboxilado de cada aspartato (Wlodawer & Vondrasek, 1998).

3.3.3 Subsitios de los sitios de Unión de los Inhibidores:

Un número de subsitios distintos que acomodan a las cadenas laterales de los inhibidores pueden ser identificados en VIH PR. Tres subsitios en cada lado del enlace no divisible (S1-S3 y S1'- S3') están muy bien definidos, mientras que los subsitios más distantes no están tan claros. Las cadenas laterales de la proteasa que comprenden los sitios S1 y S10, con excepción de los sitios activos del aspartato, son en su mayoría hidrófobos. Las cadenas laterales del sitio activo del aspartato y la cadena principal hidroxilo, de los inhibidores, tienen contactos polares (Wlodawer & Vondrasek, 1998).

Casi todos los inhibidores documentados tienen restos hidrófobos en P1 y P1', con la excepción de los inhibidores que contienen estatina y glicina, en donde ningún grupo ocupa el subsitio S1' de la proteasa. Aunque los sitios S2 y S2' son hidrófobos,

residuos hidrófilos e hidrófobos pueden ocupar estos sitios. Las cadenas laterales hidrofóbicas P2 y P2' se observan en diferentes orientaciones para los diferentes inhibidores, formando contactos con diferentes grupos en el sitio de unión a la enzima. Para inhibidores que contienen asparagina y glutamina, las cadenas de amida también son estabilizadas por contactos polares con el átomo oxígeno carbonílico del residuo previo en el inhibidor. Algunos contactos polares también se observan entre los grupos amidas P2/P2' y las cadenas laterales polares de la proteasa (Wlodawer & Vondrasek, 1998).

4. JUSTIFICACIÓN

Alrededor del mundo, aproximadamente 35 millones de personas sufren de VIH y más o menos un tercio de millón muere cada día a causa de lo mismo. Esta enfermedad, si bien ya ha podido ser controlada, sigue sin tener una cura. Lo más cercano que se ha hallado a una cura han sido los antirretrovirales, los cuales detienen la infección del virus. Estos, sin embargo, son costosos y de difícil acceso, en especial en un país como Guatemala. Más aún, el desarrollo de nuevos medicamentos para tratamientos especializados de mutaciones endémicas se convierte en una utopía.

Las calixaminas y los calixolanos son dos nuevos compuestos que han presentado características de alcaloides y de compuestos que pueden tener actividad biológica. En el caso de la VIH proteasa, estos no podrían funcionar como inhibidores directamente por su peso y volumen molecular, pero sí se pueden utilizar como fragmentos para la construcción de un nuevo antirretroviral, ya que al utilizar estas nuevas técnicas de desarrollo de fármacos se pueden probar moléculas que no han sido estudiadas todavía, con el objetivo de desarrollar nuevos fármacos que funcionen en este caso como antirretrovirales. La actividad de estos no ha sido probada en el espacio químico de la VIH proteasa, por lo que se espera nuevos resultados de las moléculas construidas a partir de estos 4 compuestos. Especialmente de los calixolanos, cuya hidrofobicidad es un aspecto que puede ser de mucha utilidad en el sitio activo hidrofóbico de la VIH proteasa.

El docking, diseño *de novo* y análisis QSAR son técnicas novedosas que generan resultados más efectivos, que la técnica de tamizaje molecular de alto rendimiento. El uso de estos métodos garantiza que, después de cierto tiempo de cálculos, se produzca al menos una molécula con las características deseadas y que sea viable para consumo humano. El hecho de partir de un fragmento novedoso como una calixamina o un calixolano provee la posibilidad de hallar un compuesto nunca antes visto y al mismo tiempo, hallar su actividad en el espacio químico de la VIH proteasa.

Finalmente, el uso de nuevas tecnologías para el desarrollo y el hecho de partir de compuestos nunca antes probados son respuestas novedosas a los problemas de salud, ciencia, industria y economía de Guatemala. El método utilizado para este estudio fue el diseño *in silico*, que contempla técnicas en computadora, capaces de desarrollar fármacos nuevos a partir de moléculas que ya existen utilizando parámetros específicos. Independientemente de los resultados obtenidos, el uso de esta técnica sienta un precedente en la investigación de nuevos fármacos en este país y continúa con una línea de investigación que se comenzó a desarrollar hace pocos años.

5. OBJETIVOS

5.1 General

5.1.1 Identificar por medio de métodos teórico-computacionales, una molécula derivada de las calixaminas y una molécula derivada de los calixolanos que inhiba a la VIH-Proteasa.

5.2 Específicos

- 5.2.1 Determinar una línea base de energías de enlace de los antirretrovirales inhibidores de la VIH-Proteasa, a través de docking molecular, para tener una relación entre el nivel energético y la efectividad de la actividad inhibitoria de una molécula.
- 5.2.2 Evaluar el índice de mutaciones de cada uno de los aminoácidos de la HIV-Proteasa a modo de detectar un antirretroviral más efectivo.
- 5.2.3 Generar virtualmente 500 derivados de los calixolanos y 500 derivados de las calixaminas y de esos 500 seleccionar 10 derivados de las calixaminas y 10 de los calixolanos que tengan energías cercanas o debajo de la línea base establecida y descartar los demás.
- 5.2.4 Cuantificar la efectividad de aquellos derivados que se enlazan con las zonas mutantes de la HIV-Proteasa y analizar su relación estructura-actividad (QSAR).

6. HIPÓTESIS

Es posible encontrar al menos una molécula derivada de las calixaminas y calixolanos que muestre afinidad por la VIH proteasa y similitud molecular con los inhibidores ya conocidos, utilizando tamizaje molecular virtual.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El objeto de estudio (universo) de esta investigación son las calixaminas y los calixolanos y todas las moléculas derivadas. De las calixaminas y los calixolanos se generaron 500 derivados sistemáticamente y posteriormente se sometieron todos estos (muestra) a ser comparados con los antirretrovirales inhibidores ya existentes de la VIH-proteasa. Luego, los derivados fueron ponderados según la energía de enlace más apta para enlazarse con la VIH-proteasa.

7.1 Hardware

Para la visualización, derivatización, docking y la evaluación de las moléculas se hizo uso de 4 computadoras de alto rendimiento con las siguientes especificaciones:

- Procesador de doble núcleo de 2GHz
- 2GB de memoria RAM
- Sistema operativo: Linux Mint 13 (MATE) 32-bits

Estas computadoras son propiedad de la Unidad de Química Computacional de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y de la Tesista.

7.2 Software

El software utilizado fue:

- Avogadro 1.1.0
- UCSF Chimera 1.7
- AutoDock 4.2
- AutoDock Tools 4.2
- AutoDock Vina 1.1.2
- AutoGrow 3.0
- LigBuilder 2.0
- KNIME 2.7.2

7.3 Procedimiento

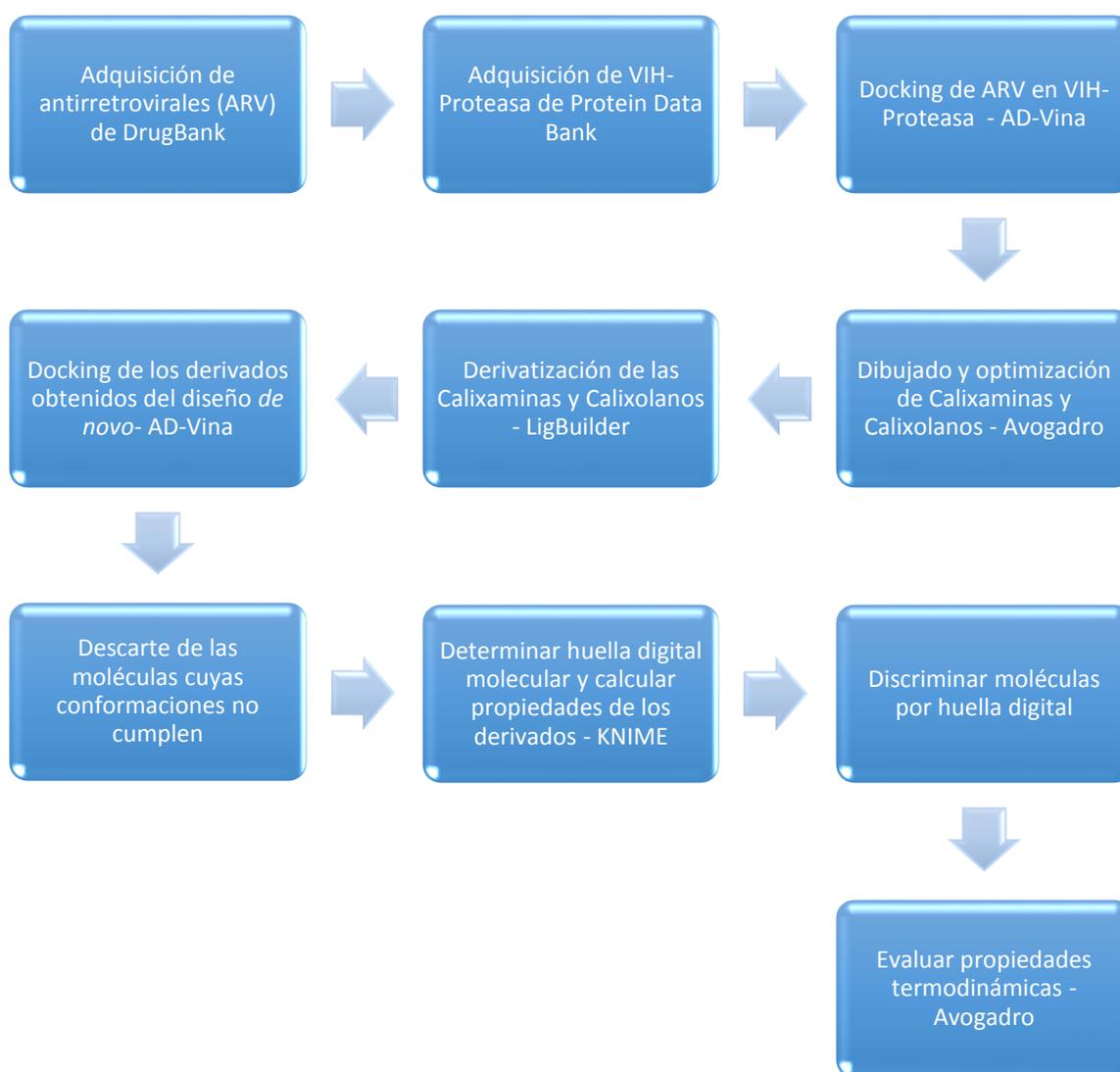
La proteasa y sus mutaciones se tomaron de la base de datos Protein Data Bank (Bergman, y otros, 2000), del reporte anual sobre VIH (Abfalterer, y otros, 2012) y del estudio sobre mutaciones del Instituto de Biología Molecular en Los Ángeles (Chen, Perlina, & Lee, 2004). Las calixaminas y calixolanos fueron construidos con Avogadro (Hanwell, y otros, 2012) a partir de las estructuras presentadas por Rodríguez y Cobar. Luego, para la derivatización de las anteriores moléculas, se utilizó la base de datos ZINC (Irwin & Shoinet, 2005) y el programa LigBuilder 2.0 (Yuan, Pei, & Lai, 2011) o AutoGrow (Durrant, Amaro, & McCammon, 2009). Para la realización del docking de cada molécula generada se utilizó AutoDock Tools (Morris, y otros, 2009) y AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010). Finalmente para evaluar la similitud de las moléculas por huella digital y sus propiedades de similitud se utilizó KNIME y así se filtraron las moléculas producidas por sus propiedades.

7.4 Metodología y Diseño Estadístico

Se comenzó tomando toda la población de antirretrovirales de origen comercial de la VIH-proteasa (Amprenavir, Atazanavir, Darunavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir, Tipranavir) y ligándolos a la VIH-proteasa a modo de encontrar los valores de energía de enlace del complejo formado. Se propuso un modelo en donde estos valores de energía resulten en una distribución normal. El modelo se basa en una hipótesis: se puede encontrar una molécula cuya energía de enlace a la VIH proteasa sea menor o igual al promedio de las energías de enlace de los antiretrovirales, para esto se tomó la energía de cada antirretroviral conocido y se sacó la media y la desviación estándar de estos, a modo de construir una distribución normal de los datos. Después se generaron 1000 derivados de las calixaminas y los calixolanos. Posteriormente se procedió a ligar cada derivado con la VIH-proteasa y obtener su valor de energía de enlace. El valor de energía de cada uno de los 1000 compuestos se comparó con el modelo descrito anteriormente. Esto último buscando obtener una muestra no representativa de todos los derivados de calixaminas y calixolanos posibles y considerando el tiempo de cálculo

computacional para la generación de estos compuestos. Se aceptaron el 5% de los candidatos comunes entre los resultados de energía mínima de los 2 métodos de docking a utilizarse. Luego se realizó una comparación de huella digital molecular para ver su similitud a los antirretrovirales con los que se comenzó. En consecuencia se tuvo una completa depuración de las moléculas generadas y se obtuvo aquellas que sí pueden ser candidatas para su síntesis y ensayos clínicos.

A continuación se presenta un diagrama de flujo sobre el procedimiento que se siguió:



8. RESULTADOS

Para interpretar Tablas de la 1-14 ver páginas 59, 60, 110 y 118. Se muestran las energías obtenidas de la función de evaluación en Kcal/mol.

Tabla 1 Función de Evaluación (Kcal/mol), Amprenavir

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 9.1	- 9.0	- 9.0	- 9.0
2	- 8.8	- 8.9	- 8.8	- 8.8
3	- 8.8	- 8.6	- 8.6	- 8.7
4	- 8.7	- 8.4	- 8.6	- 8.6
5	- 8.7	- 8.4	- 8.5	- 8.5
6	- 8.5	- 8.3	- 8.3	- 8.4
7	- 8.5	- 8.1	- 8.2	- 8.3
8	- 8.4	- 8.0	- 8.2	- 8.2
9	- 8.4	- 8.0	- 8.1	- 8.2
10	- 8.4	- 7.9	- 8.1	- 8.1
Promedio	- 9.4	- 8.3	- 8.4	- 8.7

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente.

Tabla 2 Función de Evaluación (Kcal/mol), Atazanavir

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 9.7	- 9.8	- 9.5	- 9.7
2	- 9.5	- 9.6	- 9.2	- 9.4
3	- 9.1	- 9.4	- 9.1	- 9.2
4	- 9.1	- 9.3	- 9.0	- 9.1
5	- 9.1	- 8.8	- 8.9	- 8.9
6	- 8.9	- 8.8	- 8.7	- 8.8
7	- 8.9	- 8.4	- 8.7	- 8.7
8	- 8.5	- 8.4	- 8.7	- 8.5
9	- 8.4	- 8.2	- 8.6	- 8.4
10	- 8.3	- 8.2	- 8.3	- 8.3
Promedio	- 9.0	- 8.9	- 8.9	- 8.9

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 3 Función de Evaluación (Kcal/mol), Darunavir

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 9.8	- 8.9	- 9.3	- 9.3
2	- 9.3	- 8.8	- 9.1	- 9.1
3	- 9.3	- 8.8	- 9.1	- 9.1
4	- 9.3	- 8.7	- 9.1	- 9.0
5	- 9.0	- 8.7	- 9.1	- 8.9
6	- 9.0	- 8.6	- 8.8	- 8.8
7	- 8.9	- 8.4	- 8.7	- 8.7
8	- 8.9	- 8.3	- 8.7	- 8.6
9	- 8.9	- 8.2	- 8.7	- 8.6
10	- 8.8	- 8.2	- 8.7	- 8.6
Promedio	- 9.1	- 8.6	- 8.9	- 8.9

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 4 Función de Evaluación (Kcal/mol), Indinavir

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 10.7	- 10.3	- 10.3	- 10.4
2	- 10.6	- 10.1	- 10.0	- 10.2
3	- 10.4	- 9.9	- 9.8	- 10.0
4	- 10.0	- 9.8	- 9.7	- 9.8
5	- 10.0	- 9.7	- 9.7	- 9.8
6	- 10.0	- 9.7	- 9.6	- 9.8
7	- 9.9	- 9.7	- 9.6	0- 9.7
8	- 9.7	- 9.6	- 9.5	- 9.6
9	- 9.6	- 9.5	- 9.5	- 9.5
10	- 9.4	- 9.3	- 9.5	- 9.4
Promedio	- 10.0	- 9.8	- 9.7	- 9.8

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 5 Función de Evaluación (Kcal/mol), Lopinavir

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 9.9	- 9.5	- 9.9	- 9.8
2	- 9.8	- 9.4	- 9.6	- 9.6
3	- 9.7	- 9.3	- 9.4	- 9.5
4	- 9.7	- 9.1	- 9.3	- 9.4
5	- 9.6	- 8.7	- 9.2	- 9.2
6	- 9.6	- 8.7	- 9.2	- 9.2
7	- 9.6	- 8.7	- 9.0	- 9.1
8	- 9.6	- 8.7	- 9.0	- 9.1
9	- 9.5	- 8.6	- 8.9	- 9.0
10	- 9.5	- 8.5	- 8.9	- 9.0
Promedio	- 9.6	- 8.9	- 9.2	- 9.1

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 6 Función de Evaluación (Kcal/mol), Nelfinavir

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 10.5	- 10.4	- 10.5	- 10.4
2	- 10.5	- 10.3	- 10.3	- 10.4
3	- 10.4	- 10.3	- 10.3	- 10.3
4	- 10.3	- 10.2	- 10.3	- 10.2
5	- 10.2	- 10.0	- 10.1	- 10.1
6	- 9.8	- 9.8	- 10.0	- 9.9
7	- 9.7	- 9.8	- 9.9	- 9.8
8	- 9.3	- 9.5	- 9.8	- 9.5
9	- 9.2	- 9.4	- 9.6	- 9.4
10	- 9.1	- 9.4	- 9.5	- 9.3
Promedio	- 9.9	- 9.9	- 10.0	- 9.9

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 7 Función de Evaluación (Kcal/mol), Ritonavir

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 9.7	- 9.4	- 9.5	- 9.5
2	- 9.5	- 9.3	- 9.3	- 9.4
3	- 9.5	- 9.1	- 9.3	- 9.3
4	- 9.5	- 9.0	- 9.2	- 9.2
5	- 9.5	- 9.0	- 9.2	- 9.2
6	- 9.4	- 8.9	- 9.1	- 9.1
7	- 9.3	- 8.9	- 9.1	- 9.1
8	- 9.3	- 8.9	- 8.9	- 9.0
9	- 9.3	- 8.9	- 8.9	- 9.0
10	- 9.1	- 8.9	- 8.9	- 9.0
Promedio	- 9.4	- 9.0	- 9.1	- 9.2

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 8 Función de Evaluación (Kcal/mol), Saquinavir

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 11.1	- 10.9	- 11.0	- 11.0
2	- 10.8	- 10.8	- 10.8	- 10.8
3	- 10.7	- 10.3	- 10.2	- 10.4
4	- 10.6	- 10.2	- 10.2	- 10.3
5	- 10.4	- 10.0	- 10.0	- 10.1
6	- 10.3	- 10.0	- 10.0	- 10.1
7	- 10.2	- 9.6	- 9.9	- 9.9
8	- 10.2	- 9.6	- 9.8	- 9.9
9	- 10.2	- 9.6	- 9.8	- 9.9
10	- 10.1	- 9.5	- 9.5	- 9.7
Promedio	- 10.5	- 10.0	- 10.0	- 10.2

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 9 Función de Evaluación (Kcal/mol), Tipranavir

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 10.5	- 10.2	- 9.6	- 10.1
2	- 10.5	- 10.0	- 9.6	- 10.0
3	- 10.5	- 9.9	- 9.5	- 10.0
4	- 10.1	- 9.4	- 9.3	- 9.6
5	- 9.7	- 9.3	- 9.2	- 9.4
6	- 9.7	- 9.3	- 9.0	- 9.3
7	- 9.7	- 8.9	- 9.0	- 9.2
8	- 9.6	- 8.9	- 9.0	- 9.2
9	- 9.5	- 8.9	- 8.9	- 9.1
10	- 9.5	- 8.7	- 8.7	- 9.0
Promedio	- 9.9	- 9.4	- 9.2	- 9.5

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 10 Función de Evaluación (Kcal/mol), Calyxamina A

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 6.2	- 6.2	- 6.2	- 6.2
2	- 5.8	- 5.8	- 5.8	- 5.8
3	- 5.8	- 5.7	- 5.8	- 5.8
4	- 5.8	- 5.7	- 5.7	- 5.7
5	- 5.7	- 5.6	- 5.7	- 5.7
6	- 5.7	- 5.6	- 5.6	- 5.6
7	- 5.7	- 5.5	- 5.6	- 5.6
8	- 5.6	- 5.5	- 5.4	- 5.5
9	- 5.6	- 5.4	- 5.4	- 5.5
10	- 5.5	- 5.3	- 5.4	- 5.4
Promedio	- 5.7	- 5.6	- 5.7	- 5.7

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 11 Función de Evaluación (Kcal/mol), Calyxamina B

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 6.2	- 6.2	- 6.3	- 6.2
2	- 6.1	- 6.1	- 6.1	- 6.1
3	- 5.8	- 5.8	- 5.8	- 5.8
4	- 5.7	- 5.7	- 5.8	- 5.7
5	- 5.7	- 5.7	- 5.7	- 5.7
6	- 5.6	- 5.6	- 5.5	- 5.6
7	- 5.6	- 5.6	- 5.4	- 5.5
8	- 5.6	- 5.5	- 5.4	- 5.5
9	- 5.5	- 5.4	- 5.4	- 5.4
10	- 5.5	- 5.4	- 5.4	- 5.4
Promedio	- 5.7	- 5.7	- 5.7	- 5.7

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 12 Función de Evaluación (Kcal/mol), Calyxolano A

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 7.9	- 7.8	- 7.8	- 7.8
2	- 7.8	- 7.8	- 7.8	- 7.8
3	- 7.8	- 7.8	- 7.8	- 7.8
4	- 7.8	- 7.8	- 7.8	- 7.8
5	- 7.7	- 7.8	- 7.7	- 7.7
6	- 7.7	- 7.6	- 7.6	- 7.6
7	- 7.6	- 7.6	- 7.5	- 7.6
8	- 7.5	- 7.4	- 7.2	- 7.4
9	- 7.5	- 7.4	- 7.0	- 7.3
10	- 7.5	- 7.3	- 6.9	- 7.2
Promedio	- 7.7	- 7.6	- 7.5	- 7.6

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 13 Función de Evaluación (Kcal/mol), Calyxolano B

Num.	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	- 8.3	- 8.3	- 8.3	- 8.3
2	- 8.1	- 8.3	- 8.3	- 8.2
3	- 8.0	- 8.1	- 8.2	- 8.1
4	- 7.7	- 8.0	- 8.1	- 7.9
5	- 7.7	- 8.0	- 8.0	- 7.9
6	- 7.6	- 7.7	- 7.7	- 7.7
7	- 7.5	- 7.7	- 7.7	- 7.6
8	- 7.4	- 7.6	- 7.5	- 7.5
9	- 7.4	- 7.5	- 7.4	- 7.4
10	- 7.2	- 7.5	- 7.2	- 7.3
Promedio	- 7.7	- 7.9	- 7.8	- 7.8

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

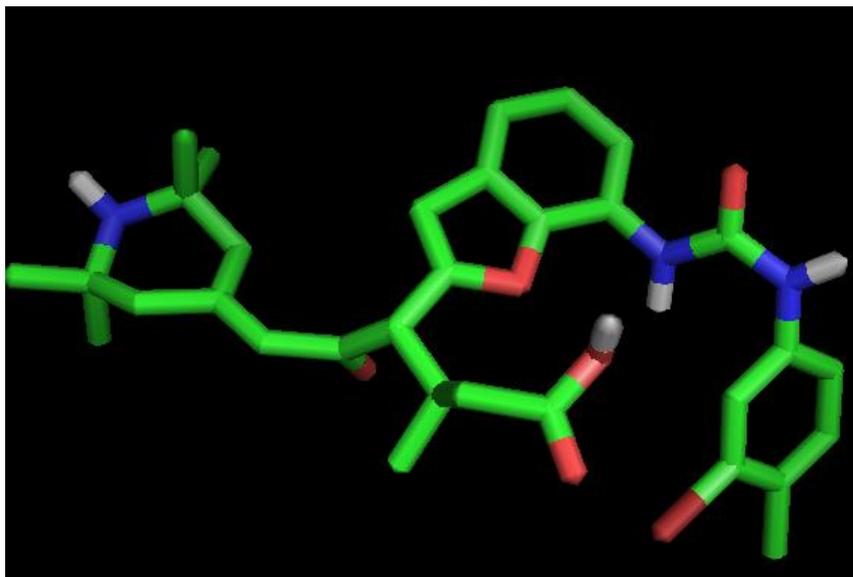
Tabla 14 Función de Evaluación (Kcal/mol), 10 mejores moléculas creadas de Calyxamina A, Calyxamina B, Calyxolano A, Calyxolano B

Num.	Calyxamina A	Calyxamina B	Calyxolano A	Calyxolano B
1	- 12.2	- 10.7	- 11.9	- 11.4
2	- 12.2	- 10.7	- 11.8	- 11.4
3	- 12.2	- 10.7	- 11.7	- 11.3
4	- 12.1	- 10.7	- 11.4	- 11.3
5	- 12.1	- 10.7	- 11.1	- 11.3
6	- 12.0	- 10.7	- 11.1	- 11.2
7	- 12.0	- 10.7	- 10.6	- 11.2
8	- 12.0	- 10.7	- 10.6	- 11.2
9	- 12.0	- 10.7	- 10.6	- 11.2
10	- 12.0	- 10.7	- 10.6	- 11.1

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

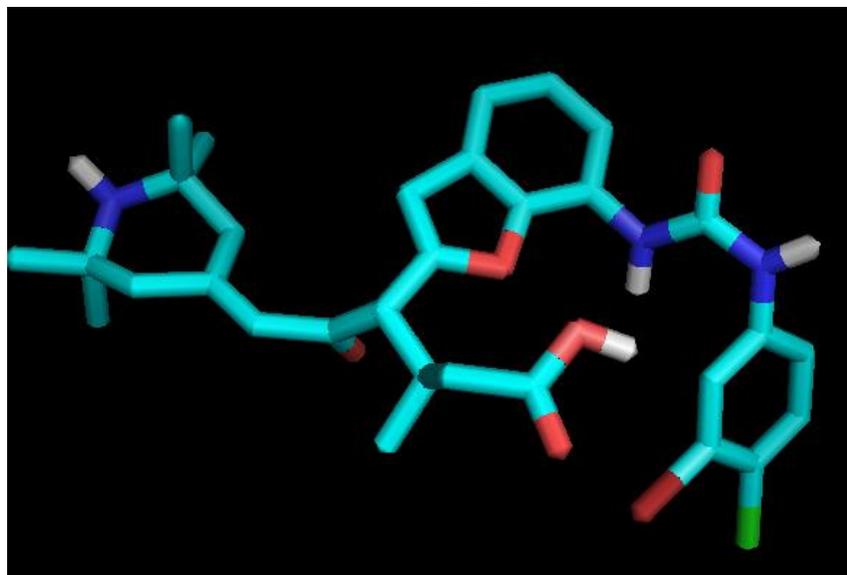
De la Imagen 1 a la 44 se observan la estructura molecular de las 10 moléculas creadas con LigBuilder de cada Calixamina y de Cada Calixolano que presentan la mejor energía (menor energía), ver página 59 y 60.

Imagen 1 Molécula 1 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A



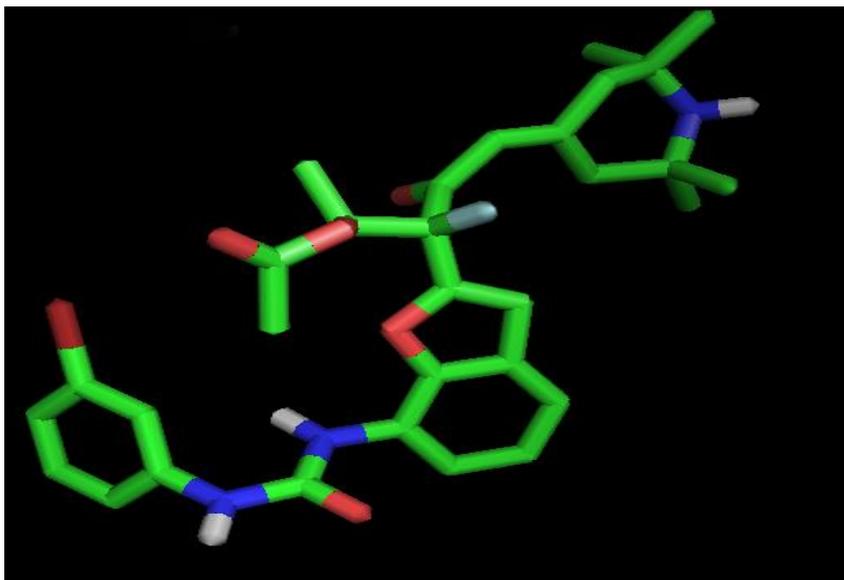
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 2 Molécula 2 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A



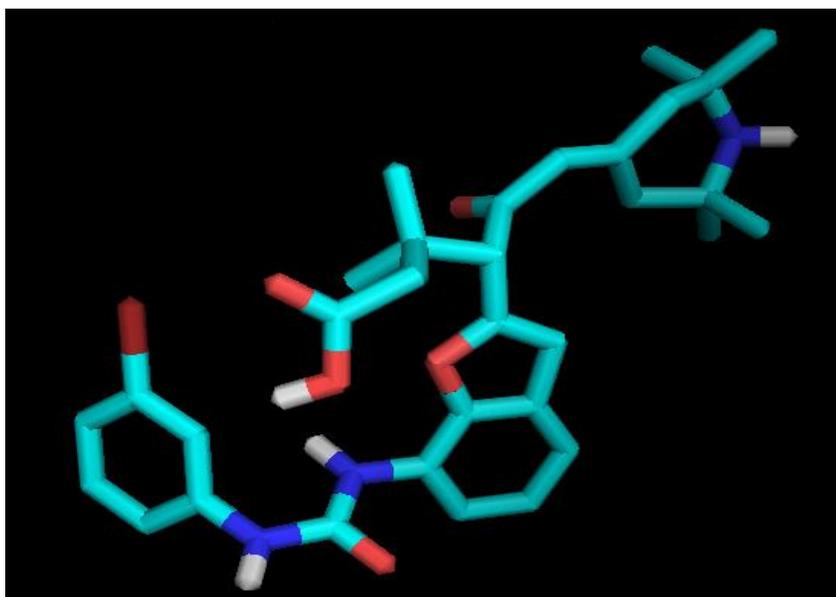
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 3 Molécula 3 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A



Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 4 Molécula 4 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A



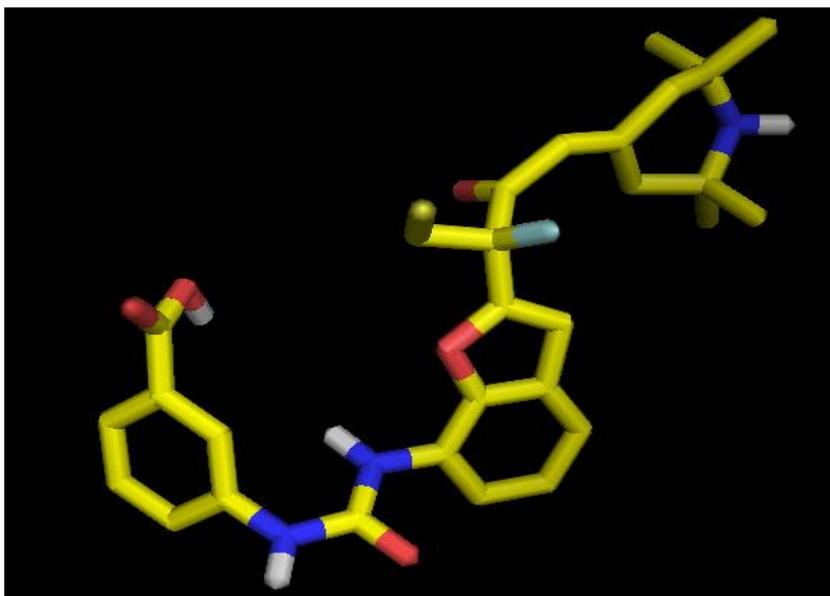
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 5 Molécula 5 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A



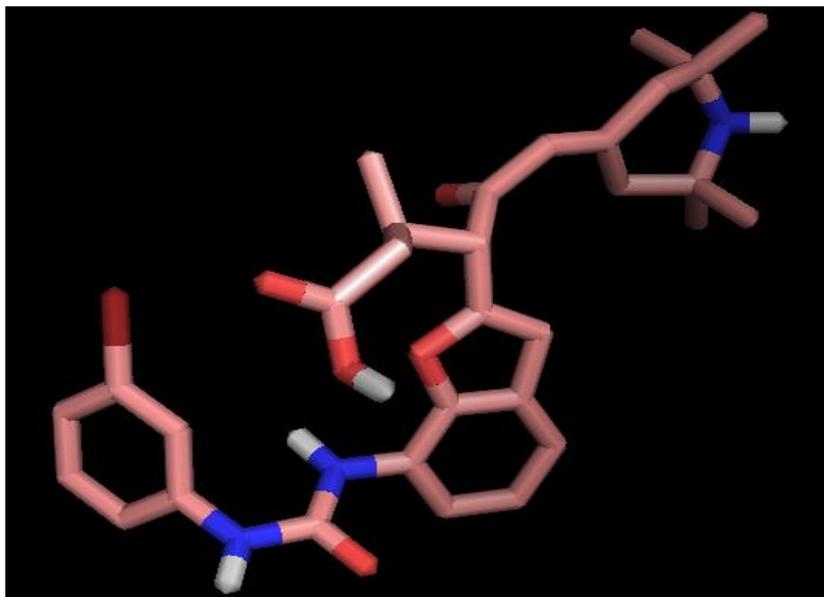
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 6 Molécula 6 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A



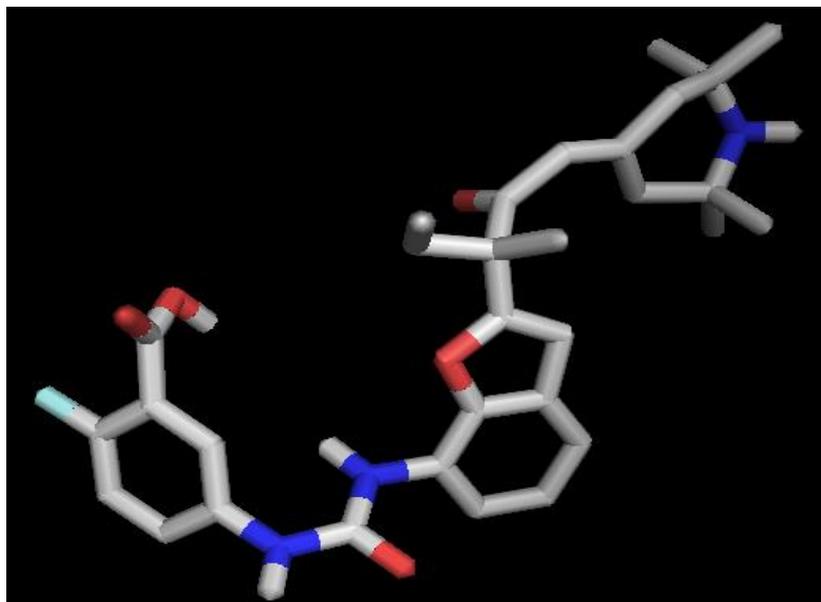
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 7 Molécula 7 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A



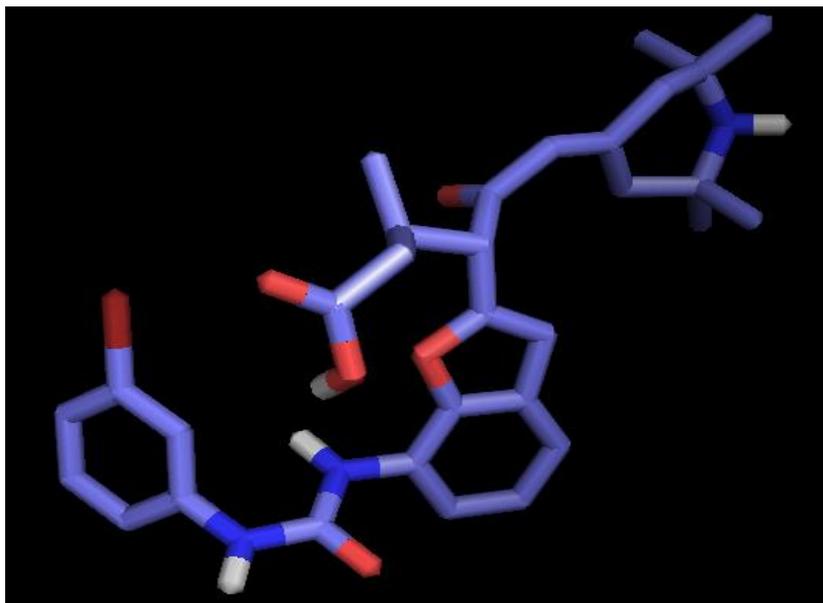
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 8 Molécula 8 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A



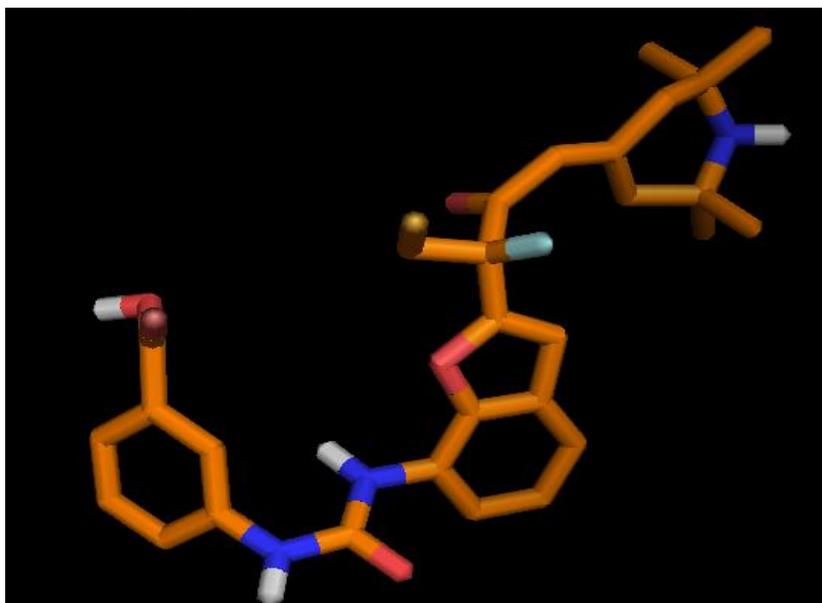
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 9 Molécula 9 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A



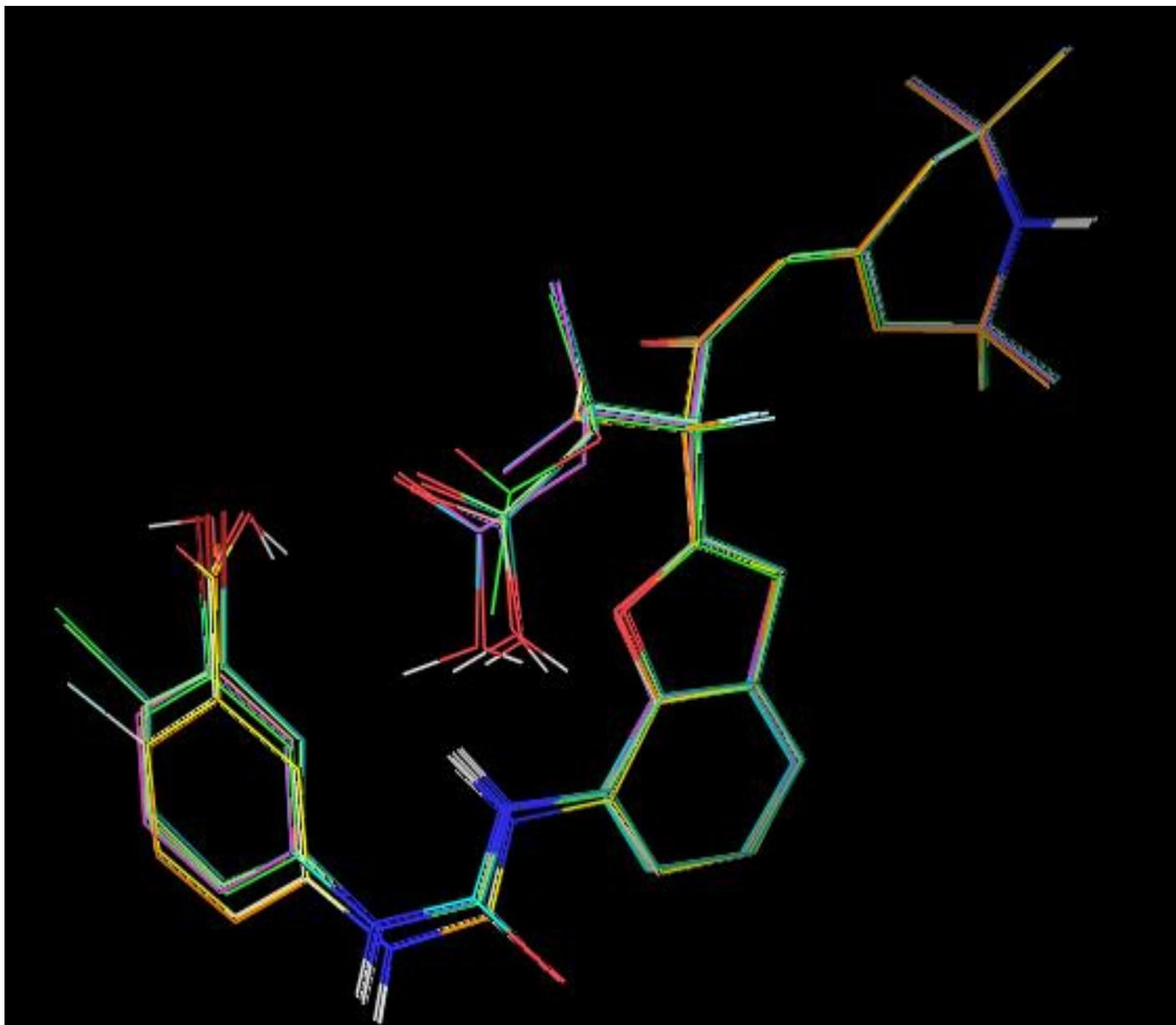
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 10 Molécula 10 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina A



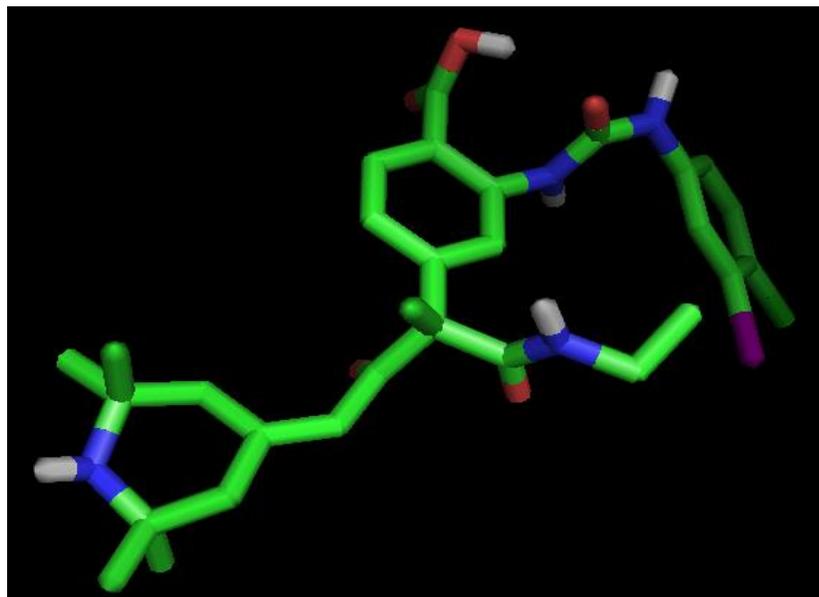
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 11 Comparación de las 10 mejores moléculas creadas utilizando LigBuilder a partir de la Calixamina A



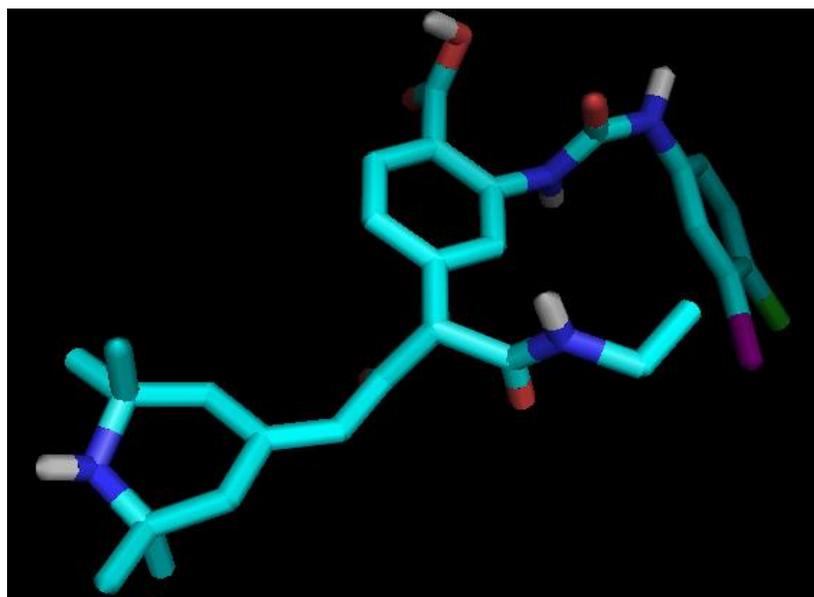
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 12 Molécula 1 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B



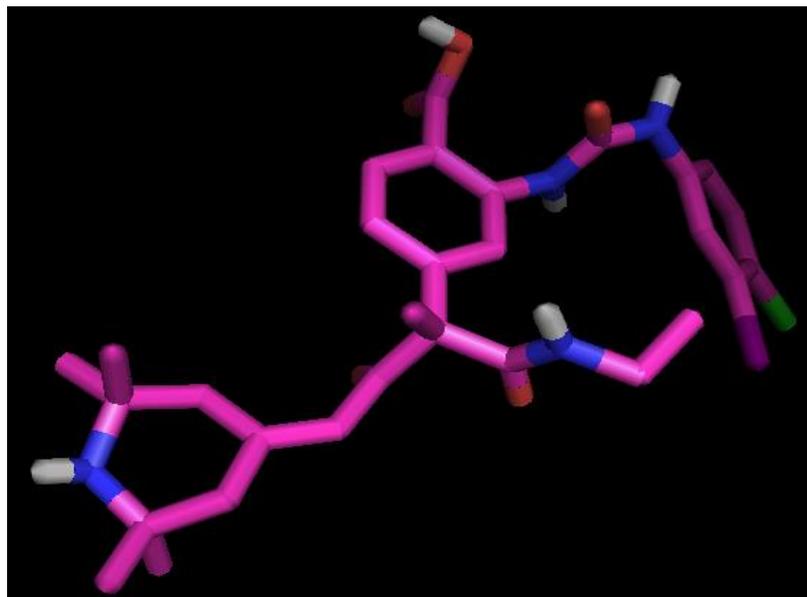
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 13 Molécula 2 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B



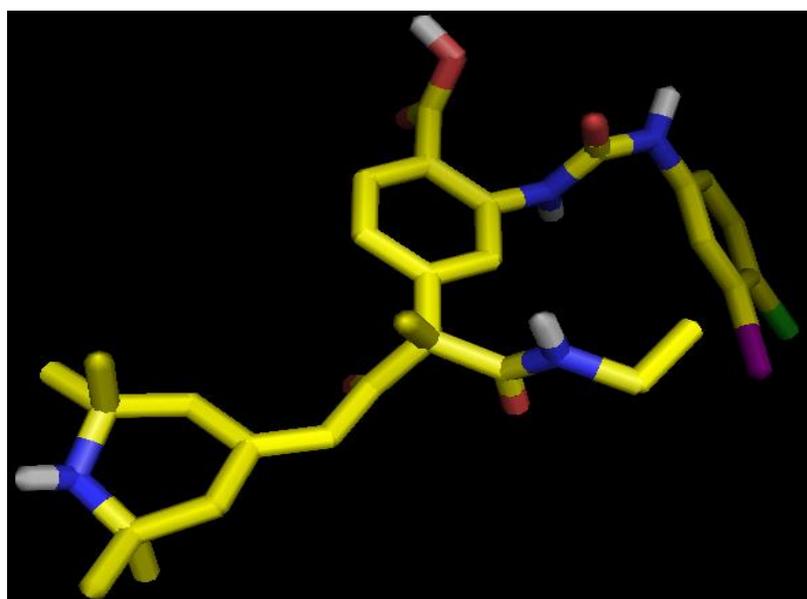
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 14 Molécula 3 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B



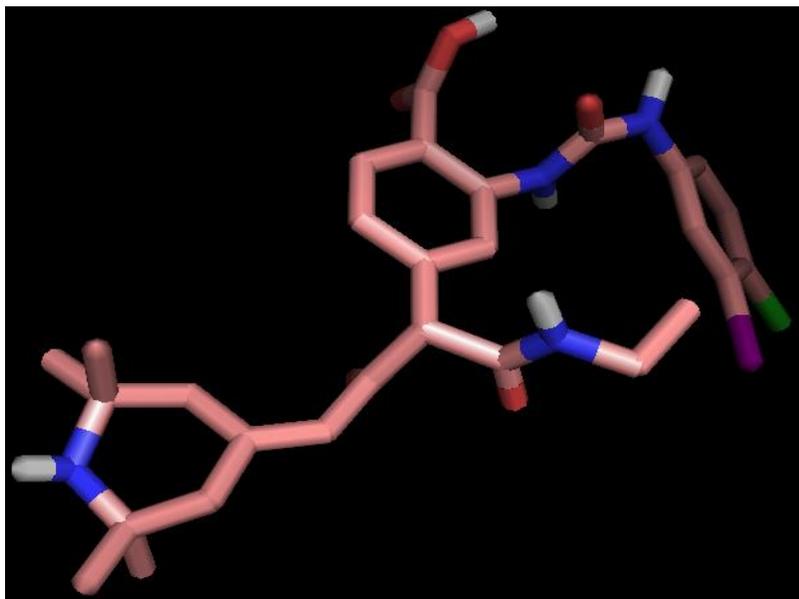
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 15 Molécula 4 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B



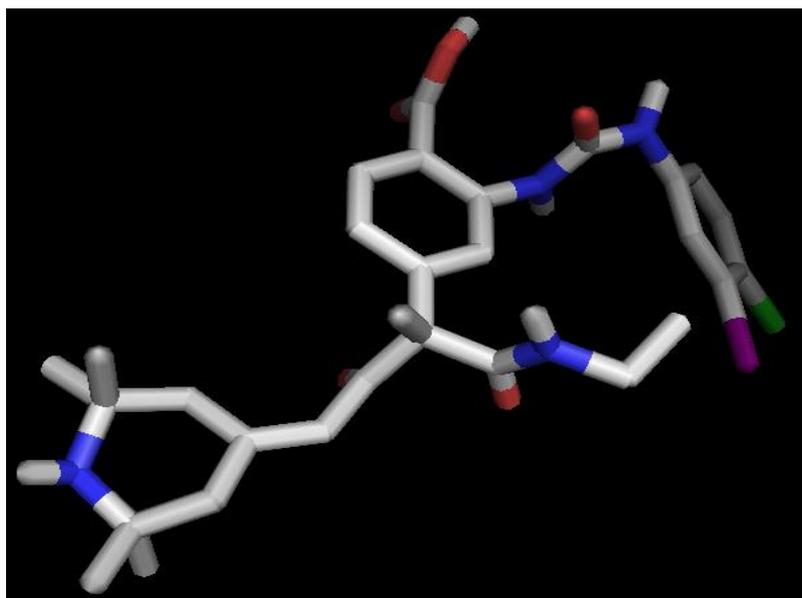
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 16 Molécula 5 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B



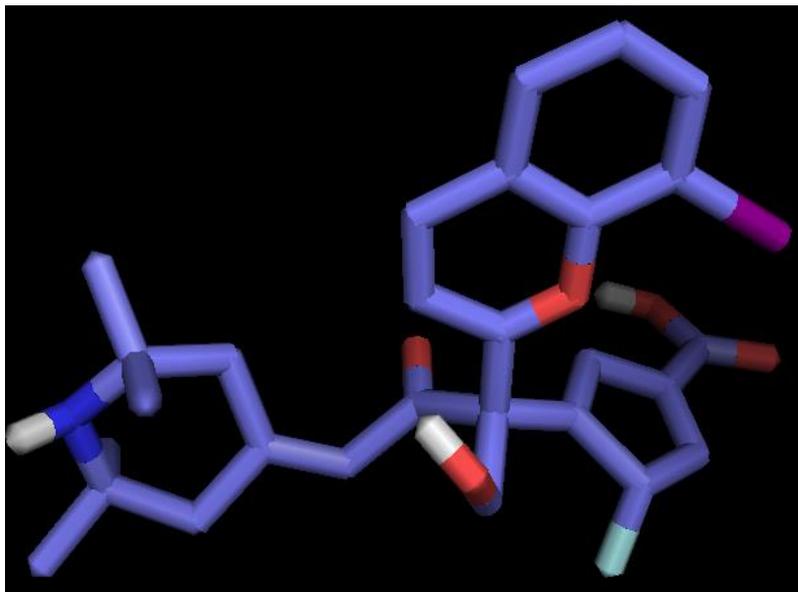
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 17 Molécula 6 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B



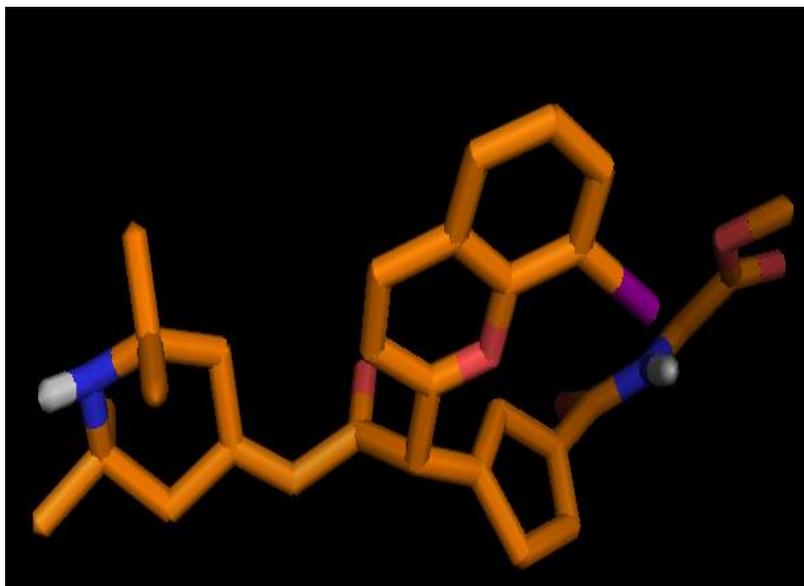
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 18 Molécula 7 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B



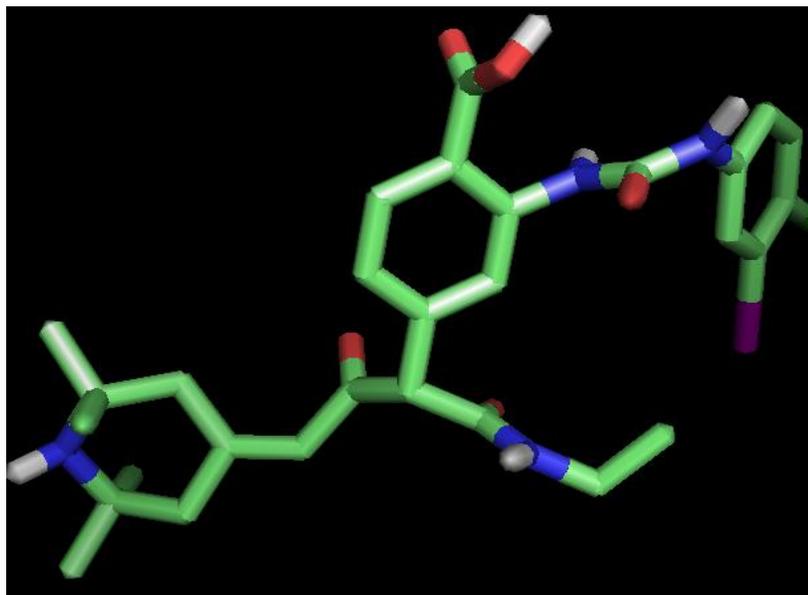
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 19 Molécula 8 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B



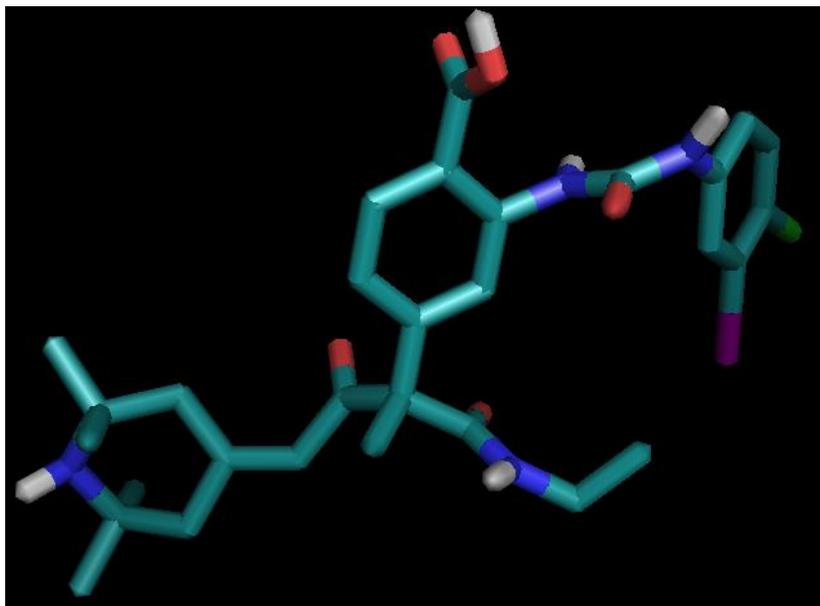
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 20 Molécula 9 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B



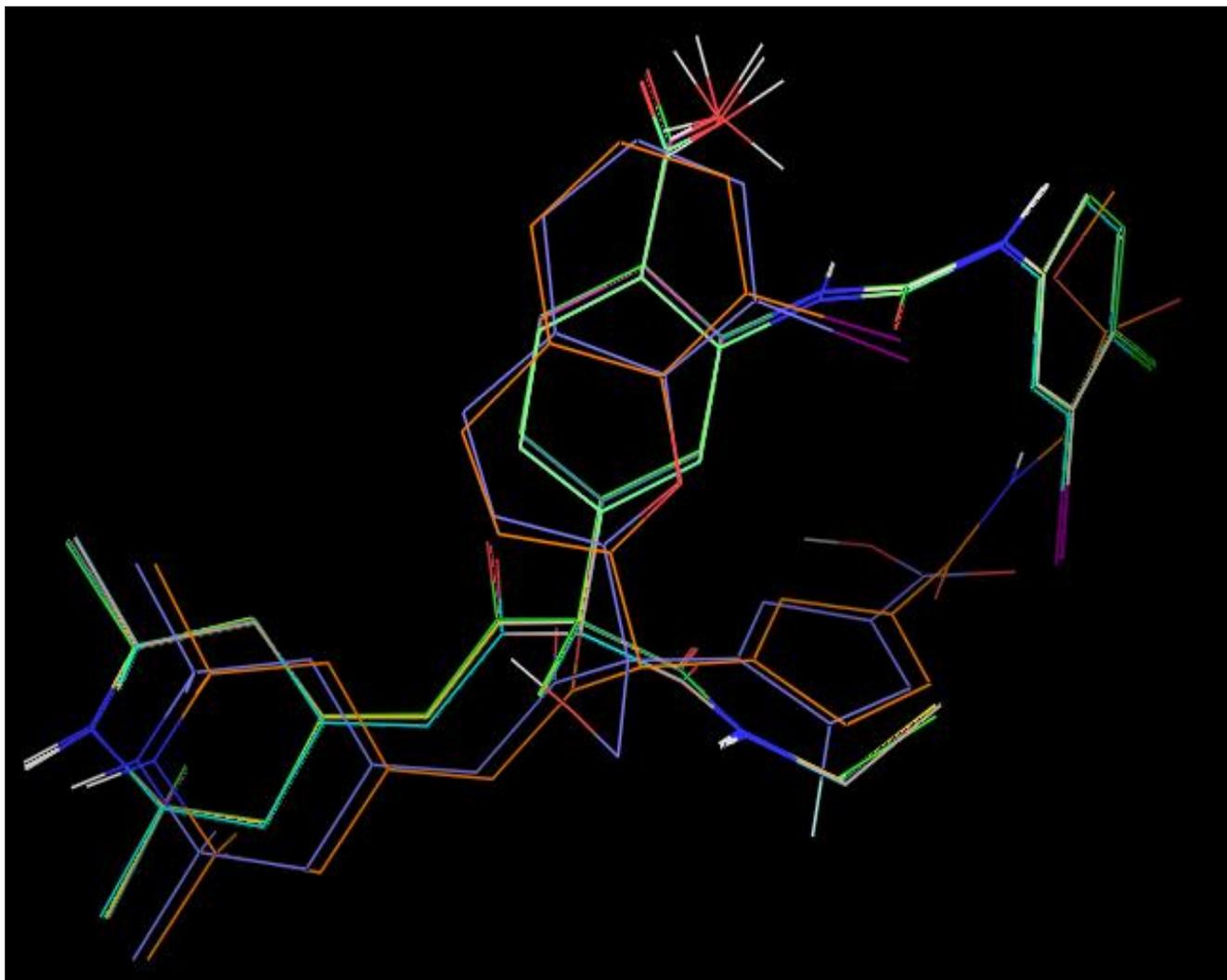
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 21 Molécula 10 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixamina B



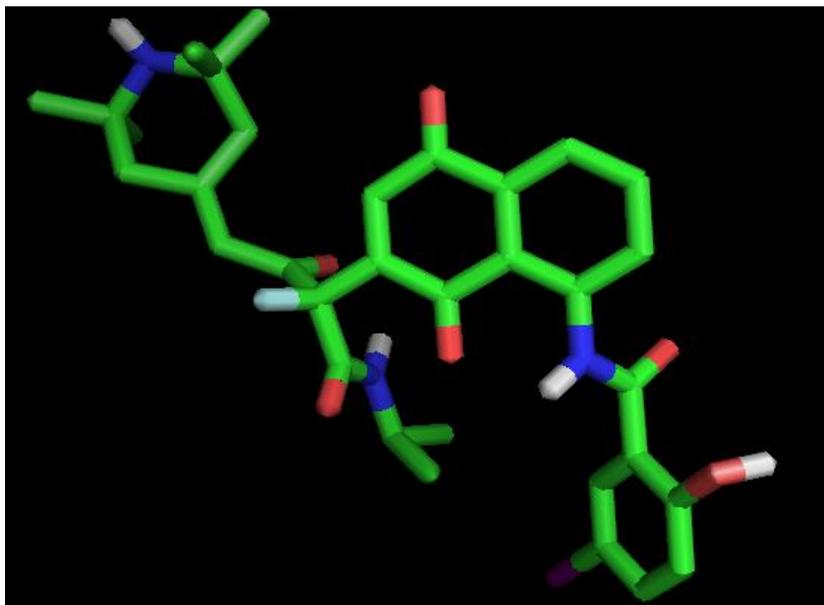
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 22 Comparación de las 10 mejores moléculas creadas utilizando LigBuilder a partir de la Calixamina B



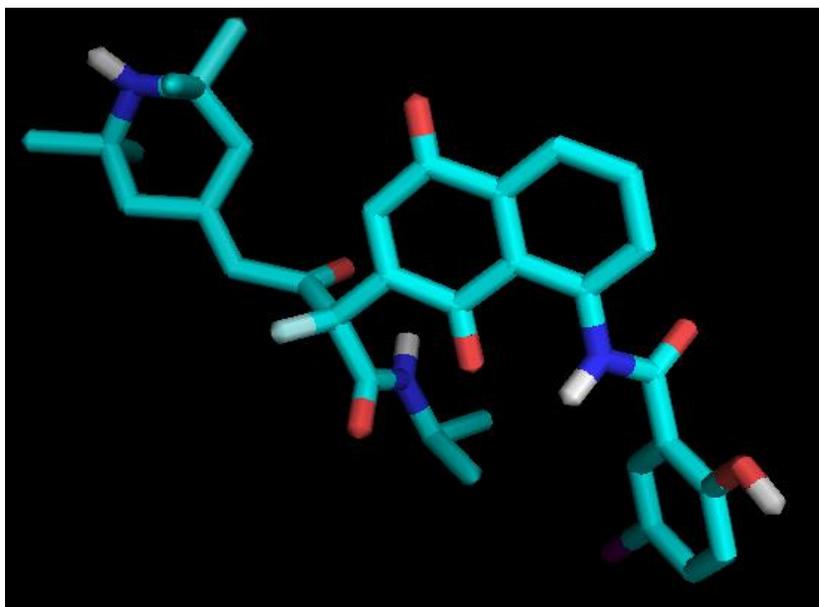
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 23 Molécula 1 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A



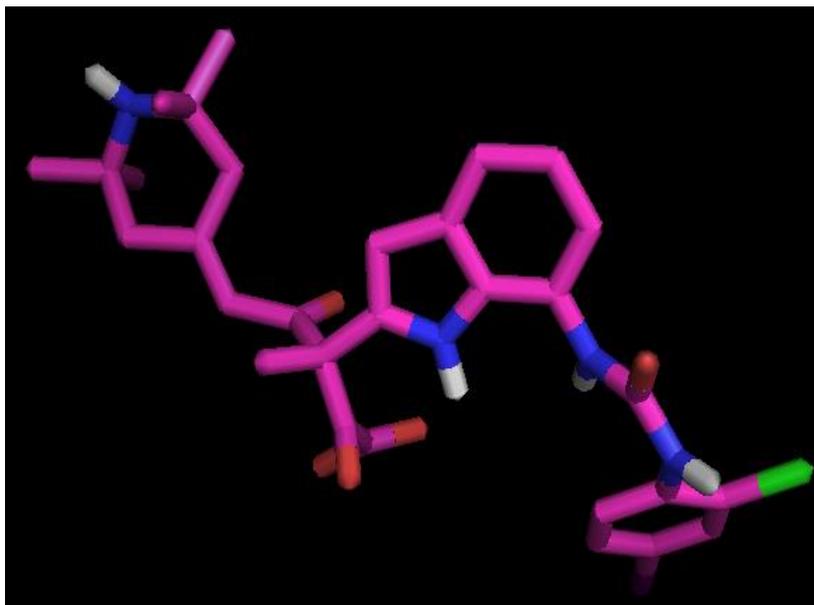
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 24 Molécula 2 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A



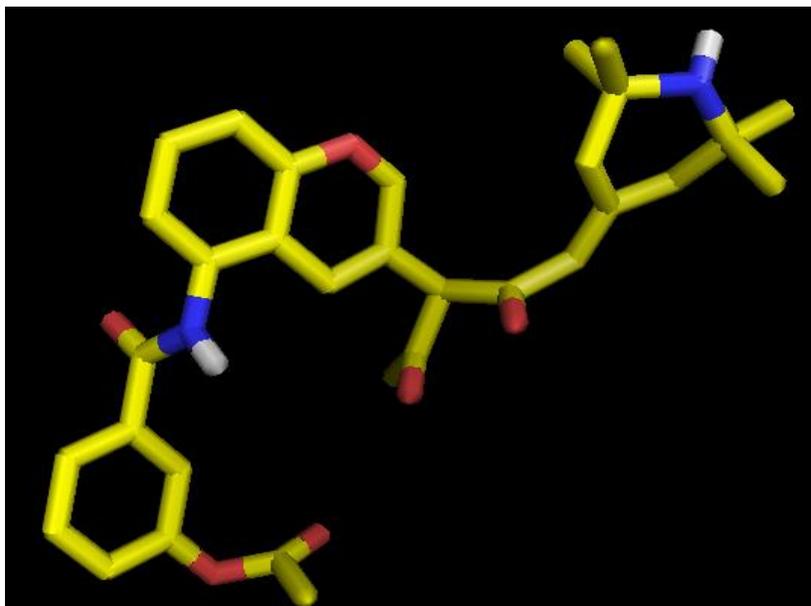
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 25 Molécula 3 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A



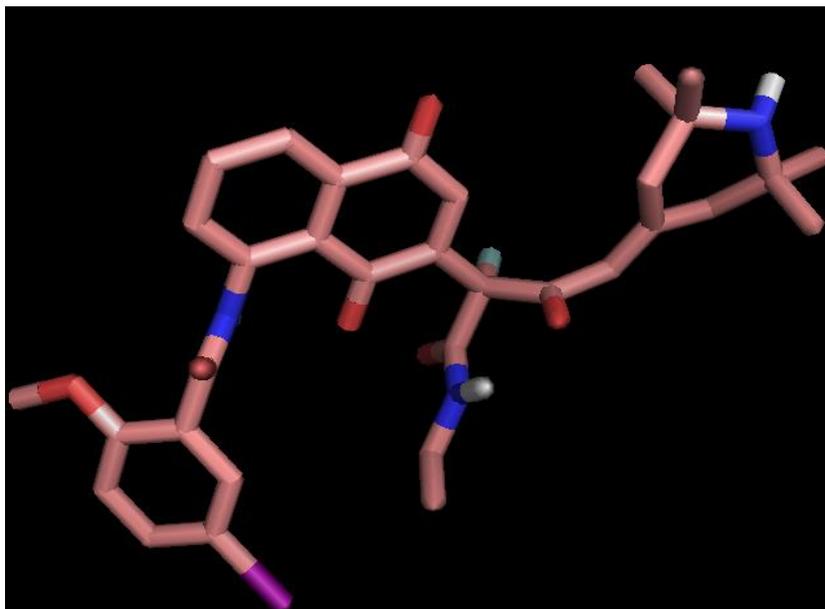
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 26 Molécula 4 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A



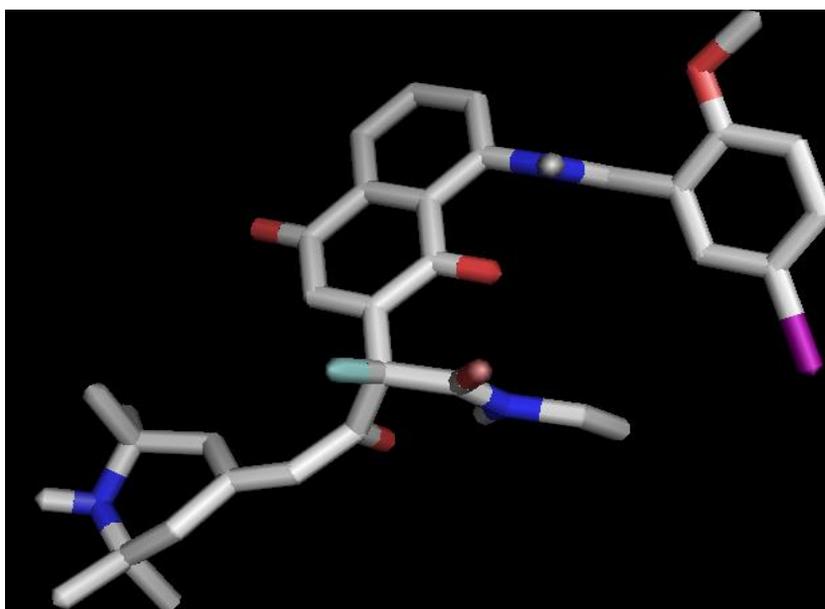
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 27 Molécula 5 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A



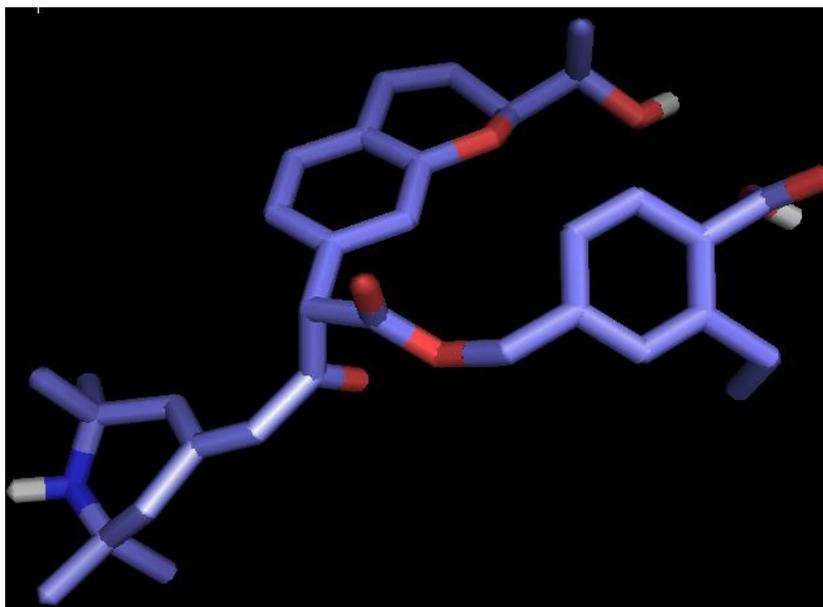
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 28 Molécula 6 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A



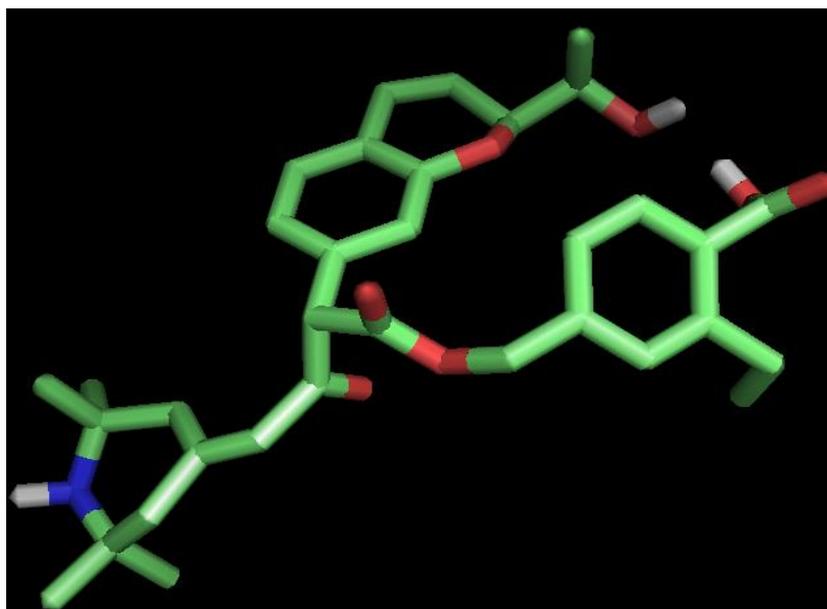
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 29 Molécula 7 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A



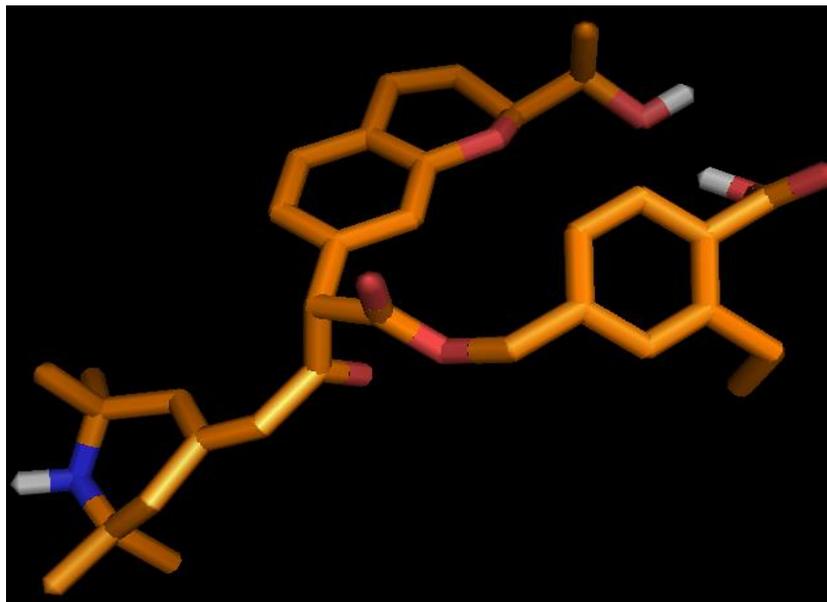
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 30 Molécula 8 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A



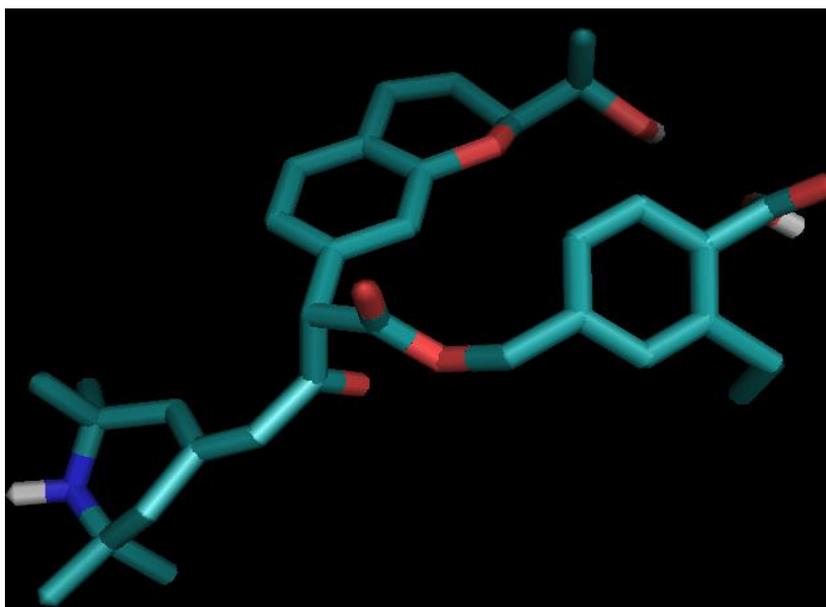
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 31 Molécula 9 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A



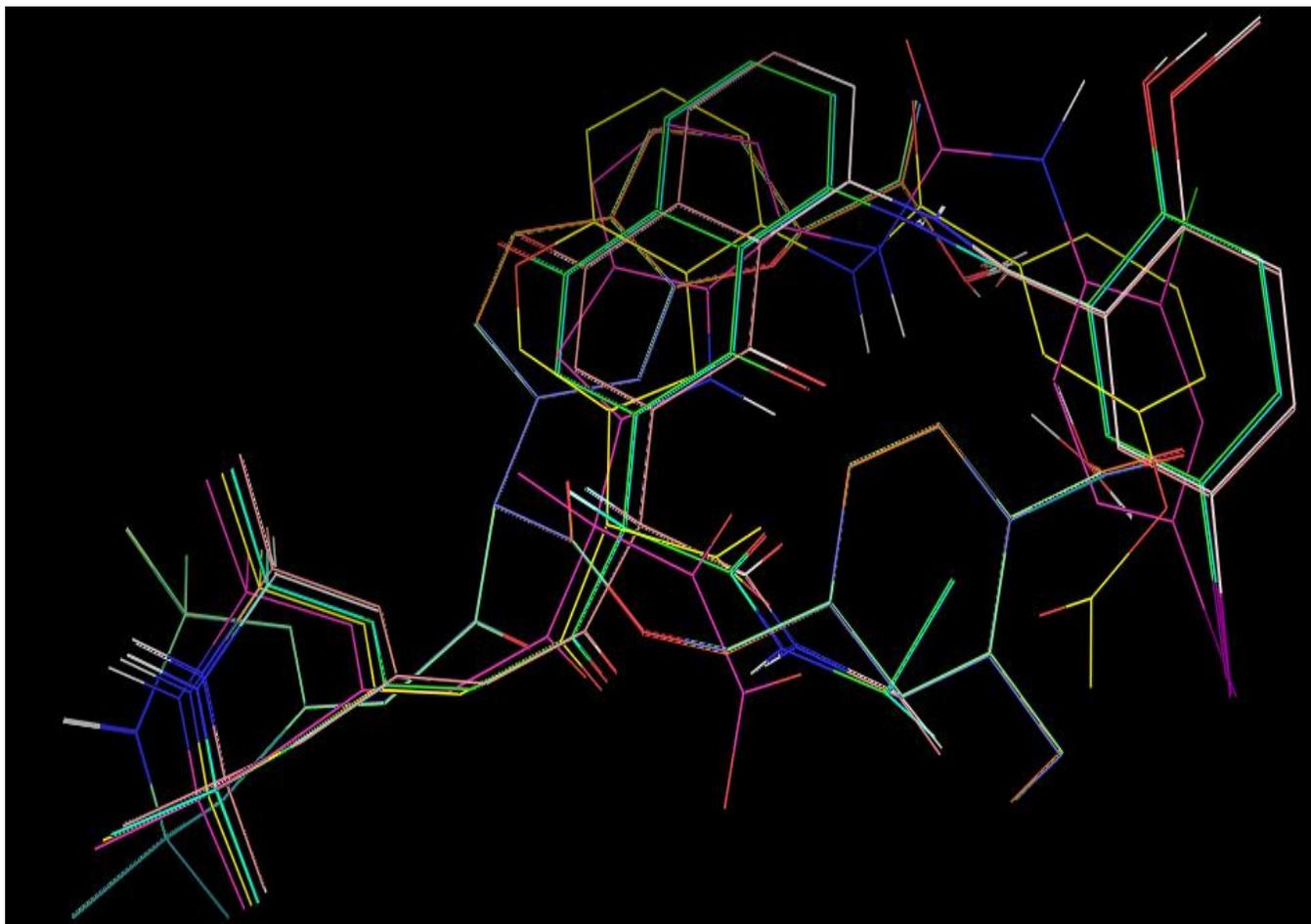
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 32 Molécula 10 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano A



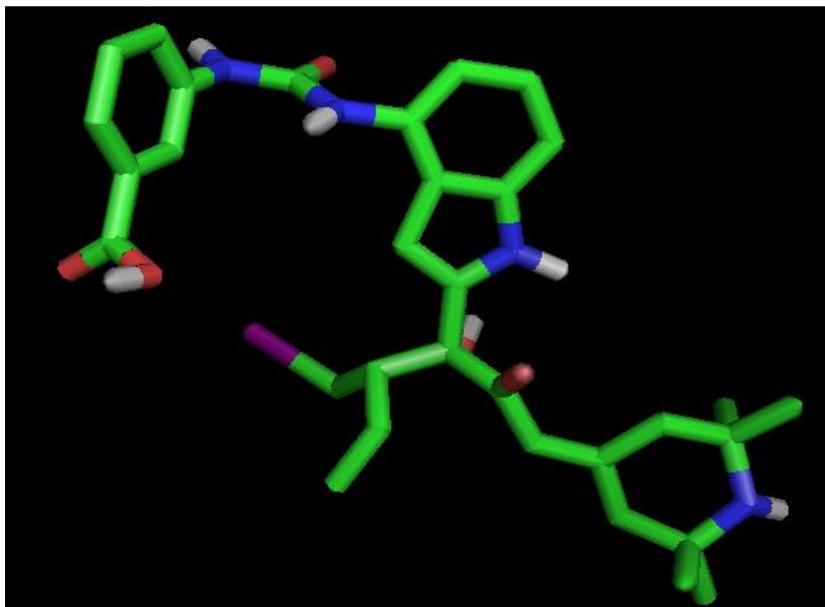
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 33 Comparación de las 10 mejores moléculas creadas utilizando LigBuilder a partir de la Calixolano A



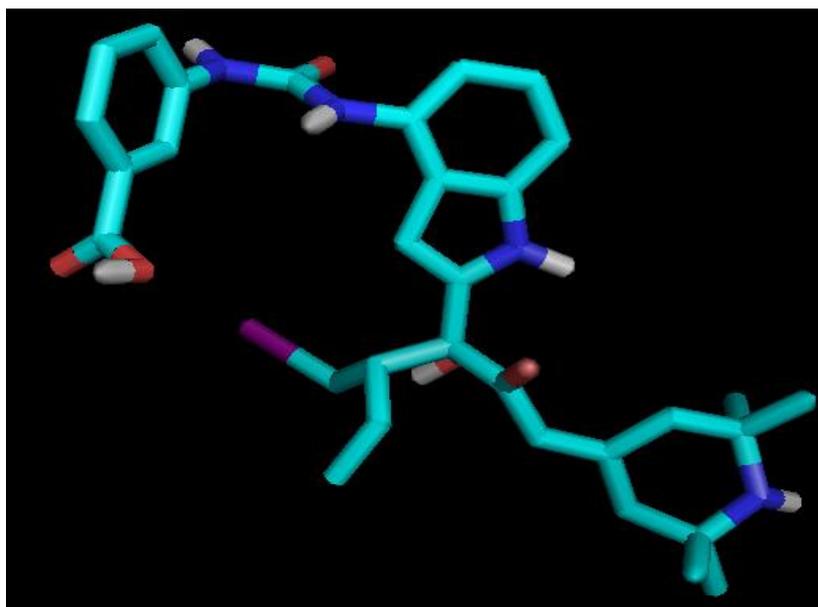
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 34 Molécula 1 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B



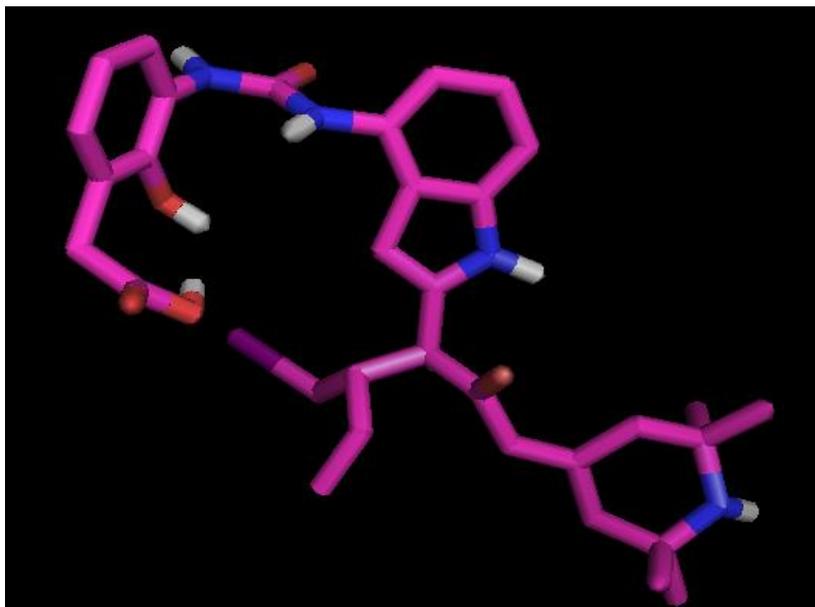
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 35 Molécula 2 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B



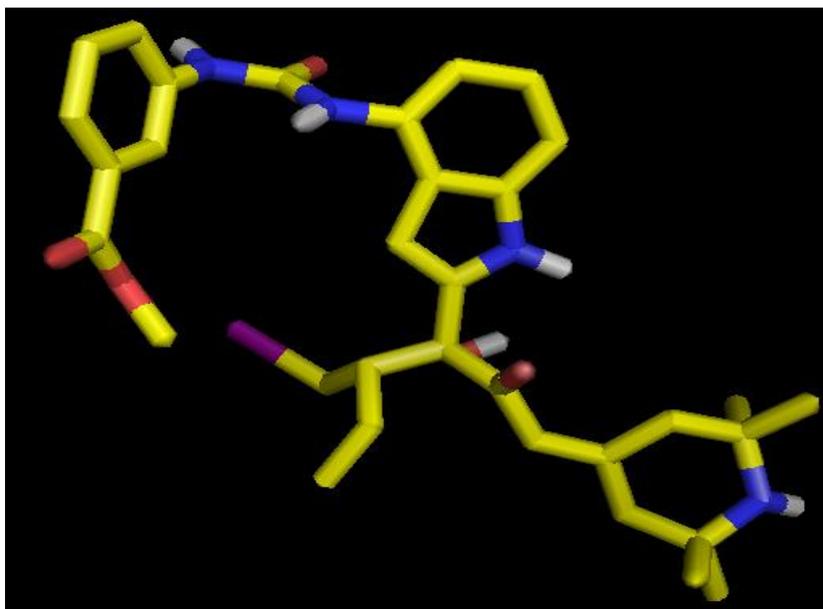
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 36 Molécula 3 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B



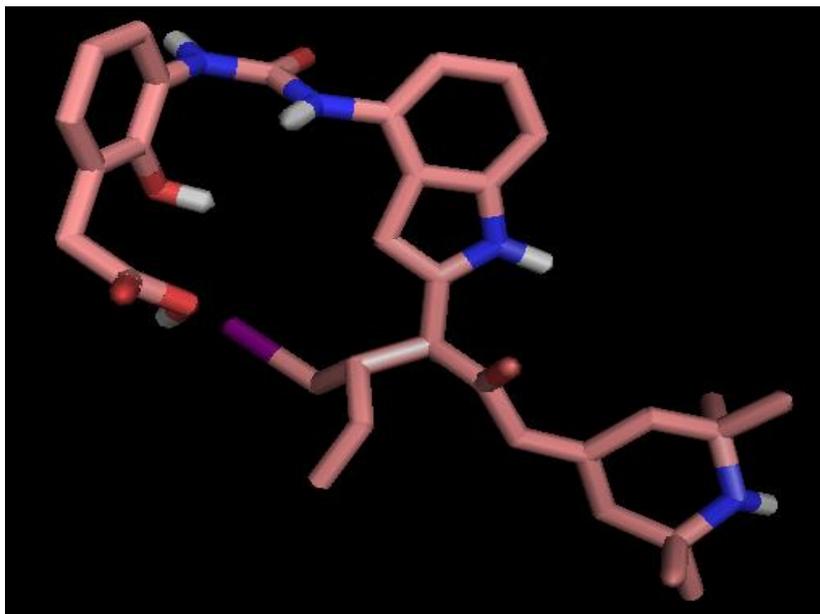
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 37 Molécula 4 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B



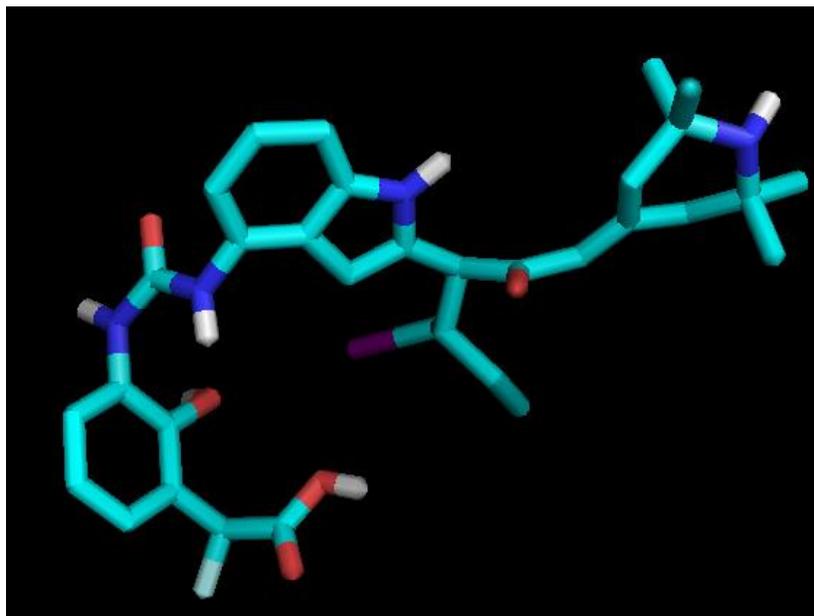
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 38 Molécula 5 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B



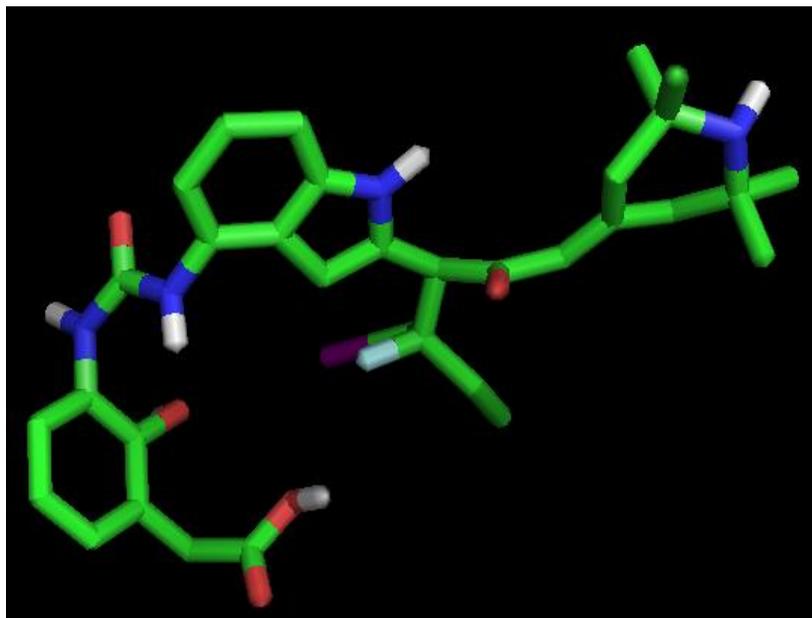
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 39 Molécula 6 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B



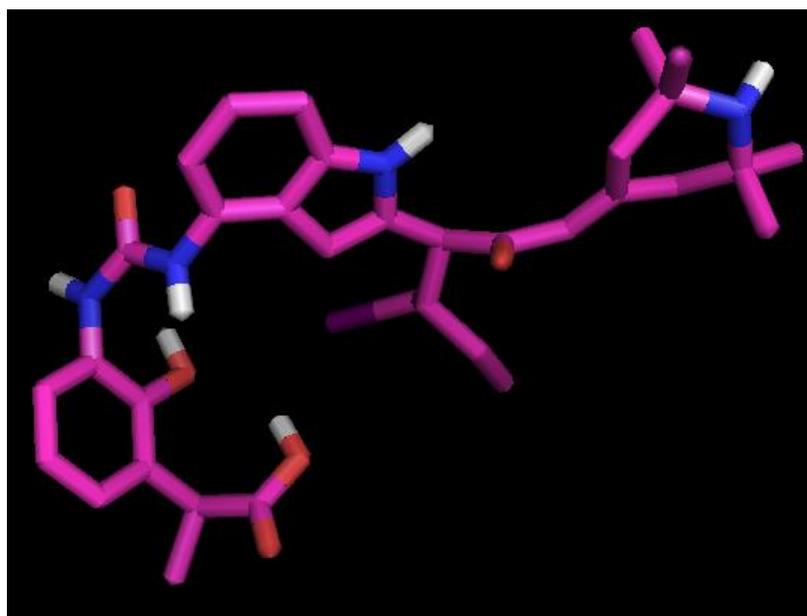
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 40 Molécula 7 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B



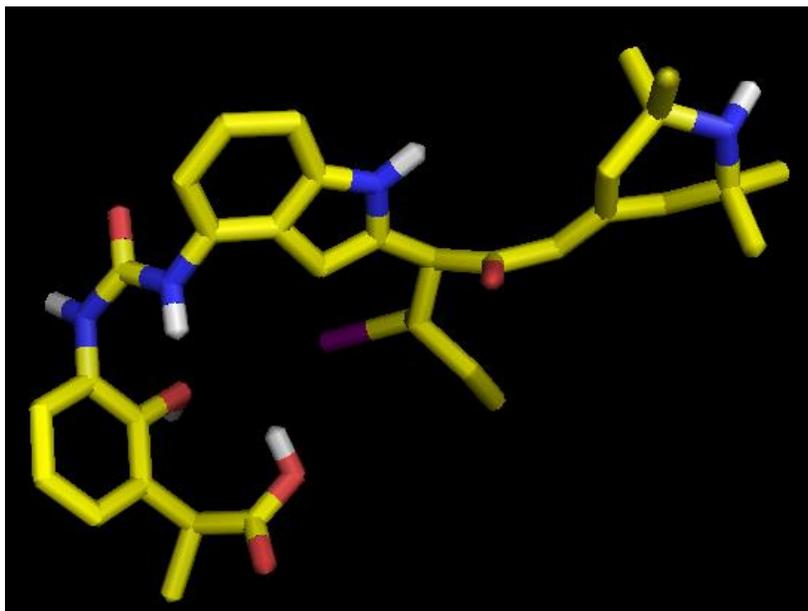
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 41 Molécula 8 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B



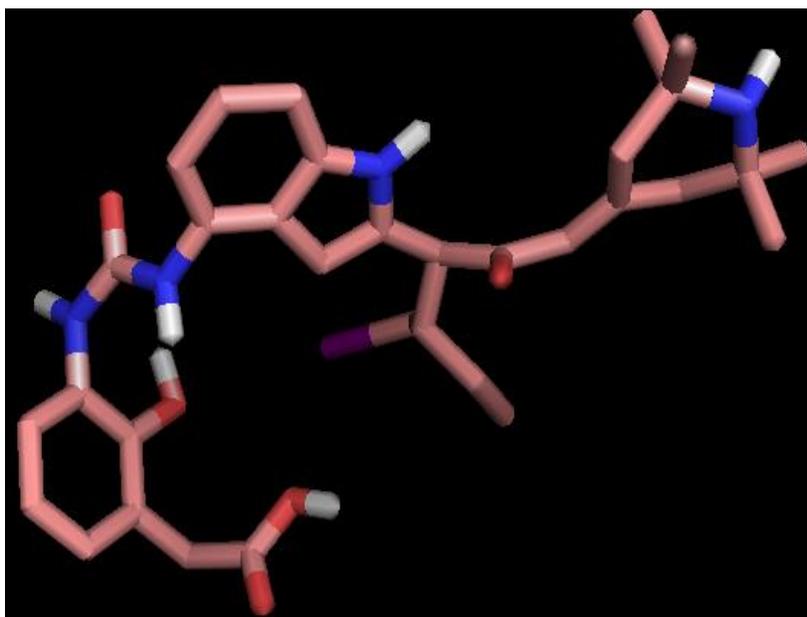
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 42 Molécula 9 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B



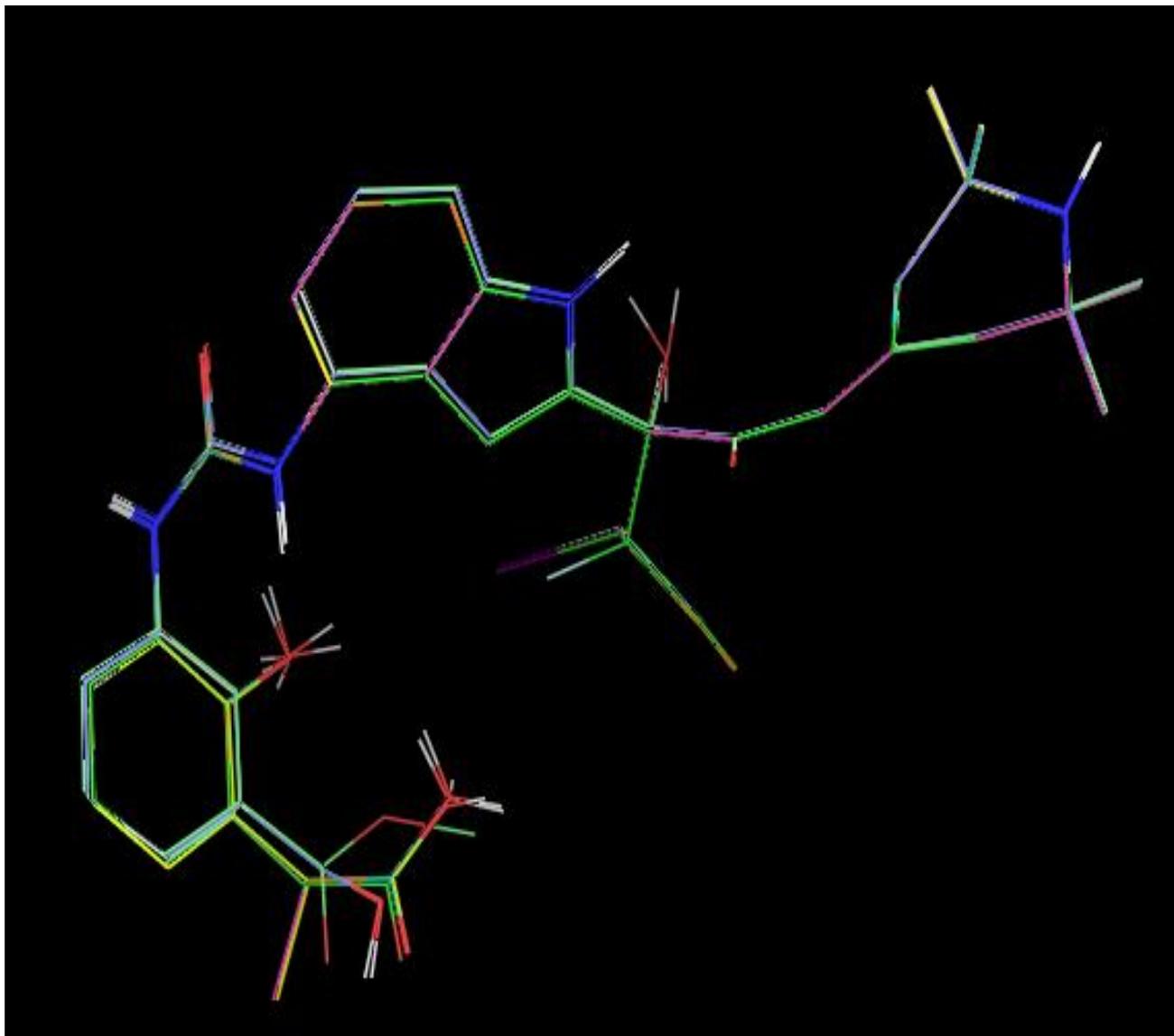
Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 43 Molécula 9 creada utilizando LigBuilder a partir de Calixolano B



Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Imagen 44 Comparación de las 10 mejores moléculas creadas utilizando LigBuilder a partir de la Calixolano B



Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Tabla 15 Medidas de similitud de las huellas digitales de las nuevas 20 mejores moléculas creadas vs. Los antiretrovirales ya existentes

No.	Fórmula molecular	Peso molecular g/mol	Medida de Similitud-Morgan	Medida de Similitud-Pares de Átomos	Medida de Similitud-Torsión
1.	C ₃₀ NO ₈ Br ₂ H ₃₃	695.3929	0.0367	0.2867	0.0335
2.	C ₃₄ NO ₇ F ₂ H ₄₄	616.7124	0.0333	0.2703	0.0204
3.	C ₂₆ NO ₆ BrH ₂₈	530.4076	0.0296	0.2659	0.0315
4.	C ₃₂ NO ₇ H ₄₁	551.6704	0.0320	0.2589	0.0194
5.	C ₃₃ NO ₁₀ F ₂ H ₄₀	648.6682	0.0278	0.2717	0.0281
6.	C ₃₄ N ₂ O ₁₀ BrH ₄₁	717.6007	0.0364	0.2795	0.0263
7.			0.0367	0.2770	0.0279
8.	C ₃₅ N ₂ O ₇ FH ₄₇	626.7553	0.0416	0.2697	0.0218
9.	C ₃₉ N ₂ O ₈ F ₂ H ₅₃	715.8435	0.0357	0.2831	0.0200
10.	C ₃₅ NO ₈ FH ₄₇	628.7479	0.0362	0.2828	0.0301
11.	C ₂₈ NO ₉ Br ₂ H ₂₉	683.3391	0.0358	0.2815	0.0367
12.	C ₃₄ NO ₇ F ₂ H ₄₄	616.7124	0.0442	0.2773	0.0342
13.	C ₃₆ NO ₈ FBrH ₄₆	719.6547	0.0343	0.2754	0.0232
14.	C ₃₇ N ₂ O ₇ FH ₅₂	655.8164	0.0331	0.2955	0.0341
15.			0.0453	0.2920	0.0415
16.	C ₃₅ NO ₅ BrH ₅₀	644.6791	0.0326	0.2867	0.0334
17.	C ₃₂ NO ₉ ClBrH ₃₇	694.9945	0.0336	0.2894	0.0337
18.	C ₃₈ N ₂ O ₉ F ₂ H ₅₁	717.8163	0.0334	0.2892	0.0365
19.	C ₃₂ NO ₈ FIH ₃₈	710.5488	0.0401	0.2850	0.0258
20.	C ₃₃ N ₂ O ₇ H ₄₃	579.7037	0.0456	0.2780	0.0363
21.	C ₃₉ N ₂ O ₈ F ₂ H ₅₃	715.8435	0.03390	0.2888	0.0401
22.	C ₃₁ N ₃ O ₅ IH ₃₆	657.5391	0.03863	0.2711	0.0346
23.	C ₃₀ N ₃ O ₅ FBrH ₃₂	613.4945	0.03960	0.2698	0.0297
24.	C ₃₆ NO ₇ F ₂ H ₄₈	644.7656	0.04174	0.2876	0.0336
25.			0.03461	0.2858	0.0296
26.	C ₃₆ N ₂ O ₇ H ₄₈	620.7755	0.03231	0.2878	0.0356
27.	C ₃₃ NO ₇ FIH ₄₂	710.5919	0.02694	0.2854	0.0268
28.	C ₃₀ NO ₆ H ₃₉	509.6337	0.02878	0.2452	0.0199
29.	C ₃₂ NO ₉ BrH ₃₈	660.5494	0.04398	0.2846	0.0334
30.	C ₂₉ NO ₇ ClIH ₃₃	669.9323	0.03792	0.2689	0.0376
31.	C ₃₅ NO ₉ H ₄₆	624.7410	0.03854	0.2743	0.0249
32.	C ₃₉ NO ₉ FH ₅₃	698.8378	0.03632	0.2891	0.0417
33.	C ₃₀ NO ₆ H ₃₇	507.6178	0.03290	0.2566	0.0174
34.			0.03087	0.2859	0.0279
35.	C ₃₂ N ₂ O ₇ FIH ₄₁	711.5800	0.03712	0.2802	0.0340
36.	C ₃₄ NO ₇ FH ₄₃	596.7061	0.03585	0.2771	0.0284

No.	Fórmula molecular	Peso molecular g/mol	Medida de Similitud-Morgan	Medida de Similitud-Pares de Átomos	Medida de Similitud-Torsión
37.	$C_{35}N_3O_6BrH_{42}$	680.6284	0.03849	0.2806	0.0337
38.			0.03777	0.2847	0.0388
39.	$C_{28}N_2O_8FBrH_{33}$	624.47265	0.05217	0.2880	0.0343
40.	$C_{36}N_4O_5FBrH_{46}$	713.67663	0.03482	0.2817	0.0413

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

9. DISCUSIÓN

Se observó que el antiretroviral con una mejor energía de interacción con la VIH proteasa es el Saquinavir con un promedio de energía mínima de -10.2 Kcal/mol, ya que su función de evaluación es la menor de todos los antiretrovirales, se puede inferir que el Saquinavir posee la conformación más estable de los antiretrovirales inhibidores de la VIH proteasa ya existentes. A este le siguen el Nelfinavir y el Indinavir con un promedio de energía mínima de -9.9 Kcal/mol y de -9.8 Kcal/mol respectivamente. También se observó que el promedio de energía mínima menos favorable es para Amprenavir con -8.7 Kcal/mol, ya que es la mayor energía obtenida de todos los antiretrovirales.

El Calyxolano B posee un promedio de energía mínima de -7.8 Kcal/mol, siendo este resultado el más cercano al del antirretroviral con energía mínima menos favorable (Amprenavir), por lo que esta molécula como tal, podría indicar que, sería de las cuatro moléculas utilizadas, el mejor de los candidatos para crear una nueva molécula. La Calyxamina A y la Calyxamina B tienen el mismo promedio de energía mínima de -5.7 Kcal/mol, siendo estos los de mayor energía de estas moléculas. El Calyxolano A obtuvo un promedio de energía mínima de -7.6 Kcal/mol, considerablemente menor al de las Calyxaminas, pero mayor al del Calyxolano B, por lo que esta estructura podría ser el segundo mejor candidato para crear la nueva molécula.

Se crearon las nuevas moléculas, posibles antiretrovirales inhibidores de la VIH proteasa a partir de las Calixaminas A y B y los Calixolanos A y B, obteniendo un total de 4,133 moléculas nuevas, 2,134 moléculas nuevas de la Calixamina A, 1,088 de la Calixamina B, 449 del Calixolano A y 462 del Calixolano B.

Todas estas moléculas también fueron acopladas para obtener las funciones de evaluación de cada uno y luego se tomaron las 10 moléculas con las mejores energías para cada Calixamina y cada Calixolano. Se observó que la menor energía

obtenida es para una molécula creada a partir de la Calixamina A con -12.2 Kcal/mol y la de mayor energía es para una molécula creada a partir del Calixolano A con -10.6 Kcal/mol, aun así todas entran en el rango de energía de los antirretrovirales ya existentes (-10.2 Kcal/mol a -8.7 Kcal/mol) por lo que si cumplen con esta función.

Con respecto a las estructuras moleculares obtenidas a partir de la Calixamina A, se observó que estas no cambian mucho entre ellas, por lo que se puede inferir que debido a esto las energías obtenidas en la función de evaluación no varían mucho entre ellas.

En cuanto a las estructuras moleculares que se obtuvieron a partir de la Calixamina B, sí se observó una mayor variación, pero a pesar de eso la energía mínima se mantuvo igual para las diez moléculas obtenidas, por lo que se podría pensar que la posición de los átomos que varían en estas estructuras no son significativas al momento de realizar el acoplamiento de estas moléculas en su receptor (docking).

Las estructuras moleculares de las nuevas moléculas creadas a partir del Calixolano A si varían entre ellas al igual que su rango de energía por lo que se puede inferir que en este caso los átomos que varían y su posición si influyen en el momento de realizar el acoplamiento de estas moléculas a su receptor.

En el caso de las nuevas moléculas creadas a partir del Calixolano B se observó que sus estructuras moleculares son bastante parecidas entre ellas al igual que el rango de energía mínima, en el caso de la Calixamina A es de la misma manera, por lo que se puede inferir que debido a que las estructuras moleculares son similares la función de evaluación no varía mucho.

Las nuevas estructuras son de un tamaño parecido a las estructuras de los antiretrovirales ya existentes, al igual que las energías mínimas, por lo que esto puede indicar que si son candidatos para obtener antiretrovirales que inhiban a la VIH proteasa.

Al observar los resultados se pudo observar que la similitud de las huellas digitales no es ni de 50% en ninguna de las características evaluadas ya que ninguna se

acerca a 1, sino que están más cerca de 0, sin embargo este trabajo de investigación se basó más en la actividad de los nuevos antiretrovirales (dockings) para escoger a los posibles candidatos que pueden funcionar como antiretrovirales que inhiban a la VIH Proteasa más que en la forma (huella digital o fingerprints) de los nuevos antiretrovirales, además hay que tomar en cuenta que a pesar que no existe demasiada similitud entre las huellas digitales, hay excepciones al principio de propiedades similares y estas moléculas a pesar de su baja similitud todavía falta ser evaluadas con otros parámetros como las Reglas de Lipinski antes de poder confirmar su actividad o descartar su actividad como antiretrovirales que inhiban a la VIH proteasa.

Al comparar las fórmulas moleculares de los nuevos antirretrovirales con las fórmulas moleculares de los antirretrovirales inhibidores de la VIH proteasa se observó que son bastante similares en cuanto al número de carbonos, hidrógenos, oxígenos y nitrógenos que poseen, sin embargo hay algunas diferencias, por ejemplo en los antirretrovirales ya existentes se observaron otros átomos como azufre (S) y fósforo (P), sin embargo el flúor (F) si se encuentra en tanto en las moléculas nuevas como en los antiretrovirales ya existentes, puede ser que este ayude a potenciar el efecto del antiretroviral. Otras moléculas que se pudieron observar en las moléculas creadas fueron del grupo de los halógenos (Cl, Br, I), es importante poner especial atención a la toxicidad de estas moléculas cuando se realice el análisis ADME/TOX y los ensayos in vitro e in vivo, ya que estas moléculas le pueden brindar cierta toxicidad a las nuevas moléculas.

En este estudio no se observó a que aminoácidos se enlazan las moléculas por esta razón en este caso no se pudo concluir si esto afectará o no la efectividad de las nuevas moléculas creadas.

En base a la información descrita anteriormente se puede indicar que una parte de la hipótesis se cumple ya que se encontró al menos una molécula derivada de las calixaminas y calixolanos que muestre afinidad por la VIH proteasa, sin embargo la similitud molecular con los inhibidores de la VIH proteasa no se cumple ya que los resultados de las huellas digitales obtenidas se acercan más a 0 que a 1, por lo tanto no cumple con esta característica.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Se identificaron por medio de métodos teórico-computacionales, diez moléculas derivadas de las calixaminas y diez derivadas de los calixolanos que posiblemente pueden inhibir a la VIH proteasa.
- 10.2 Se determinó una línea base de energías de enlace de los antiretrovirales inhibidores de la VIH proteasa, a través de docking molecular que va desde -10.2 Kcal/mol (Saquinavir) a -8.7 Kcal/mol (Amprenavir), para tener una relación entre el nivel energético y la efectividad de la actividad inhibitoria de una molécula.
- 10.3 Se conocen 23 mutaciones resistentes a los inhibidores de la VIH proteasa, pero en este caso en los resultados obtenidos no se observó a que aminoácido se enlazan las moléculas por lo que no se pudo concluir si esto afectará o no la efectividad de la nueva molécula creada.
- 10.4 Se generaron virtualmente más de 500 derivados de los calixolanos y 500 derivados de las calixaminas, con un total de 4,133 moléculas, utilizando el programa LigBuilder 2.0.
- 10.5 Se obtuvo 10 derivados de cada Calixamina y 10 derivados de cada Calixolano con energías cercanas y por debajo de la línea base establecida y se descartaron las demás moléculas. Las energías de las 10 moléculas derivadas de la Calixamina A van de -12.2 a -12.0 Kcal/mol, para la Calixamina B la energía para las 10 moléculas es de -10.7 Kcal/mol, las 10 moléculas derivadas del Calixolano A van desde -11.9 Kcal/mol a -10.6 Kcal/mol y por último el rango de energía de las 10 moléculas derivadas del Calixolano B van de -11.4 Kcal/mol a -11.1 Kcal/mol.
- 10.6 Se evaluó la similitud de las nuevas moléculas con los antiretrovirales ya existentes, y se obtuvieron resultados muy diferentes (fingerprint similarity

bajo), por esta razón un análisis QSAR no podrá ayudar a la predicción de la actividad, mientras que el docking (energía mínima) sí lo podrá hacer.

- 10.7 La similitud de las huellas digitales no es de ni 50% en ninguna de las características evaluadas ya que ninguna se acerca a 1, obteniéndose resultados para la medida de similitud de Morgan de 0.0367 a 0.0456, para la similitud de pares de átomos va de 0.2867 a 0.2780 y la de Torsión que va desde 0.0335 a 0.0363, acercándose más a 0.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Se recomienda realizar la síntesis en el laboratorio de las moléculas propuestas en este trabajo para evaluar algunas de sus propiedades.
- 11.2 Realizar las pruebas *in vitro* e *in vivo* de estas moléculas para poder determinar las propiedades ADME/TOX (administración, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad: dosis letales tóxicas (LD₅₀)) y evaluar si estas tienen características similares a los antiretrovirales inhibidores de la VIH proteasa ya existentes.
- 11.3 Utilizando química computacional realizar un análisis QSAR más específico el cual incluya la evaluación de las reglas de Lipinski, para conocer el comportamiento de estas moléculas y si cumplen o no con estas reglas que son importantes para determinar si se pueden utilizar como fármacos o no.
- 11.4 Cuantificar la efectividad de aquellos derivados que se enlazan con las zonas mutantes de VIH-proteasa y analizar su relación estructura actividad realizando un análisis QSAR.

12. REFERENCIAS

- Abfalterer, W., Dimitrijevic, M., Funkhouser, B., Hraber, P., Krishnamoorthy, M., Macke, J., . . . Yoon, H. (2012). *HIV Sequence Compendium 2012*. Los Alamos, New Mexico: Theoretical Biology and Biophysics Group.
- Advanced Micro Devices, Inc.* (2013, 09 02). Retrieved from <http://www.amd.com/us/products/notebook/Pages/consumer-notebooks.aspx#7>
- Bergman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissig, H., . . . Bourne, P. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Research*, *28*(1), 235-242.
- Berthold, M., Cebron, N., Dill, F., R. Gabriel, T., Kötter, T., Meinel, T., . . . Wiswedel, B. (2007). KNIME: The Konstanz Information Miner. *Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization*, 319-326.
- Butler, M. S. (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, *67*(12), 2141-2143.
- Carrazcosa, F. (2009). *Diseño de un nuevo fármaco inhibidor de la proteasa presente en el Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 a partir de 3 antirretrovirales (Lopinavir, Darunavir, Tipranavir), por medio de nanotecnología computacional*. Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- CONCYT-.
- Carrazcosa, J. F. (2008). Interacción de linfocitos T CD4 con el segmento V3 de la glicoproteína 120 presente en el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1. *Tesis de Licenciatura en Química*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cedron, J. L. (2011). *Química General*. (Pontificia Universidad Católica del Perú) Retrieved 07 01, 2015, from <http://corinto.pucp.edu.pe/quimicageneral/unidades-q2/unidad-1-termodinamica-quimica2679.html?page=1>
- Chang, M., Ayeni, C., Breuer, S., & Torbett, B. (2010). Virtual Screening For HIV Protease Inhibitors: A comparison of AutoDock 4 and Vina. *Plos One*, 1-9.
- Chen, L., Perlina, A., & Lee, C. (2004). Positive Selection Detection in 40,000 Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Sequences Automatically Identifies Drug Resistance and Positive Fitness Mutations in HIV Protease and Reverse Transcriptase. *Journal of Virology*, *78*(7), 3722-3732.
- Cóbar, O., & Mencos, A. (2004). *Síntesis y actividad biológica de calixaminas y calixolanos, dos nuevas clases de productos naturales marinos*. Guatemala: Dirección General de Investigación, USAC.

- Comisión Nacional de Energía Eléctrica, República de Guatemala.* (2013, 09 02). Retrieved from <http://www.cnee.gob.gt/Calculadora/Index.php>
- Durrant, J., Amaro, R., & McCammon, A. (2009). AutoGrow: A Novel Algorithm for Protein Inhibitor Design. *Chemical Biology and Drug Design*, 73(2), 168-178.
- Fauci, A., Braunwald, E., Kasper, D., Hauser, S., Longo, D., Jameson, L., & Loscalzo, J. (2009). *Harrison Principios de Medicina Interna*. China: McGraw-Hill.
- García, J. (2007). *Análisis de Situación de ITS, VIH y SIDA*. Guatemala: Boletín Epidemiológico Nacional.
- Hanwell, M., Curtis, D., Lonie, D., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(17), 1-17. Retrieved from Journal of Cheminformatics.
- Houston, D. W. (2012). Consensus Docking: Improving the Reliability of Docking in a Virtual Screening Context. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Irwin, J., & Shoinet, B. (2005). ZINC- A free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modelling*, 177-182.
- Jensen, J. (2010). *Molecular Modeling Basics*. United States: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Katzung, B. G. (2010). *Farmacología Básica y Clínica*. China: McGraw- Hill.
- Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J., & Bajorath, J. (2004). Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3, 395-349.
- Knox, C., Law, V., Jewison, T., Liu, P., Frolkis, A., Pon, A., . . . Wishart, D. (2011). DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'Omics' Research on Drugs. *Nucleic Acids Research*, 1035-1041.
- Landrum, G. (2012). *Novartis, Institutes for BioMedical Research, RDKit UGM*. Retrieved from Fingerprints in the RDKit: http://rdkit.org/UGM/2012/Landrum_RDKit_UGM.Fingerprints.Final.pptx.pdf
- Lipinski, C. (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44, 235-249.
- Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., & Feeney, P. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 3-26.

- Morris, G., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M., Belew, R., Goodsell, D., & Olson, A. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30, 2785-2791.
- Nelson, D. C. (2009). *Lehninger Principios de Bioquímica* (5° edición. ed.). España: Ediciones Omega.
- Petterson Salom, S. H. (s. f.). *Universitat Ramon Llull, Barcelona*. Retrieved from Diseño, Selección y Síntesis de Nuevos Inhibidores de entrada del VIH.: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9298/tsps3.pdf;jsessionid=256C0076628048C590D479D9429EC919.tdx1?sequence=3>
- Polache, P. (s. f.). *Farmacología de los Fármacos Antirretrovirales*. (U. d. externos8, Producer, & Hospital General Universitario de Alicante) Retrieved 07 01, 2015, from <http://www.educasida.es/sites/default/files/Farmacolog%C3%ADa%20de%20los%20f%C3%A1rmacos%20antirretrovirales.pdf>
- Rodríguez, A., Cobar, O., & Padilla, O. (1997). The Calyxolanes: New 1,3-Diphenylbutanoid Metabolites Isolated from the Caribbean Marine Sponge Calyx podatypa. *Journal of Natural Products*, 915-917.
- Rodríguez, A., Cobar, O., Padilla, O., & Barnes, C. (1997). Calyxamines A and B, Novel Piperidine Alkaloids from the Caribbean Sea. *Journal of Natural Products*, 1331-1333.
- Rodríguez, J., & Farias, A. (2013). *Genoma del VIH: estructura, expresión y regulación*. Recuperado el 25 de Febrero de 2013, de TTMed - Timely Topics in Medicine - Your Complete Medical Education Portal: http://ww2.ttmed.com/sinsecc.cfm?http://ww2.ttmed.com/arg_sida/texto_art_long.cfm?ID_dis=212&ID_Cou=20&ID_Art=1356&ComeCover=Y&ID_dis=212&ID_cou=20
- Runestone Electric Association. (2013, 09 02). Retrieved from Energy Usage Chart: http://www.runestoneelectric.com/energyusage_chart.cfm
- Schneider, G., & Fechner, U. (2005). Computer- Based De Novo Design of Drug-Like Molecules. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 649-663.
- Shoichet, B. K. (2004). Virtual Screening of Chemical Libraries. *Nature*, 432, 862-865.
- Social, M. d. (2009). *Causas de Morbilidad Por VIH y SIDA a Nivel Nacional Año 2009*. Recuperado el 26 de Febrero de 2013, de Sistema de Información General en Salud: http://sigsa.mspas.gob.gt/bioestadisticas/2009/consolidado/morbilidad/por_VIH_y_SIDA.pdf

- Social, M. d. (2010). *Casos de Morbilidad por VIH y SIDA a Nivel Nacional Año 2010*. Recuperado el 26 de Febrero de 2013, de Sistema de Información Gerencial en Salud: <http://sigsa.mspas.gob.gt/>
- Song, C., Lim, S., & Tong, J. (2009). Recent Advances in Computer-Aided Drug Design. *Briefings of Bioinformatics*, 579-591.
- Srinivas, A., Priyadarshini, S., Praveen, P., Pradeep, H., & Narahari, G. (2007). Virtual Screening in Drug Discovery – A Computational Perspective. *Current Protein and Peptide Science*, 331-353.
- Taha, M., Habash, M., Al-Hadidi, Z., Al-Bakri, A., Younis, K., & Sisan, S. (2011). Docking-Based Comparative Intermolecular Contacts Analysis as New 3-D QSAR Concept for Validating Docking Studies and in Silico Screening: NMT and GP Inhibitors as Case Studies. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 647–669.
- Trott, O., & Olson, A. (2010). AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455–461.
- Vargas, R. (2012). *Diseño de un nuevo fármaco inhibidor de la proteasa presente en el Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo uno a partir de tres antirretrovirales (Lopinavir, Darunavir, Tipranavir), por medio de nanotecnología computacional*. Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- CONCYT-.
- Verma, J., Khedkar, V., & Coutinho, E. (2010). 3D-QSAR in Drug Design - A Review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 95-115.
- Willet, P. (2011). *White Rose Research Online, Universities of Leeds, Sheffield and York*. Retrieved from Similarity-based data mining of molecular resemblance: http://eprints.whiterose.ac.uk/76256/2/WRRO_76256.pdf
- Wlodawer, A., & Vondrasek, J. (1998). INHIBITORS OF HIV-1 PROTEASE: A Major Success of Structure- Assisted Drug Design. *Annual Reviews: Biophysics and Biomolecular Structure*, 249- 284.
- Yuan, Y., Pei, J., & Lai, L. (2011). LigBuilder 2: A Practical de Novo Drug Design Approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51, 1083-1091.

13. ANEXOS

13.1 Marco Teórico

13.2 Virus de Inmunodeficiencia Humana VIH

En 1983 se aisló el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a partir de un paciente con adenopatías linfáticas y en 1984 se demostró claramente que dicho virus era el agente causal del SIDA. En 1985 se desarrolló una prueba de inmunoabsorbente ligado a enzimas que permitió percatarse del alcance y la evolución de la epidemia de infección por el VIH (Fauci, y otros, 2009).

El sistema de clasificación actual de los CDC para adolescentes y adultos infectados con VIH ubica a las personas con base en las enfermedades asociadas con la infección con VIH y los recuentos de linfocitos T CD4+. El sistema se basa en tres niveles de recuento de los linfocitos en cuestión y en tres categorías clínicas. Con este sistema, cualquier paciente con infección por el VIH con un recuento de linfocitos T CD4+ menor de 200/μl sufre, por definición SIDA, sin importar si presenta o no los síntomas de una o varias enfermedades oportunistas (Fauci, y otros, 2009).

El agente etiológico del SIDA es el VIH, que pertenece a la familia de los retrovirus humanos (*Retroviridae*) dentro de la subfamilia lentivirus. Los cuatro retrovirus humanos reconocidos pertenecen a dos grupos distintos: Los virus linfotrópicos de las células T humanas I y II, que son retrovirus transformadores, y los virus de la inmunodeficiencia humana, VIH-1 y VIH-2, que tiene efectos citopáticos directos o indirectos, es decir que pueden ocurrir cambios bioquímicos, moleculares, morfológicos en el ciclo de replicación viral (Fauci, y otros, 2009).

El VIH se transmite por medio de contactos homosexuales y heterosexuales; con la sangre y los hemoderivados; y por contagio de la madre infectada a su hijo durante el parto, el periodo perinatal o a través de la leche materna. Después de más de 25 años de investigación y de análisis minuciosos, no se han encontrado pruebas de

que el VIH se transmita por contactos casuales, ni de que los insectos sean capaces de propagar el virus (Fauci, y otros, 2009).

13.2.1 Epidemiología:

La infección por VIH y el SIDA son una pandemia, con casos reportados en prácticamente todo el mundo. Más del 95% de las personas que viven con VIH/SIDA residen en países con ingresos bajos o medios; casi 50% son mujeres y 2.5 millones son niños menores de 15 años de edad (Fauci, y otros, 2009).

En Guatemala, los datos provistos por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social en 2007, muestran que desde enero de 1984 hasta octubre de 2007 había un total de 10,667 casos reportados, de los cuales 519 casos fueron transmitidos de madre e hijo (Carrazcosa J. F., 2008).

En el 2009 el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social reportó un total de 2,006 casos de morbilidad¹ de VIH y SIDA a nivel nacional (Tabla 1) (Social M. d., 2009), para el 2010 se observó un descenso considerable en los casos reportados de personas con VIH como se observa en la (Tabla 2) (Social M. d., 2010). El Ministerio no reporta el total de personas con VIH y SIDA para los años del 2011 al 2013, tampoco se reporta la mortalidad por VIH y SIDA.

En Guatemala en el año 2003 el Centro Nacional de Epidemiología inició un programa de vigilancia del VIH y en el periodo de julio 2003-marzo 2007 se notificaron un total de 3.312 casos, el 63% comprendidos entre las edades de 20-39 años, en relación al grupo étnico el 77% son ladinos y 18% mayas, según el estado civil: el 37% son solteros seguidos de un 30% que viven en unión libre. El 28% de estas personas han cursado únicamente la primaria, 28 % son alfabetos y el 24% analfabetos. La vía de transmisión es sexual en un 94%. El 51% de todos los casos se presentan en género femenino.

¹ Morbilidad es la cantidad de individuos que son considerados enfermos o que son víctimas de enfermedad en un espacio y tiempo determinados

La epidemia en el año 2007 se consideraba como concentrada, según estudios de seroprevalencia² que fueron realizados, en mujeres trabajadoras del sexo (8,7%), hombres que tienen sexo con otros hombres (11,5%) y mujeres embarazadas (0,49%), sin embargo se sabe que la población que sufre de VIH-SIDA ha ido aumentando considerablemente en los últimos años (García, 2007).

Tabla 16
Causas de Morbilidad Por VIH y SIDA a Nivel Nacional Año 2009.

Morbilidad	Total Casos
Estado de infección asintomática por el virus de la inmunodeficiencia humana VIH	1,805
SIDA	155
Síndrome de infección aguda debida a VIH	43
Enfermedad por VIH, resultante en síndrome caquéctico	3
Total	2,006

Fuente: Social M. d., 2009

Tabla 17
Causas de Morbilidad por VIH y SIDA a Nivel Nacional año 2010.

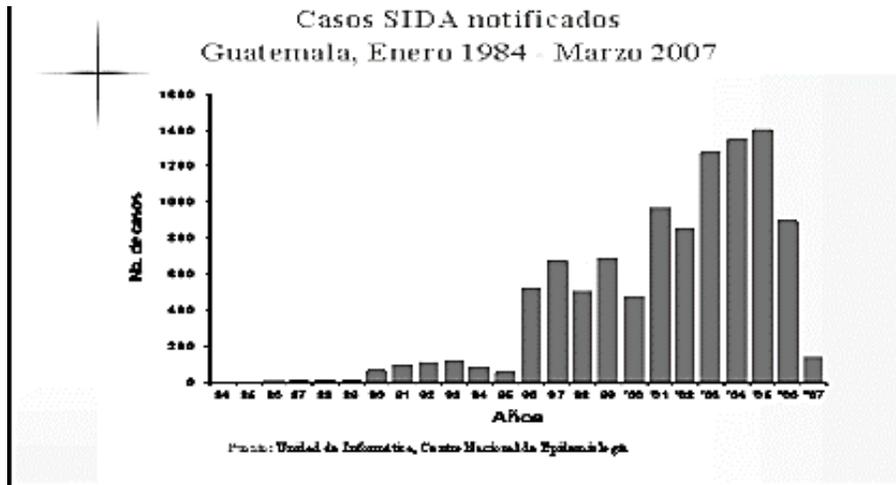
Morbilidad	Total Casos
SIDA	707
Enfermedad por VIH, resultante en enfermedad infecciosa o parasitaria no específica	83
Enfermedad por VIH, resultante en otras enfermedades infecciosas y parasitarias	11
Síndrome de infección aguda debida a VIH	4
Enfermedad por VIH, resultante en síndrome caquéctico	3
Enfermedad por VIH, resultante en otras afecciones especificadas	2
Enfermedad por VIH, resultante en encefalopatía	1
Enfermedad por VIH, resultante en infección por micobacterias	1
Total	812

Fuente: Social M. d., 2010

A partir del año 1996, se ha registrado un aumento significativo en casos de SIDA. Se reporta que el 66% de los casos han sido acumulados en los años 2000- 2006 (García, 2007).

² Seroprevalencia: Prevalencia global de una enfermedad transmitida por la sangre dentro de una población definida en un tiempo determinado.

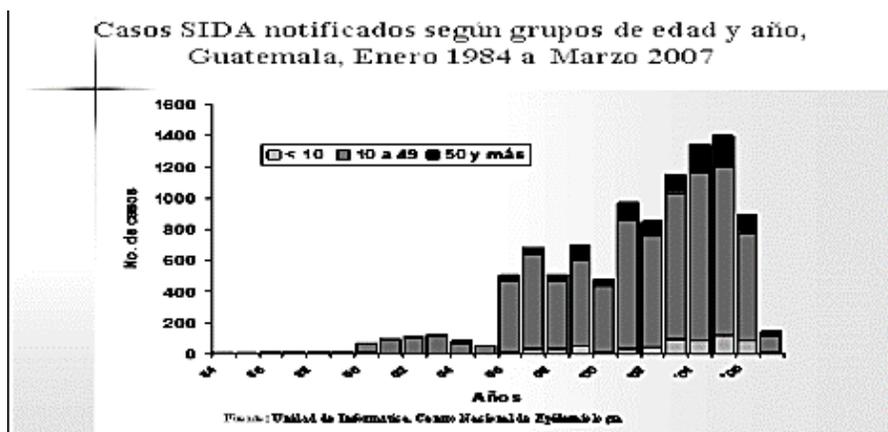
Gráfica 1
Casos de SIDA en Guatemala enero 1984-2007.



Fuente: García, 2007

Este estudio también indicó que la población con mayor cantidad de casos de SIDA se encuentra entre jóvenes de 25 a 29 años de edad, seguido por el grupo de 30-34 años de edad, sexualmente activos y en edad económica productiva (García, 2007).

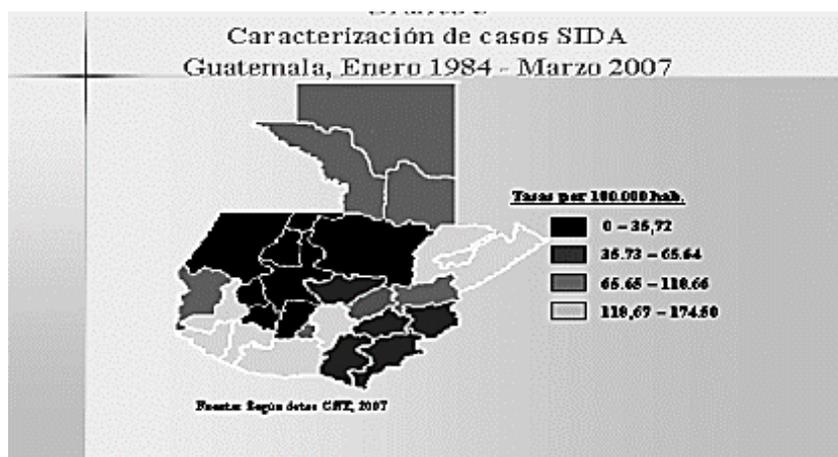
Gráfica 2
Casos de SIDA en Guatemala según grupos de edad y año, Enero 1984- Marzo 2007.



Fuente: (García, 2007)

Un análisis espacial realizado en este estudio demostró que el 69% de los casos notificados al sistema de vigilancia se concentra en los departamentos de Escuintla, Suchitepéquez, Guatemala, Izabal, Retalhuleu y Quetzaltenango, que son considerados departamentos de alto comercio en Guatemala (García, 2007).

Gráfica 3
Caracterización de Casos SIDA Guatemala, Enero 1984- Marzo 2007.



Fuente: (García, 2007)

13.2.2 Manifestaciones Clínicas:

Las consecuencias clínicas de la infección por el VIH se extienden desde un síndrome agudo que se presenta en asociación con la infección primaria pasando por un estado asintomático prolongado hasta la fase de enfermedad avanzada (Fauci, y otros, 2009).

Los individuos con infección por el VIH padecen un síndrome clínico agudo tres a seis semanas aproximadamente después de la infección primaria. Al principio disminuyen el número total de linfocitos y todas las poblaciones de linfocitos T (CD4+ y CD8+). Más tarde aparece una inversión del cociente CD4+/CD8+ debido a la elevación de las células T CD8+. El número total de linfocitos CD8+ puede mantenerse elevada o puede disminuir un poco volviendo a la normalidad, mientras que el número total de linfocitos CD4+ permanece disminuidos. Aparecen

adenopatías en algunos pacientes. La mayoría de los pacientes se recuperan en forma espontánea de este síndrome y tienen un ligero descenso del número de células T CD4+ que se mantiene estable durante un periodo variable antes de que comience a disminuir progresivamente, en algunos individuos la cantidad de linfocitos T CD4+ vuelve a sus límites normales. Las manifestaciones clínicas del síndrome agudo se presentan a continuación (Fauci, y otros, 2009).

Imagen 4
Manifestaciones Clínicas del Síndrome Agudo por el VIH.

Generales	Neurológicas
Fiebre	Meningitis
Faringitis	Encefalitis
Linfadenopatías	Neuropatía periférica
Cefalea/dolor retroorbitario	Mielopatía
Artralgias/mialgias	Dermatológicas
Letargo/malestar	Exantema eritematoso maculopapuloso
Anorexia/pérdida de peso	Úlceras mucocutáneas
Náuseas/vómitos/diarrea	

Fuente: Anthony Fauci, 2009

El tiempo que transcurre desde la infección inicial hasta las primeras manifestaciones clínicas varía mucho, la mediana de ese período es aproximadamente de 10 años para los pacientes no tratados. Los pacientes que tienen niveles elevados del RNA vírico progresan a la enfermedad sintomática con mayor rapidez que aquéllos con niveles bajos de RNA del VIH. Las personas denominadas sin progresión a largo plazo, muestran un escaso o nulo descenso del número de linfocitos T CD4+ durante un período prolongado (Fauci, y otros, 2009).

En otros casos, los individuos permanecen totalmente asintomáticos a pesar de que sus células T CD4+ descienden a cifras extraordinariamente bajas. En ellos, la

aparición de una infección oportunista puede ser la primera manifestación de la infección por el VIH (Fauci, y otros, 2009).

Los síntomas de la enfermedad por el VIH pueden aparecer en cualquier momento durante el curso de la infección. Las complicaciones más graves y potencialmente letales de la infección por el VIH aparecen en los pacientes con recuentos por debajo de 200/ μ l. El diagnóstico del SIDA se establece en todo aquel que presenta una infección por el VIH y un recuento de linfocitos T CD4+ menor de 200/ μ l y en cualquiera con infección por el VIH que adquiere una de las enfermedades asociadas con el VIH que se consideran como indicativas de un defecto grave de la inmunidad celular (Fauci, y otros, 2009).

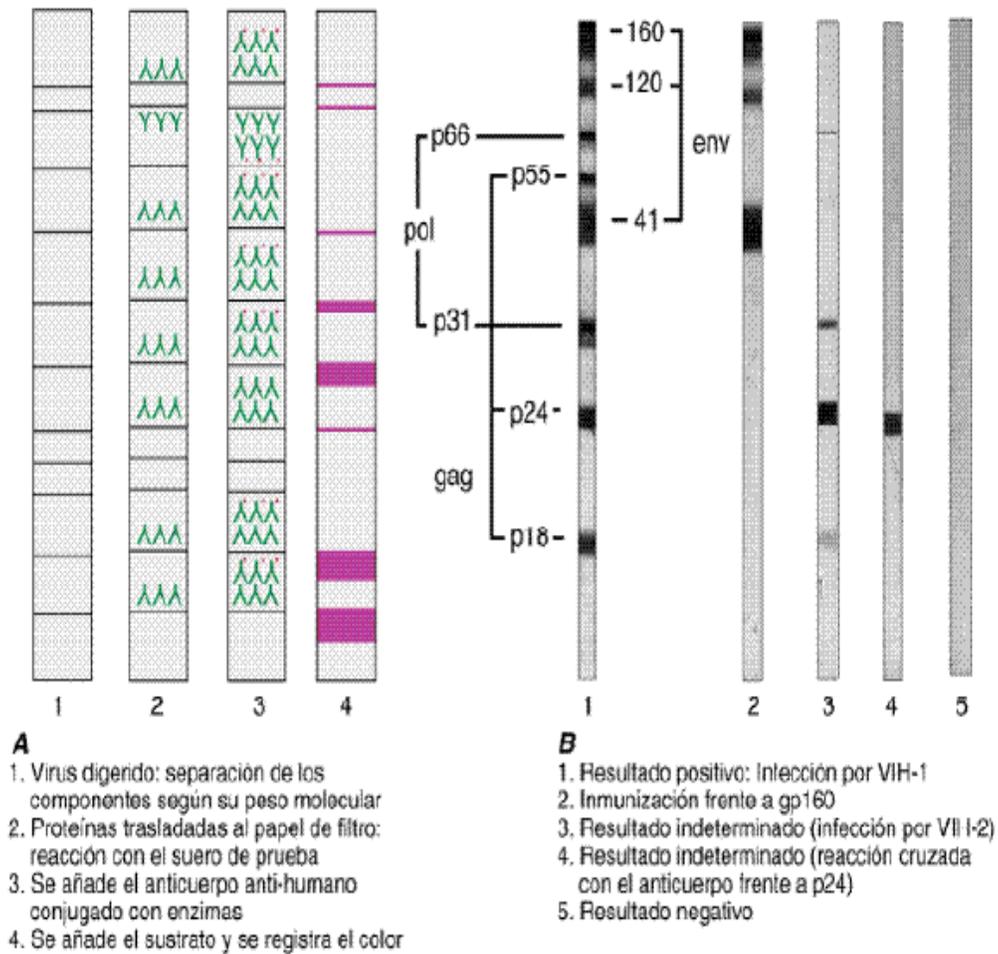
13.2.3 Diagnóstico de la Infección por VIH:

El diagnóstico se basa en la demostración de los anticuerpos anti-VIH. La prueba convencional de detección sistemática del VIH es la prueba de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), también conocida como inmunoanálisis enzimático, su sensibilidad supera 99.5%. Se emplea un equipo comercial de ELISA que contiene antígenos del VIH-1 y VIH-2 y que proporciona el resultado de ambos análisis. Estos equipos contienen antígenos naturales y recombinantes que se actualizan constantemente para que conserve su sensibilidad frente a las nuevas especies que se descubren. Los resultados suelen expresarse como positivos (reacción intensa), negativos (reacción nula) o indeterminados (reacción parcial). Entre los factores que se asocian con unos resultados falsos positivos de la prueba de ELISA se encuentran los anticuerpos contra los antígenos de la clase II, los anticuerpos, las hepatopatías, la vacunación reciente contra la gripe y las infecciones víricas agudas, si se obtiene un resultado no concluyente o positivo de la prueba, es necesario confirmar la infección con un análisis más específico como inmunotransferencia (Fauci, y otros, 2009).

La ventaja de la prueba de inmunotransferencia está en que múltiples antígenos del VIH de peso molecular diferente y bien caracterizado despiertan la producción de

anticuerpos específicos. Estos antígenos pueden separarse basándose en su peso molecular y los anticuerpos frente a cada uno de ellos se pueden detectar en forma de bandas separadas mediante inmunotransferencia. Una inmunotransferencia negativa es aquella en la que no existen bandas a pesos moleculares correspondientes a los productos génicos del VIH. Cuando un paciente tiene positivo o indeterminado en una prueba ELISA y tiene una inmunotransferencia negativa, se puede llegar con seguridad a la conclusión de que el resultado de la prueba ELISA es un falso positivo. Una inmunotransferencia que demuestra la existencia de anticuerpos contra los productos de los tres genes principales del VIH es una prueba concluyente de infección por el VIH, en la Imagen 2 se puede observar una prueba de inmunotransferencia para detección de anticuerpos contra VIH. Existen dos posibles explicaciones de los resultados indeterminados. La más probable es que el paciente que se estudia tenga anticuerpos con reacciones cruzadas para una de las proteínas del VIH. Los anticuerpos que más a menudo dan una reacción cruzada son los que reaccionan con la p24, con la p55, o con ambas. La explicación menos probable de una inmunotransferencia indeterminada es que el individuo en estudio esté infectado por el VIH y esté poniendo en marcha la clásica respuesta por anticuerpos. La inmunotransferencia es una prueba de confirmación de la infección por el VIH de excelente calidad en los pacientes con ELISA positivo o indeterminado, pero es una mala prueba de detección sistemática (Fauci, y otros, 2009).

Imagen 5 Prueba de inmunotransferencia para detección de anticuerpos contra VIH



Fuente: Anthony Fauci, 2009

Otras pruebas que se pueden utilizar para la detección directa del VIH se pueden observar junto con sus características a continuación en la Imagen 6:

Imagen 6
Características de las Pruebas para la detección directa del VIH

Prueba	Técnica	Sensibilidad ^a	Coste por prueba (dólares estadounidenses)
Prueba de captura de antígeno p24 disociado del complejo inmunitario	Medición de las concentraciones de la proteína central del VIH-1 en un formato basado en ELISA después de la disociación de los complejos de antígeno y anticuerpo mediante el tratamiento con un ácido débil	Positiva en 50% de los pacientes; identifica hasta nada más 15 pg/ml de proteína p24	1-2
RNA del VIH mediante PCR	Amplificación mediante PCR del cDNA generado por el RNA vírico (amplificación de la diana)	Digna de confianza hasta con 40 copias/ml del RNA del VIH	75-150
RNA del VIH mediante bDNA	Medición de las concentraciones de RNA del VIH relacionado con partículas en una prueba de captura de ácido nucleico en la que se emplea la amplificación de la señal	Digna de confianza hasta con 75 copias/ml del RNA del VIH	75-150
RNA del VIH mediante NASBA	Amplificación isotérmica del ácido nucleico con controles internos	Digna de confianza hasta con 176 copias/ml del RNA del VIH	75-150

^a Las cifras de sensibilidad se refieren a las aprobadas por la FDA, de Estados Unidos. Los precios pueden ser más bajos en los casos de grandes volúmenes de pacientes.

Nota: ELISA, prueba de inmunoabsorbente ligado a enzimas; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; NASBA, prueba basada en la secuencia del ácido nucleico (*nucleic acid sequence based assay*).

Fuente: Anthony Fauci, 2009

13.2.4 Fisiopatología y Patogenia:

La característica principal de la enfermedad causada por el VIH es la profunda inmunodeficiencia, que se deriva sobre todo de un déficit progresivo, cuantitativo y cualitativo, de la subpoblación de linfocitos T conocida como *células T colaboradoras*. Estas células se definen fenotípicamente por tener en su superficie la molécula CD4 que funciona como el principal receptor celular del VIH. Se ha demostrado que, junto con la CD4, debe haber también un correceptor para que el VIH-1 pueda fusionarse y penetrar en forma eficaz en las células diana. El VIH utiliza

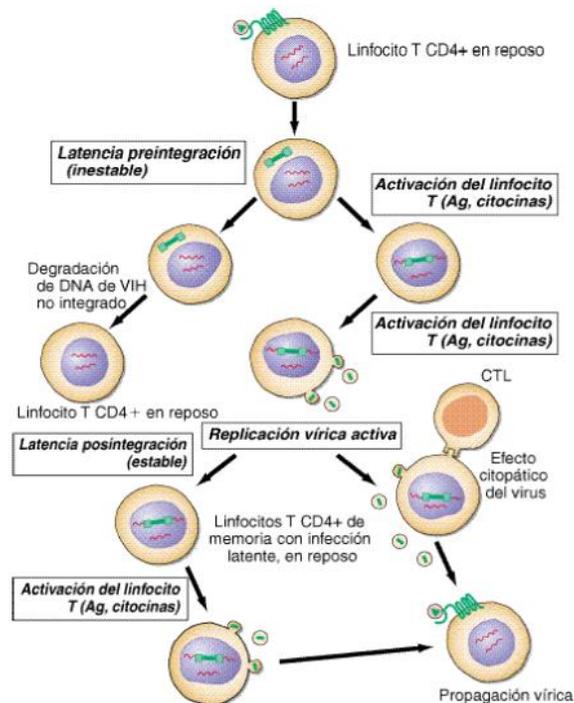
dos correceptores que también son receptores fundamentales para ciertas citosinas de atracción química denominadas quimiocinas y son moléculas pertenecientes a la familia de receptores de siete dominios transmembranosos acoplados a la proteína G. Los dos correceptores fundamentales que utiliza el VIH son CCR5 y CXCR4. Se han demostrado, *in vitro*, varios mecanismos que ocasionan la disfunción inmunitaria de las células T CD4+ y la reducción en el número de las mismas. Éstos incluyen infección directa y destrucción de dichas células por el VIH y la eliminación de células infectadas por el sistema inmunitario, así como los efectos indirectos, como el agotamiento inmunitario por la actividad celular aberrante y la activación de la muerte celular inducida (apoptosis). Los efectos patógenos del virus y los fenómenos inmunopatogénicos que se producen durante la evolución del SIDA se combinan de una forma compleja y heterogénea desde el momento de la infección inicial hasta el desarrollo de un estado avanzado de la enfermedad (Fauci, y otros, 2009).

Para poder apreciar mejor los mecanismos patógenos, es esencial tomar en cuenta la evolución clínica de un individuo afectado ya que estos mecanismos son multifactoriales y multifásicos y dependen de la etapa de la enfermedad en la que el paciente se encuentre (Fauci, y otros, 2009).

Prácticamente todos los individuos infectados por el VIH poseen una reserva de células T CD4+ en reposo en un estado de infección latente (como se observa en la Imagen 4) y dicha reserva probablemente actúa como al menos un componente del reservorio vírico persistente. La latencia posintegración en estas células consiste en que el provirus VIH se integra en el genoma de la célula y puede permanecer en este estado hasta que la señal de activación impulse la expresión de los virus con poder de replicación. Esta forma de latencia debe distinguirse de la latencia que ocurre antes de la integración cuando el VIH penetra en el interior de una célula T CD4+ en reposo y, en ausencia de una señal de activación la transcripción inversa del genoma del VIH es limitada. Este periodo de latencia preintegración puede durar horas o días y si no se envía una señal de activación a la célula, el DNA provírico

pierde su capacidad para iniciar una infección productiva. Si estas células son activadas, la transcripción inversa sigue adelante hasta completarse y el virus continúa su ciclo de replicación. La activación de la expresión del VIH desde el estado latente depende de la interacción de diversos factores celulares y víricos. Tras la transcripción, el mRNA del VIH es traducido a proteínas que sufren modificaciones mediante glucosilación, miristilación, fosforilación y escisión. La partícula vírica se forma por el ensamblaje de las proteínas, las enzimas y el RNA genómico del VIH en la membrana plasmática de la célula. Se produce la salida de la progenie de viriones a través de la membrana de la célula conocida como balsa lipídica, donde el núcleo adquiere su cubierta externa. La proteasa codificada por el virus cataliza entonces la escisión del precursor gag-pol para dar lugar al virión maduro (Fauci, y otros, 2009).

Imagen 7
Generación de linfocitos T CD4+ en reposo, con infección latente, en pacientes infectados por el VIH.



Fuente: Anthony Fauci, 2009

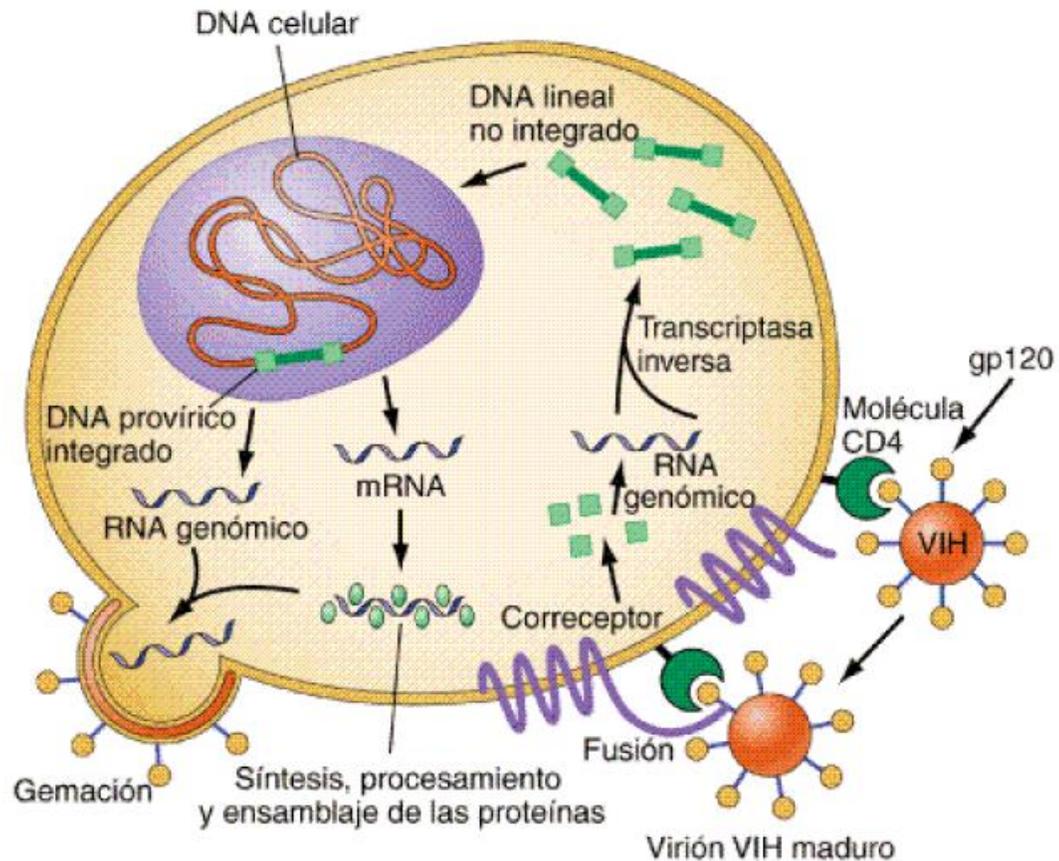
13.2.4.1 Ciclo de Replicación del Virus:

El VIH es un virus RNA cuya característica esencial es la transcripción inversa de su RNA genómico a DNA gracias a la actividad de la enzima transcriptasa inversa. El ciclo vital del VIH comienza con la unión de alta afinidad de la proteína gp120, a través de una porción de su región V1 cerca de la terminal N, a su receptor en la superficie de la célula hospedadora, la molécula CD4. La molécula CD4 es la proteína de 55 kDa que se encuentra de manera predominante en una subpoblación de linfocitos T encargada de la función colaboradora o inductora en el sistema inmunitario. Una vez que la gp120 se fija a la molécula CD4, experimenta un cambio de configuración que facilita su fijación a uno de un grupo de correceptores. El VIH utiliza dos correceptores fundamentales para la fusión y la entrada; estos correceptores también son receptores fundamentales para ciertas citosinas de atracción química denominadas quimiocinas y son moléculas pertenecientes a la familia de receptores de siete dominios transmembranosos acoplados a la proteína G. Los dos correceptores principales para el VIH-1 son CCR5 y CXCR4 (Fauci, y otros, 2009).

La proteasa es un enzima que el VIH necesita para completar su proceso de autocopia de sí mismo (replicación) dando lugar a nuevos virus capaces de infectar otras células (Fauci, y otros, 2009).

En su proceso de replicación el VIH produce cadenas largas de proteínas que necesitan fragmentarse en trozos más pequeños que forman las proteínas y enzimas que ayudan a construir las nuevas copias del virus. En la imagen 5 se puede observar el ciclo de replicación del VIH. La fragmentación de las cadenas más largas es producida por la proteasa y sus inhibidores impiden que la fragmentación tenga lugar con lo que las proteínas que se forman dan lugar a copias defectuosas del VIH que, si bien puede destruir la célula que infectó, ya no pueden infectar más células (Fauci, y otros, 2009).

Imagen 8
Ciclo de Replicación del VIH



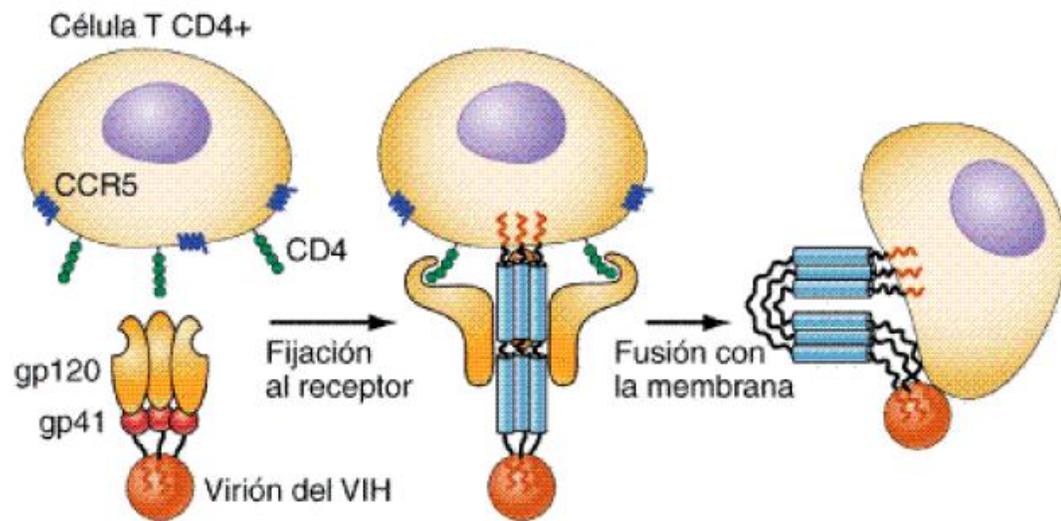
Fuente: Anthony Fauci, 2009

13.2.4.2 Fusión de la Membrana:

Después de la unión a la molécula CD4, ocurre la fusión con la membrana de las células del hospedador a través de una nueva exposición de la molécula gp41, la cual penetra la membrana plasmática de la célula afectada y después se enrolla sobre sí misma para mantener unidos el virión y la célula afectada, en la imagen 6 se puede observar el proceso de fijación y fusión del VIH-1 con su célula blanco. Después de la fusión se libera el complejo de preintegración, compuesto por RNA vírico y las enzimas víricas que rodean la cubierta proteínica de la cápsida en el citoplasma de la célula afectada. Conforme el complejo de preintegración atraviesa

el citoplasma para alcanzar el núcleo, la enzima transcriptasa inversa cataliza la transcripción inversa del RNA genómico en DNA y la cubierta proteínica se abre para liberar el DNA de VIH de doble hebra. Con la activación de la célula, el DNA vírico tiene acceso a los poros nucleares y se exporta del citoplasma al núcleo, donde se integra a los cromosomas de la célula hospedadora por acción de otra enzima vírica codificada, la integrasa. El provirus de VIH (DNA) se integra en forma selectiva al DNA nuclear en forma preferencial en los cinturones en los genes activos y en puntos regionales. El provirus puede permanecer inactivo desde el punto de vista de la transcripción (latente) o bien manifestarse con grados variables de expresión genética, hasta la producción activa del virus (Fauci, y otros, 2009).

Imagen 9
Fijación y fusión del VIH-1 con su célula blanco



El VIH-1 se fija a su célula blanco por medio de la molécula DC4, lo que resulta en un cambio de configuración en la molécula gp120 que le permite fijarse al correceptor CCR5. Acto seguido, el virus se adhiere firmemente a la membrana de la célula hospedadora con una configuración de muelle en espiral por medio de la molécula gp41 recién expuesta. La fusión entre la célula y el virus ocurre conforme el intermediario transicional de gp41 experimenta cambios ulteriores para formar una estructura en horquilla que hace que las dos moléculas se aproximen estrechamente entre sí.

Fuente: Anthony Fauci, 2009

13.2.4.3 Activación Celular y Patogénesis del VIH:

La activación de sistema inmunológico es un componente esencial de cualquier reacción inmunológica a un antígeno extraño. El sistema inmunológico normalmente se encuentra en un estado homeostático, en espera de las perturbaciones producidas por los estímulos antigénicos extraños. Una vez que la reacción inmunológica hace frente a un antígeno y lo ha eliminado, vuelve a su estado relativamente latente. En la infección por el VIH, sin embargo, el sistema inmunitario se encuentra activado de manera crónica a causa de la replicación persistente del virus durante todo el transcurso de la enfermedad que produce. Dicho estado estimulado se ve reflejado por la hiperactivación de las células B que conduce a hipergammaglobulinemia; proliferación espontánea de los linfocitos; activación de los monocitos; expresión de los marcadores de la activación sobre las células T CD4+ y CD8+; hiperplasia de los ganglios linfáticos, de manera particular al principio de la evolución de la enfermedad; aumento de la secreción de citosinas proinflamatorias; concentraciones elevadas de neopterinina; β_2 -microglobulina, interferón lábil a los ácidos y receptores solubles de IL-2; y fenómenos autoinmunitarios. Incluso en ausencia de la infección directa de una célula diana, las proteínas de la cubierta del VIH pueden entrar en interacción con los receptores celulares para descargar poderosas señales de activación que resultan en la movilización del calcio, la fosforilación de ciertas proteínas que participan en la transducción de señales, la colocalización de proteínas citoplásmicas entre las que se encuentran las participantes en el intercambio celular, la disfunción inmunitaria y, bajo ciertas circunstancias, la apoptosis (Fauci, y otros, 2009).

Además de los factores endógenos, entre ellos las citosinas, otros factores exógenos, como diversos microorganismos relacionados con la activación celular incrementada, pueden fomentar la replicación del VIH y, por este motivo, tener efectos de importancia sobre la patogénesis de este virus (Fauci, y otros, 2009).

La activación persistente de la inmunidad puede tener algunas consecuencias nocivas. Desde el punto de vista virológico, las células T CD4+ quiescentes pueden

infectarse por el VIH, pero la transcripción inversa, la integración y la propagación del virus son mucho más intensas y eficientes en las células activadas. Además, la activación celular estimula la expresión de los virus por las células infectadas por el VIH en forma latente. Desde el punto de vista inmunológico, la exposición crónica del sistema inmunitario a un determinado antígeno durante un largo periodo puede, en último término, causar incapacidad para mantener una respuesta inmunitaria suficiente frente a dicho antígeno. La viremia persistente se asocia con “agotamiento funcional” y apoptosis de células T específicas para el virus. Al igual que la mayor parte de trastornos con exposición persistente al antígeno, el hospedador debe mantener una activación suficiente de respuestas específicas contra antígenos pero también puede prevalecer una activación excesiva y un posible daño inmunitario a los tejidos (Fauci, y otros, 2009).

13.2.5 Genoma del VIH:

El VIH-1 dispone de genes que codifican sus proteínas estructurales: *gag* codifica las proteínas que forman el centro del virión; *pol* codifica las enzimas encargadas de la transcripción inversa de la integración y *env* codifica las glucoproteínas de la cubierta. El primero codifica las proteínas del *core* (matriz, cápside y nucleocápside), el segundo expresa diversas enzimas involucradas en la síntesis e integración del ADN provírico y el tercero codifica las proteínas víricas de envoltura externa (Fauci, y otros, 2009).

Los extremos genómicos del provirus están flanqueados por unas secuencias conocidas como repeticiones terminales largas (LTR, *long terminal repeats*), que participan en la integración del genoma vírico en la célula infectada, así como en la iniciación y regulación de la transcripción (Fauci, y otros, 2009).

13.2.5.1 Gen gag:

Este gen codifica inicialmente una proteína precursora de 55 kD denominada p55. Durante la traducción, el extremo aminoterminal de esta proteína es miristilado, lo que desencadenará una asociación con la membrana de la célula infectada. Durante el proceso de la maduración vírica, esta proteína temprana p55 es escindida, por

una proteasa codificada por el gen *pol*, en cuatro proteínas más pequeñas: la p17 (de la matriz), la p24 (de la cápside) y las proteínas de la nucleocápside p7 y p6 (Rodríguez & Farias, 2013).

La mayoría de las moléculas p17 interaccionan con la cara interna de la bicapa lipídica del virión y estabilizan la partícula. Sin embargo, un subconjunto de moléculas p17 se introduce en las capas más profundas del virión, donde se convierten en parte del complejo que acompaña el ADN vírico hasta el núcleo. Estas moléculas facilitan el transporte nuclear del genoma vírico. Este fenómeno permite que el VIH infecte las células que no están en división, una característica inusual para un retrovirus (Rodríguez & Farias, 2013).

La proteína p24 de la cápside forma el núcleo cónico de las partículas víricas. La ciclofilina A, interacciona con la p24, produciéndose la incorporación de la ciclofilina A en la partícula vírica. La posterior interacción entre el *gag* y la ciclofilina A parece esencial en el desensamblaje de la cápside, ya que la ausencia de esta interacción inhibe la replicación vírica (Rodríguez & Farias, 2013).

La proteína p7 de la nucleocápside es responsable del reconocimiento de la señal de empaquetamiento del VIH. También parece facilitar la transcripción inversa.

El polipéptido p6 media las interacciones entre la proteína precursora Gag p55 y la proteína accesoria Vpr, y conduce la incorporación de la Vpr al interior de los viriones (Rodríguez & Farias, 2013).

13.2.5.2 Gen *pol*: precursor *gag-pol*:

La proteasa, la transcriptasa inversa, la RNasa H y la integrasa son proteínas víricas que se expresan a través de una proteína de fusión Gag-Pol denominada p160. Este precursor Gag-Pol se genera por un cambio de lectura ribosomal, provocado por un motivo específico del ARN. Durante la maduración, una proteasa vírica escinde el polipéptido Pol de Gag y posteriormente lo digiere, separándose la proteasa (p10), la transcriptasa inversa (p50), la RNasa H (p15) y la integrasa (p31) (Rodríguez & Farias, 2013).

- Proteasa (p10): es una aspartilproteasa que actúa como un dímero. Su actividad se requiere para la escisión de los precursores poliproteicos *gag* y *gag-pol* durante la maduración vírica.
- Transcriptasa inversa (p50) y RNasa H (p15): la forma funcional predominante de la polimerasa vírica es un heterodímero de p65 y p50. Durante el proceso de la transcripción inversa característico de los retrovirus, la polimerasa hace una copia de ADN a partir del dímero de ARN monocatenario presente en el virión. A continuación, la ribonucleasa H elimina el molde original de ARN del primer filamento de ADN, con lo que se permite la síntesis del filamento complementario de ADN. El ADN bicatenario vírico puede ser completamente sintetizado en un plazo de seis horas después de la entrada vírica, aunque puede permanecer sin integrarse durante períodos prolongados.
- Integrasa (p31): una vez sintetizado el ADN provírico, se acopla a una serie de factores celulares y víricos, formando el *complejo de preintegración*, que es transportado al núcleo, donde tiene lugar la inserción del ADN vírico en el ADN cromosómico de la célula infectada.

13.2.5.3 Gen env:

La proteína precursora de envoltura, Env, de 160 kD (gp160) se expresa a partir del ARNm maduro o tardío. Inicialmente es sintetizada en el retículo endoplásmico y, posteriormente, migra al aparato de Golgi, donde es glucosilada mediante la adición de 25 a 30 cadenas laterales de carbohidratos que son agregados a residuos de asparagina en el extremo *N*-terminal. Posteriormente, una proteasa celular escinde la gp160 en dos subunidades, la proteína superficial (gp120) y la proteína transmembrana (gp41), que permanecen asociadas entre sí de manera no covalente y que oligomerizan, generalmente en trímeros, en la superficie del virión (Rodríguez & Farias, 2013).

La interacción entre el VIH-1 y su receptor celular CD4 está mediada a través de dominios específicos en la proteína superficial gp120 (gp125 en VIH-2).

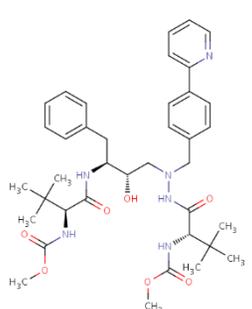
Estructuralmente, la gp120 presenta nueve enlaces disulfuro intracatenarios altamente conservados y cinco regiones hipervariables (denominadas V1-V5). La secuencia V3 interacciona con los correceptores celulares CXCR4 y CCR5, que pertenecen a la familia de los receptores de quimiocinas y determinan parcialmente la sensibilidad celular de las cepas víricas. El segmento gp120 tiene capacidad para interactuar con una lectina denominada DC-SIGN que se expresa en la superficie de las células dendríticas de las mucosas. Esta interacción facilita la posterior transmisión del VIH a los tejidos linfoides, a la vez que favorece enormemente la propagación vírica, ya que la transmisión del VIH a los linfocitos CD4 tiene una eficacia muy superior a la capacidad infectiva de las partículas víricas no unidas a estas lectinas (Rodríguez & Farias, 2013).

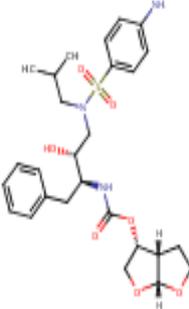
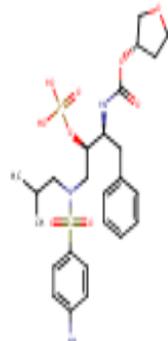
Una vez que la proteína vírica gp120 ha interactuado con su receptor celular CD4, el segmento gp41 del VIH-1 (gp36 en VIH-2), a través de un dominio fusogénico *N*-terminal, media la fusión de las membranas víricas y celular, lo cual permite la internalización de los componentes del virión en el citoplasma de la célula recién infectada (Rodríguez & Farias, 2013).

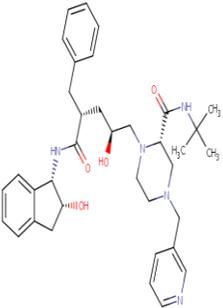
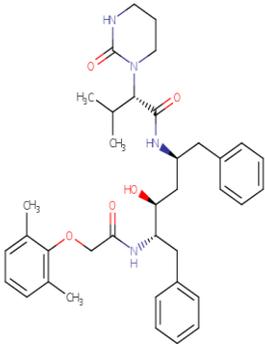
13.3 Antiretrovirales que Inhiben a la VIH Proteasa:

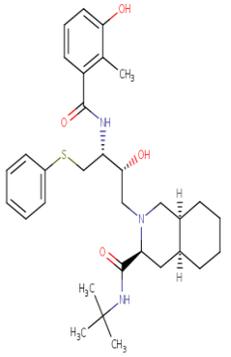
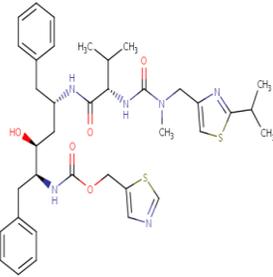
Los inhibidores de la VIH proteasa son activos contra los dos tipos de VIH (VIH-1 y VIH-2). Para que cumplan con su función no requieren ningún tipo de activación intracelular. Estos medicamentos impiden el procesamiento de proteínas víricas hacia conformaciones funcionales, dando como resultado la producción de partículas víricas que son inmaduras y no infectantes en la Tabla 3 se puede observar un listado de antiretrovirales que inhiben a la VIH proteasa y sus características.

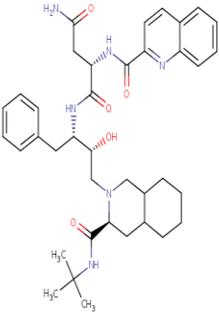
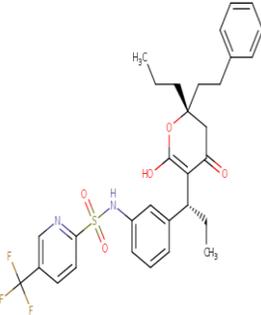
Tabla 18
Antiretrovirales que Inhiben a la VIH proteasa.

FÁRMACO/ NOMBRE COMER- CIAL	DOSIS RECOMEN- DADA	RECOMENDA- CIONES	EFEKTOS ADVERSOS	COMENTA- RIOS	FABRICANTES / COSTOS	ESTRUCTURA
Atazanavir/ Reyataz Vida media plasmática: 6-7 hrs, con ritonavir 11 hrs. Vía de eliminación: Biliar	400 mg diarios o 300 mg diarios más ritonavir 100 mg diarios. Ajuste la dosis en presencia de insuficiencia hepática	Tómese con alimentos. Separar su dosificación de antibióticos por 1 hora y de cimetidina y antiácidos por 12 horas.	Náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal, cefalea, neuropatía periférica, exantema, hiperbilirrubinemia indirecta.	Evítese indinavir, irinotecán y omeprazol. Penetra líquido cefalorraquídeo o y líquido seminal	<ul style="list-style-type: none"> • Bristol Myers Squibb Co/ • 300 mg cápsula, 36.63 USD • 150 mg cápsula, 18.49 USD • 200 mg capsula, 18.49 USD • 100 mg capsula, 18.12 USD 	
Darunavir/ Prezista Vida media: 15 horas Vía de eliminación:	600 mg cada 12 horas más ritonavir, 100 mg cada 12 hr	Tómese con alimentos	Diarrea, cefalea, náusea, exantema, hiperlipidemia/eleva enzimas hepáticas,	Evítese en pacientes con alergia a las sulfas.	<ul style="list-style-type: none"> • Tibotec Inc • Centocor Ortho Biotech, Inc/ • 600 mg tableta, 	

FÁRMACO/ NOMBRE COMER- CIAL	DOSIS RECOMEN- DADA	RECOMENDA- CIONES	EFECTOS ADVERSOS	COMENTA- RIOS	FABRICANTES / COSTOS	ESTRUCTURA
Biliar			eleva amilasa sérica		25.75 USD • 400 mg tableta, 18.74 USD • 300 mg tableta 16.2 USD • 150 mg tableta, 4.59 USD • 75 mg tableta, 2.3 USD	
Fosamprenavir/ Lexiva Profármaco del amprenavir que se absorbe rápidamente en el tubo digestivo. Vida media plasmática: 7-11 h Vía de eliminación: Biliar	1400 mg cada 12 h o 700 mg cada 12 h más ritonavir, 100 mg cada 12 h, o 1400 mg al día más ritonavir, 100 a 200 mg al día.	Evitar comidas ricas en grasas, disminuyen su absorción. Separar las tomas de antiácidos por 12 h.	Diarrea, náusea, vómito, hipertrigliceridemia, exantema, cefalea, parestesias peribucales, aumenta enzimas hepáticas.	No se administre con lopinavir/ritonavir o en presencia de insuficiencia hepática. También evitar cimetidina, disulfiram, metronidazol, vitamina E.	• Viiv Healthcare Co/ • 700 mg tableta, 14.78 USD	

FÁRMACO/ NOMBRE COMER- CIAL	DOSIS RECOMEN- DADA	RECOMENDA- CIONES	EFECTOS ADVERSOS	COMENTA- RIOS	FABRICANTES / COSTOS	ESTRUCTURA
Indinavir/ Crixivan Vida media sérica: 1.5 a 2 h Vía de eliminación: fecal	800 mg cada 8 h u 800 mg cada 12 h, más ritonavir, 100 mg cada 12 h.	Administrarlo con el estómago vacío. Tomar al menos 1500 mL de líquidos al día.	Nefrolitiasis, náusea, hiperbilirubi-nemia indirecta, cefalea, astenia, visión borrosa.	Evítese tomar efavirenz. Ajustar dosis en presencia de insuficiencia hepática.	<ul style="list-style-type: none"> • Merck Sharp and Dohme Corp/ • 360, cápsulas, 200 mg cápsula Botella 570.02 USD • 400 mg cápsula, 2.86 USD c/u • 333 mg cápsula, 2.54 USD c/u • 200 mg cápsula, 1.52 USD c/u • 100 mg cápsula, 0.76 USD c/u 	
Lopinavir/ Kaletra Lopinavir+ Ritonavir/ Kaletra Vida media: 5-6 h	400 mg/100 mg cada 12 h u 800 mg/200 mg diarios.	Tómese con alimento.	Diarrea, dolor abdominal, náusea, hipertrigliceri- demia, cefalea, aumento enzimas hepáticas.	Ajustar dosis en insuficiencia hepática. Evítese fosanprenavir, disulfiram y metronidazol.	<ul style="list-style-type: none"> • Abbott Laboratories 	

FÁRMACO/ NOMBRE COMER- CIAL	DOSIS RECOMEN- DADA	RECOMENDA- CIONES	EFECTOS ADVERSOS	COMENTA- RIOS	FABRICANTES / COSTOS	ESTRUCTURA
Nelfinavir/ Viracept Vida media: 3.5 – 5 h Vía de eliminación: heces	750 mg cada 8 h o 1250 mg cada 12 h.	Tomar con alimentos	Diarrea, náusea, flatulencia.	Favorable para embarazadas	• Agouron pharmaceutic als Inc	 <p>The image shows the chemical structure of Nelfinavir, a protease inhibitor. It features a central piperidine ring system with various substituents, including a hydroxyl group, a methyl group, and a complex side chain containing a thioether and a hydroxyl group.</p>
Ritonavir/ Norvir Vida media: 3- 5 horas Vía de eliminación: heces.	600 mg cada 12 h	Tomar con alimentos. Aumentar la dosis a partir de 300 mg cada 12 h durante una o dos semanas para mejorar la tolerancia.	Náusea, diarrea, parestesias, hepatitis		<ul style="list-style-type: none"> • Abbott Laboratories Pharmaceutic al Products Div • Abbott Laboratories/ 100 mg cápsula gelatina suave 10.29 USD • 100 mg tableta, 10.29 USD 	 <p>The image shows the chemical structure of Ritonavir, a protease inhibitor. It features a complex polycyclic core with multiple amide and ester linkages, and several methyl and phenyl substituents.</p>

FÁRMACO/ NOMBRE COMER- CIAL	DOSIS RECOMEN- DADA	RECOMENDA- CIONES	EFEKTOS ADVERSOS	COMENTA- RIOS	FABRICANTES / COSTOS	ESTRUCTURA
Saquinavir/ Invirase, Fortovase Vía de eliminación: heces.	600 mg cada 8 h o 1000 mg cada 12 h, más ritonavir, 100 mg cada 12 h.	Tomar en las 2 horas siguientes a una comida completa.	Náusea, diarrea, rinitis, dolor abdominal, dispepsia, exantema	Evítese en la insuficiencia hepática grave. Usar filtro solares por aumento de la fotosensibilida d.	<ul style="list-style-type: none"> • Hoffmann La Roche Inc/ • 500 mg tableta, 8.72 USD • 200 mg cápsula, 3.87 USD 	
Tipranavir/ Aptivus Vida media: 5- 6 horas.	Tomarse con ritonavir para alcanzar concentraciones eficaces: 500mg cada 12 h/ ritonavir 200 mg cada 12 h.	Tomar con alimentos.	Diarrea, náusea, vómito, dolor abdominal, exantema, aumento enzimas hepáticas, hipercolesterolemia , hipertrigliceri- demia.	Evitar usarlo en presencia de insuficiencia hepática. Para uso pediátrico. Evitar antiácidos. Evitar en pacientes con alergia a las sulfas Evitar en pacientes con riesgo de hemorragia.	<ul style="list-style-type: none"> • Boehringer Ingelheim Pharmaceutics Inc/ • Botella, 120 cápsulas, 250 mg c/cápsula 1271.8 USD • 250 mg cápsula, 10.19 USD • 100 mg/ml solución, 4.29 USD 	

Fuente: (Katzung, 2010) (Craig Knox, 2011)

13.4 Rol de Los Productos Naturales en el Descubrimiento de Nuevos Medicamentos:

El descubrimiento de nuevos fármacos es un proceso complejo, generalmente caro e interdisciplinario que incluye ciencias como la química, farmacología y ciencias clínicas. Durante muchos años los productos naturales han sido los protagonistas del descubrimiento de nuevos fármacos líderes, ya que estos han sido los responsables de brindar muchas moléculas que hoy en día son parte de los medicamentos de mayor uso. También han sido los encargados de brindarles a las compañías farmacéuticas mucho del alcance que tienen hoy en día. Sin embargo, en la actualidad eso ha cambiado considerablemente debido al uso de técnicas modernas, las cuales crean derivados sintéticos de moléculas ya existentes. De esta forma los costos en el proceso del descubrimiento de fármacos ha ido disminuyendo y este ha sido un factor muy importante para las compañías farmacéuticas. Entre algunas de las técnicas que se utilizan actualmente se pueden mencionar el mecanismo basado en bioensayos guiados por fraccionamiento y otras como el HTS (Butler, 2004).

El tamizaje de alto rendimiento o HTS por sus siglas en inglés (High-Throughput Screening) es una de estas técnicas que se basa en el tamizaje de bibliotecas enteras de compuestos sintéticos. Estos, al no ocupar el mismo espacio químico que los productos naturales, no llevan a compuestos líderes para la elaboración de nuevos fármacos, esto debido a que los productos naturales ya exhiben generalmente alguna actividad, con esto se confirma que el espacio químico que describen es más afín al espacio químico descrito por las enzimas en el organismo, mientras que los sintéticos no lo hacen. Esto último sugiere que los productos naturales deben introducirse al desarrollo de fármacos por tamizaje y que esto puede llevar a mejores resultados (Butler, 2004).

A pesar de que las anteriores técnicas son bastante innovadoras y ayudan en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos, los productos naturales siguen siendo fuente de una cantidad considerable de moléculas candidatas para el

desarrollo de compuestos líderes debido a que las técnicas alternativas han fallado en ofrecer estos últimos en áreas terapéuticas claves (Butler, 2004).

Los productos naturales representan una gran cantidad de oportunidades para el descubrimiento de nuevas moléculas y del estudio de antiguas moléculas que no han sido sometidas al proceso de tamizaje de alto rendimiento. Sin embargo, la química de productos naturales enfrenta todavía algunos desafíos. Se podría pensar que un paso limitante al someter los productos naturales a HTS sería la cantidad de productos y extractos que existen; esto, por el contrario, es una gran ventaja. Lo que se debe de tomar en cuenta realmente, son los costos de los materiales a utilizarse, el tiempo requerido y los recursos humanos. La decisión en cuanto si utilizar productos naturales o una biblioteca de compuestos sintéticos al momento de realizar un screening es muy importante para el desarrollo de nuevos fármacos. Existen tres caminos posibles al momento de tomar esta decisión:

- El primero es realizar los bioensayos y pruebas clínicas de productos naturales mientras se realiza el screening de los compuestos de una biblioteca de compuestos sintéticos. Este es el más recomendado porque ahorra tiempo y toma en cuenta tanto productos naturales como sintéticos.
- La segunda opción es primero realizar el screening de los compuestos de una biblioteca de compuestos sintéticos y luego realizar las pruebas y ensayos clínicos de los productos naturales, solo si ninguna de las moléculas de la biblioteca de compuestos sintéticos funciona. Esto no se recomienda porque puede causar sesgo en la investigación; al no tomar en cuenta los productos naturales sino hasta que no den resultados satisfactorios los compuestos sintéticos.
- La última ruta es únicamente realizar screening de una biblioteca de compuestos sintéticos y no tomar en cuenta los productos naturales para nada. Esta es la menos recomendada, puesto que no se permite la introducción de moléculas nuevas en el proceso del diseño de nuevos fármacos.

Otra dificultad, que es considerada la mayor de todas en el desarrollo de los compuestos, es el reabastecimiento continuo de grandes cantidades de moléculas de productos naturales que se requieren para su evaluación biológica. Es necesario, para mantener la competitividad en el screening de productos naturales, realizar procesos de mejora continua. Entre los aspectos a considerar se incluyen velocidad de replicación, aislamiento de moléculas, elucidación de estructuras, y la selección de los receptores (Butler, 2004).

13.5 Tamizaje Molecular Virtual:

El diseño de nuevos fármacos puede ser un proceso de muchos años y con un costo de varios millones de dólares. A través de los años el proceso se ido volviendo menos complejo y más sujeto a la estadística. Comenzando con la química combinatoria y llegando al tamizaje molecular de alto rendimiento se ha logrado muchos avances a precios más bajos. Sin embargo, estas técnicas no han sido tan fructíferas como habían prometido produciendo fármacos que fallan principalmente en propiedades farmacocinéticas (ADME/Tox) (Song, Lim, & Tong, 2009).

A raíz de esto se comenzó el desarrollo de fármacos a través de herramientas que pudieran predecir las propiedades ADME/Tox. Principalmente se utilizó el diseño de fármacos asistido por computadora (o CADD por sus siglas en inglés). Este método comenzó en los años 70 para convertirse en toda una rama de la química medicinal actual (Song, Lim, & Tong, 2009).

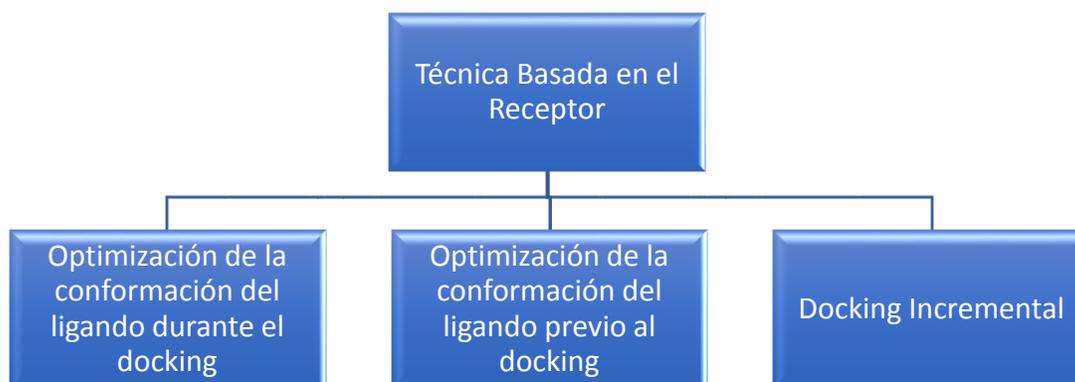
En contraste con el tamizaje de bibliotecas moleculares generadas en base a química combinatoria, el tamizaje molecular virtual, o VS por sus siglas en inglés (Virtual Screening), utiliza bases de datos virtuales de las que hace pruebas de varias maneras para determinar la actividad y efectividad de un fármaco sobre un receptor biológico. Muchas de estas bases de datos, lejos de ser costosas, pueden ser adquiridas gratis. También se cuenta con bases de datos de los receptores biológicos. Fuera de la información, la manera de proceder para seleccionar al candidato líder puede ser de dos formas diferentes: la técnica basada en el receptor y la técnica basada en el ligando como se puede ver en el Esquema 1 (Song, Lim, & Tong, 2009).

Esquema 1 Técnicas para seleccionar al Candidato Líder



La técnica basada en el receptor (observar el Esquema 2) involucra un docking de los ligandos en el receptor para evaluar la actividad y efectividad. Para ello se busca primero la geometría y la región del sitio activo. Posteriormente se busca colocar el ligando en el sitio activo. Finalmente se evalúa qué tan bien se adhiere el ligando al receptor comparado con otros ligandos. Cada uno de estos pasos requiere modelos, algoritmos y técnicas especiales a modo de afinar el cálculo y realizar predicciones cercanas a la realidad (Srinivas, Priyadarshini, Praveen, Pradeep, & Narahari, 2007).

Esquema 2 Técnica Basada en el Receptor

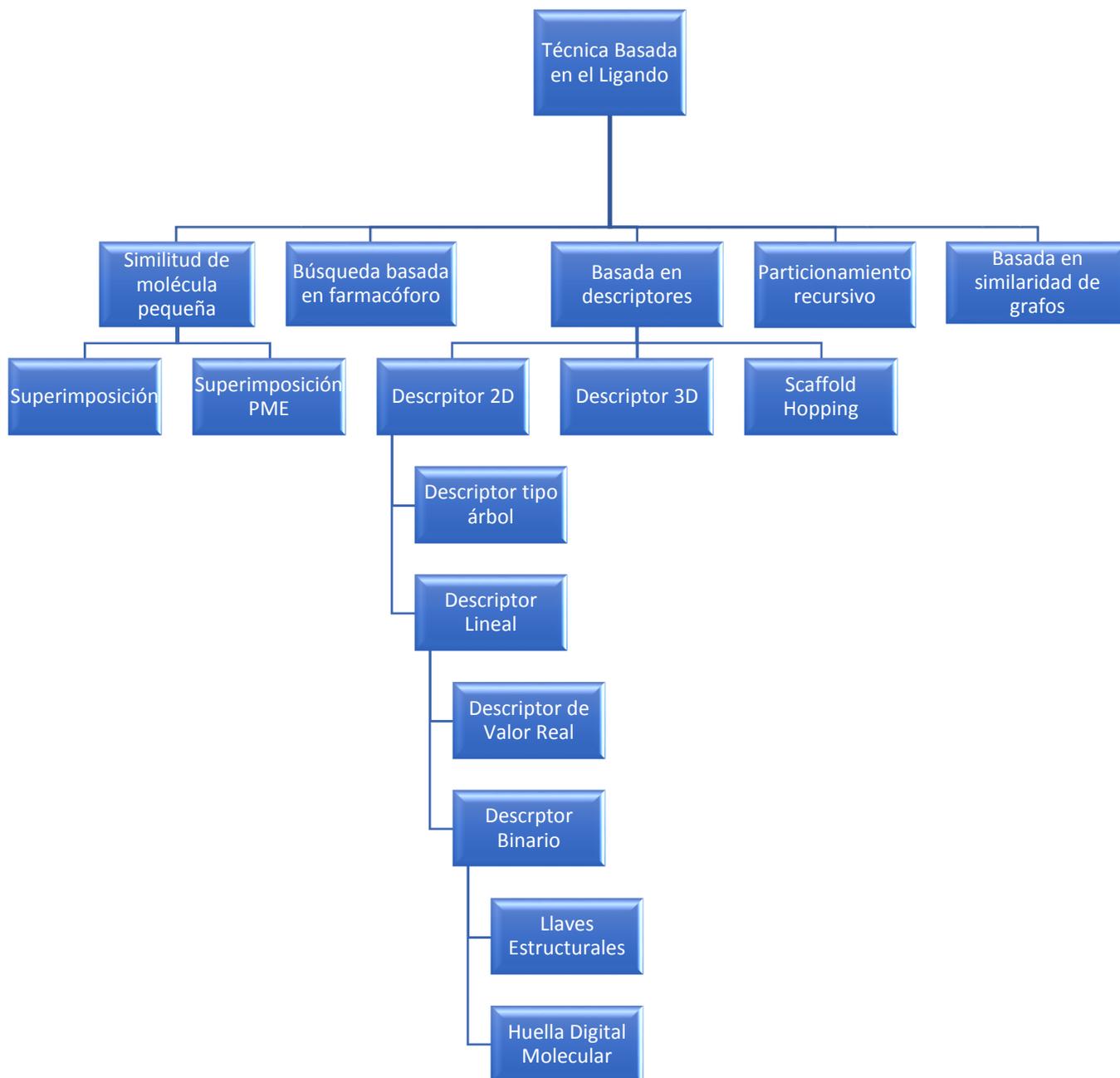


La técnica basada en el ligando encuentra su centro en el Principio de Similitud de Propiedades (ver esquema 3). Esto, en otras palabras, significa que las moléculas similares deben de tener propiedades y características similares. Para estas evaluaciones se utilizan redes neurales artificiales, árboles de decisiones,

particionamiento recursivo y máquinas de soporte vectorial. Sin embargo, a pesar de que en la práctica puede parecer una técnica muy buena, esta no se puede generalizar porque depende mucho de datos experimentales (Srinivas, Priyadarshini, Praveen, Pradeep, & Narahari, 2007).

Finalmente, y como paso importante, todo estudio computacional de un nuevo medicamento debe tener una parte en que se estudie su farmacocinética (i.e. sus propiedades de ADME/Tox). Para esto se busca que cada compuesto cumpla con las 5 reglas de Lipinski u otras reglas más refinadas. La mayoría de las propiedades descritas en las reglas de Lipinski se pueden determinar de manera sencilla por medios computacionales, sin embargo existen otras como el coeficiente de partición $\log P$ para el cual se han desarrollado varios algoritmos (Srinivas, Priyadarshini, Praveen, Pradeep, & Narahari, 2007).

Esquema 3 Técnica Basada en el Ligando



13.6 Diseño de Novo:

Para el desarrollo de nuevos fármacos se ha implementado el método diseño *de novo*. Este método consiste en el desarrollo de nuevas estructuras moleculares con las propiedades farmacológicas deseadas. Para utilizar el diseño *de novo*, es importante tener en cuenta 3 factores a evaluar: el ensamble del candidato, el muestreo efectivo del espacio químico y la evaluación de su potencial calidad. Para ello se deben tomar en cuenta también las restricciones primarias³ que se utilizan para el ensamble del candidato y el muestreo del espacio químico, y las restricciones secundarias⁴ que se utilizan para evaluar la calidad. Por último se subdivide la búsqueda en dos maneras: basado en el receptor y basado en el ligando. Esta última no se utiliza más que en casos especiales (Schneider & Fechner, 2005).

Si se utiliza una estrategia de ensamble basada en el receptor, se busca en general lugares a los que se pueda enlazar un ligando a un sitio particular del receptor, algunos de los tipos de uniones que existen entre una estructura y un ligando se puede observar en la Imagen 10. Algunos programas buscan sitios aceptores o donadores de puentes de hidrogeno, sitios lipofílicos, sitios de interacción con enlaces covalentes o enlaces a iones metálicos. Esto se hace analizando primero los sitios de interacción del receptor de varias maneras (Schneider & Fechner, 2005).

Posteriormente se muestrea el espacio químico. Es aquí donde comienza el ensamble de las nuevas moléculas. Se puede utilizar dos materiales para la construcción: átomos o fragmentos. El primero es superior debido a la variedad estructural obtenida, pero el segundo garantiza no solo un espacio de búsqueda menor, sino una mayor facilidad de síntesis. El método para ensamble puede

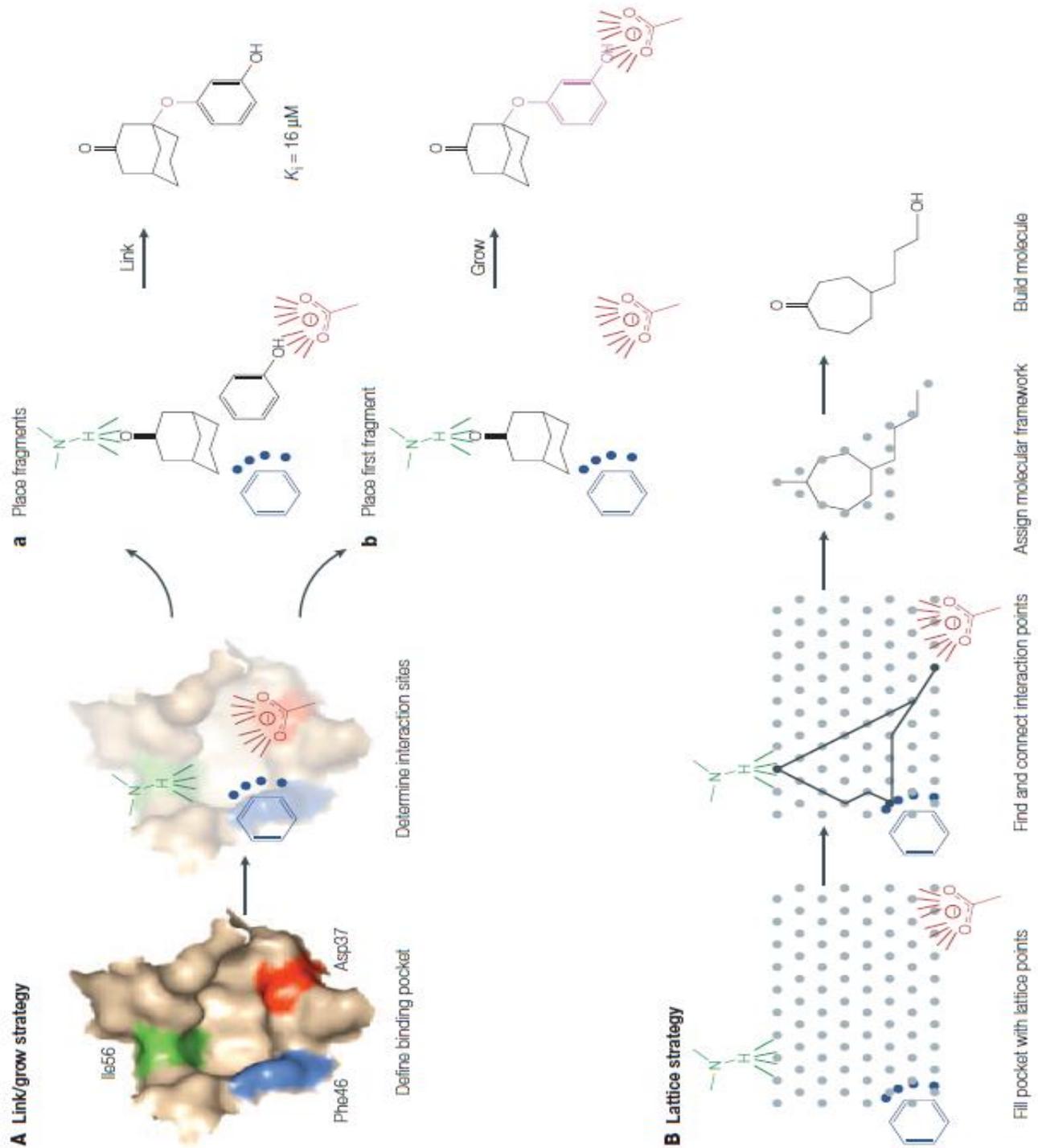
³ Toda la información relacionada a la interacción entre el ligando y el receptor. Es decir, la afinidad del ligando por la molécula biológica objetivo.

⁴ Toda la información relacionada con la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de la molécula diseñada (ADME/T). Para esto se puede utilizar las 5 reglas de Lipinski, también es necesario tomar en cuenta la accesibilidad sintética.

ser: por crecimiento, por vinculación, por redes, por mutaciones aleatorias de estructura, por dinámica molecular, etc. (Schneider & Fechner, 2005).

- En el caso de crecimiento, se coloca un fragmento de molécula dentro del receptor y se le comienza a añadir partes, a modo de ramas, para así crecer y enlazarse a los demás sitios de enlace del receptor.
- En el caso de vinculación, se colocan fragmentos en todos los sitios de interés y luego se intentan construir estructuras, a manera de puentes, entre estos.
- En el caso de las redes se colocan fragmentos en los sitios de interés y se busca una molécula con la forma de la red que vincula a esos fragmentos dentro del receptor.
- En el caso de mutaciones aleatorias, se trata de un algoritmo genético. Se agregan algunos fragmentos a una molécula base y se evalúa su afinidad. Luego, se extrae lo mejor de estos y se crea otra molécula. Este proceso se repite hasta cierto número de pasos o hasta adquirir la afinidad deseada.
- Finalmente, en el caso de dinámica molecular, se realizan ciclos en los que se colocan fragmentos aleatoriamente dentro del receptor y se simula el movimiento libre de estos. Posteriormente se aprueban o rechazan y finalmente se van vinculando.

Imagen 10 Tipos de Uniones entre Estructura y Ligando



Fuente: Gisbert Schneider, 2005

Por último se evalúa su potencial calidad. Para ello, el programa aproxima la energía de enlace de cada molécula generada con el receptor. Existen 3 métodos de evaluar la energía:

- Por campos de fuerza: Evalúa, por medio de la física clásica, la energía del enlace.
- Funciones de evaluación empíricas: Evalúan cada interacción receptor-ligando ponderando cada una con una función de peso y añadiendo términos de penalización.
- Funciones basadas en conocimiento previo: Se basan en un análisis estadístico de las interacciones de las estructuras acomplejadas ligando-receptor. Si la interacción es frecuente se prefiere, de lo contrario no. Como el método se basa en información estructural y no en las interacciones ya conocidas, el análisis estadístico ha probado ser mejor que el empírico (Schneider & Fechner, 2005).

En algunos casos en los que no se puede contar con una estructura confiable del receptor, se utiliza una estrategia basada en el ligando. Para esto se utilizan modelos de ligandos que ya existen para ese receptor y se construye un modelo de ligando farmacóforo⁵. A partir de este modelo ya es posible obtener un pseudo-receptor (Schneider & Fechner, 2005).

Para buscar a los nuevos ligandos se representa la búsqueda como un grafo en el que cada nodo es una estructura diferente del ligando. Los nodos raíz son la estructura de la que se parte y los nodos terminales son los estados finales de las moléculas. Todos los demás son estados intermedios. Las estrategias más utilizadas para estos ligandos son: aleatoria, a lo ancho, a lo profundo, Monte Carlo con criterio Metrópolis y algoritmo evolutivo (Schneider & Fechner, 2005).

⁵ Es el ensamble de contribuciones electrónicas y estéricas necesarias para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con la estructura de un receptor biológico específico para desencadenar su respuesta biológica.

- En el caso de estrategia aleatoria se puede considerar que se cubren todas las posibilidades de estructura posibles si la búsqueda se hace en un tiempo muy grande.
- En la búsqueda a lo ancho se conservan cada uno de los nodos generados y se analiza los derivados de cada uno, pero es muy costoso a nivel de cómputo.
- En la estrategia de buscar a profundidad el programa se enfoca solo en uno de los nodos y parte de allí para seguir generando estructuras nuevas de ligando hasta hallar una satisfactoria.
- El método Monte Carlo es esencialmente aleatorio, sin embargo, el criterio Metrópolis implica que cada nodo es evaluado según un criterio (restricciones primarias) y es aceptado o rechazado dependiendo de si satisface o no ese criterio.
- El algoritmo evolutivo aprovecha los principios de reproducción, mutación y recombinación para el desarrollo de nuevos ligandos. Este toma a dos estructuras, escogidas por la función de evaluación, y las elige como padres. Luego las combina de maneras aleatorias para generar una población de descendientes. De esta se vuelven a escoger dos padres y estos vuelven a combinar. Las mutaciones y recombinaciones son solo fragmentos o estructuras favorables que se introducen directamente dentro del proceso evolutivo.

Algunos aspectos claves a considerar en el diseño *de novo* es la deficiencia del programa de considerar la flexibilidad de la proteína. También están las limitaciones en las bibliotecas para la generación de nuevas estructuras, ya que se necesitan bibliotecas de compuestos sintéticos utilizadas para tamizaje molecular de alto rendimiento. Por esta razón, la mejor elección de una molécula puede no ser realizada por el programa, sino por el operario del programa. Los mejores candidatos siguen siendo aquellos que se elija por experiencia y sentido común (Schneider & Fechner, 2005).

13.7 Docking:

Determina la interacción de energía entre dos moléculas: un ligando y un receptor. Para esto encuentra la orientación de un ligando que se une a un sitio activo específico de una proteína, con lo cual se forma un complejo con una energía mínima. Al ya estar unidos se calcula la energía de interacción y se analiza gracias a una función de evaluación conocida como “función de evaluación” (o “scoring function”). Esta función calcula la energía de interacción entre el ligando y el receptor para obtener un valor numérico y poder así hallar la conformación más estable del ligando (Srinivas, Priyadarshini, Praveen, Pradeep, & Narahari, 2007).

El docking se divide en dos partes:

- Métodos de búsqueda: En esta sección los algoritmos que se utilizan son los encargados de determinar todas las conformaciones óptimas posibles para un complejo determinado, es decir la posición y la orientación de ambas moléculas. Se pueden dividir en tres:
 - Búsqueda del espacio conformacional durante del docking: se realiza la optimización de pequeñas conformaciones y se busca la orientación en el sitio activo del receptor. Se utilizan diferentes algoritmos como el método Monte Carlo y el algoritmo genético.
 - Método Monte Carlo (MC): Este método utiliza una técnica de muestreo en la cual se busca formar conformaciones con la menor energía. Se utiliza la probabilidad de Boltzmann para que cada conformación creada al azar por este método sea aceptada o rechazada.
 - Algoritmo genético (AG): esta técnica se basa en las ideas de la evolución por selección natural y genética. Simula los procesos en el sistema natural para la evolución que fueron establecidos por Darwin o por Lamarck. Representan una ruta inteligente de una búsqueda aleatoria en un espacio definido para resolver el problema conformacional.

- **Búsqueda del espacio conformacional antes del docking:** Separan la búsqueda conformacional de la pequeña molécula de su sitio de unión en el receptor. Luego se realiza un análisis conformacional y todas las conformaciones que se obtienen con baja energía son colocadas fijas en el sitio de unión, en donde se consideran únicamente 6 grados de libertad de rotación y traslación restantes. Los programas Slide y Fred utilizan esta metodología.
- **Búsqueda progresiva:** Se rompen los ligandos y se crean fragmentos que son acoplados fijamente a varias posiciones favorables en el sitio de unión empezando con un fragmento base. Generalmente se seleccionan las secciones más grandes para unirlos al receptor, se mantiene un set con posibles orientaciones para estos fragmentos y se le agregan otros fragmentos en diferentes orientaciones y son ponderados. Este proceso se repite hasta que se ensamble todo el ligando.
- **Función de Evaluación:** Es el modelo matemático que se utiliza para predecir la fuerza de las interacciones intramoleculares, e intermoleculares (en este caso, las dos que han sido acopladas). A esto se le conoce como afinidad de unión o energía de acomplejamiento (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004).

Se pueden clasificar como:

- Basadas en campos de fuerza
- Empíricas
- Basadas en conocimiento
- Evaluación por consenso

13.7.1 Pasos para el Docking

- **Construir el receptor:** se modifica el receptor quitándole las moléculas que interfieran con la estructura principal, se estabilizan cargas, se completan los residuos faltantes, etc. Tiene que ser biológicamente activo.

- Identificar el sitio activo: identificar el sitio activo de interés ya que muchas veces pueden existir varios sitios activos.
- Preparación del ligando: Se pueden obtener de varias bases de datos. Para escoger el ligando a utilizar es importante aplicar las Reglas de Lipinski, ya que son importantes para el desarrollo de nuevos fármacos, especialmente para moléculas de administración oral, sin vehículo.
- Docking: el ligando es acoplado al receptor, las funciones de evaluación ponderan cada conformación y después de obtener varias, se ordenan las conformaciones dependiendo de su energía buscando al final la más baja de todas (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004).

13.7.2 Comparación entre AutoDock 4 y AutoDock Vina:

Dos de los programas de licencia libre que se utilizan para realizar tamizaje molecular virtual son AutoDock Vina (Vina) y AutoDock 4 (AD4), en la Tabla 4 se puede observar un cuadro comparativo entre AutoDock Vina y Autodock 4. Estos dos programas comparten varias similitudes en su modo de operación pero a la vez tienen diferencias claves las cuales hacen que se prefiera a uno sobre el otro. Estas diferencias radican sobre todo en la función de búsqueda y en la función de ponderación (Chang, Ayeni, Breuer, & Torbett, 2010).

Un estudio realizado por Max Chang, et. al., en el Instituto de Investigación Scripps, La Jolla, California y la Universidad de California Merced, California, Estados Unidos, evaluaron el desempeño de los programas mencionados anteriormente. Para ello se utilizaron estos dos últimos y dos bibliotecas virtuales (Diversity Set II del National Cancer Institute y Directory of Universal Decoys) con diferentes tipos de moléculas. El estudio consistió en el acoplamiento de las moléculas de cada biblioteca con la VIH proteasa. Esta última se escogió, debido a que ha sido estudiada ampliamente para el desarrollo y descubrimiento de nuevos medicamentos antirretrovirales (Chang, Ayeni, Breuer, & Torbett, 2010).

Vina mostró un desempeño mucho mejor al momento de obtener las energías de enlace y al utilizar moléculas de gran tamaño. AD4 logró obtener las energías de

enlace de moléculas y fallo al encontrar la energía de moléculas de mayor tamaño. La diferencia se manifestó entonces en el algoritmo de búsqueda. Ambos programas aplican una búsqueda híbrida tanto global como local, pero la diferencia clave apareció en la optimización local. El método de búsqueda local de AD4 emplea pequeños pasos aleatorios mientras busca una conformación favorable y realiza una agrupación por conformación de los resultados que obtiene para una posterior clasificación mediante niveles de energía. A diferencia de AD4, Vina calcula derivados los cuales generan un gradiente, de esta manera desempeñan una optimización más exacta. Esto probó que el algoritmo de búsqueda del programa AD4 es inefectivo para moléculas con un alto número de enlaces rotables. Vina no agrupa sus resultados para una posterior clasificación, pero muestra un desempeño superior (Chang, Ayeni, Breuer, & Torbett, 2010). A continuación se presenta una tabla comparativa la cual menciona las diferencias y las similitudes que existen entre los dos programas:

Tabla 19 Diferencias y Similitudes entre AutoDock Vina y AutoDock 4.

AUTODOCK VINA	AUTODOCK 4
Diferencias: <ul style="list-style-type: none"> • Es más rápido. • Es más exacto en el reacoplamiento proteína-ligando. • Presenta menos problemas al momento de trabajar con moléculas de gran tamaño. 	Diferencias: <ul style="list-style-type: none"> • Puede ser hasta 10 veces más lento. • Puede fallar al utilizar moléculas de mayor tamaño.
Similitudes: <ul style="list-style-type: none"> • Al momento de trabajar el <i>docking</i> con moléculas pequeñas los resultados obtenidos por los dos programas son bastante similares. • En la función de ponderación ambos usan funciones empíricas que incluyen enlaces de hidrógeno y enlaces rotables. 	

Fuente: Max W. Chang, 2010

13.8 Bibliotecas Virtuales:

El HTS y el VS han sido técnicas que han demostrado ser muy eficientes independientemente, sin embargo, estas, al ser implementadas simultáneamente pueden mejorar sus resultados. El HTS ofrece una gama amplia de estructuras a ser probadas en un receptor, mientras que el VS se ha notado es de 100 a 1000 veces más eficiente en realizar las pruebas evitando falsos positivos. Y a pesar de que el HTS es la técnica dominante, el VS ya es utilizado regularmente en investigación farmacéutica (Shoichet, 2004).

En contraste con las bibliotecas de compuestos sintéticos que utiliza el HTS para realizar sus pruebas, el VS cuenta con bases de datos de las que se puede extraer información tanto de moléculas pequeñas como de moléculas grandes. El problema con el VS no radica en ellas, sino en buscar siempre mejores alternativas como funciones de evaluación y algoritmos de búsqueda, pero las bases de datos son una parte importante en el proceso (Shoichet, 2004).

Las bases de datos de estructuras pequeñas juegan un papel muy importante en el descubrimiento de estructuras líderes. Existen grandes almacenamientos de moléculas como medicamentos, carbohidratos, enzimas, reactivos, productos naturales, derivados, etc. que tienen, además de la estructura molecular en 3 dimensiones, propiedades fisicoquímicas y a veces farmacocinéticas de interés (Song, Lim, & Tong, 2009).

Las bases de datos de moléculas biológicas, como lo son proteínas, algunas enzimas y otros receptores, son construidas a partir de estructuras determinadas por difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear. Estas son muy importantes al tratarse de enfermedades o condiciones humanas y sus tratamientos (Song, Lim, & Tong, 2009).

13.9 QSAR y ADME/Tox

La Relación Estructura-Actividad Cuantitativa (o QSAR por sus siglas en inglés) es un método que busca construir modelos matemáticos o computacionales para establecer una relación, por medio de métodos estadísticos, entre la estructura de un compuesto químico y su actividad. En el caso del diseño de fármacos, la estructura se refiere a las propiedades o descriptores de las moléculas, sus sustituyentes o sus campos de interacción energética. La función puede relacionar propiedades como afinidad de enlace, actividad, toxicidad, constantes cinéticas, etc. Los métodos estadísticos utilizados pueden ser desde regresiones lineales simples, hasta métodos de mínimos cuadrados parcial, máquinas de soporte vectorial o redes neurales artificiales (Verma, Khedkar, & Coutinho, 2010).

Los objetivos de esta técnica son:

- Correlacionar cuantitativamente y recopilar las relaciones entre las tendencias de las alteraciones químicas estructurales, y los respectivos cambios en términos biológicos. Esto a modo de comprender qué propiedades químicas determinan la actividad biológica.
- Optimizar las moléculas líderes existentes para mejorar su actividad biológica.
- Predecir la actividad biológica de moléculas que no han sido probadas o ni siquiera han sido producidas.

Las técnicas en QSAR han ido evolucionando con el tiempo. Desde que se tuvo la primera idea de relacionar estructura con actividad en 1868, la técnica se ha perfeccionado aumentando su riqueza para predicción y su complejidad. Una manera de observar esa tendencia es al estudiar la cantidad de dimensiones con las que se trabajan estos modelos (Verma, Khedkar, & Coutinho, 2010).

- 1D-QSAR: correlaciona la actividad con propiedades como pK_a , log P, etc.
- 2D-QSAR: correlaciona la actividad con patrones de conectividad (estructuras básicas) y farmacóforos 2D.
- 3D-QSAR: correlaciona la actividad con campos de interacción no-covalente alrededor de la molécula.

- 4D-QSAR: incluye todas las conformaciones posibles de una estructura en 3D-QSAR.
- 5D-QSAR: representa explícitamente diferentes modelos inducidos en 4D-QSAR.
- 6D-QSAR: incorpora modelos de solvatación en 5D-QSAR.

Otro gran avance que se presentó en 1987 fue el análisis de campo molecular comparativo (o CoMFA por sus siglas en inglés). Esta técnica utiliza redes y el método de mínimos cuadrados parciales para determinar de manera numérica cuantitativa la actividad de una estructura en 3 dimensiones. Después de su creación, CoMFA fue precedido por CoMSIA (análisis de índices de similaridad molecular comparativo), el cual ya consideró propiedades de estéricas, electrostáticas, hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno. Posteriormente se han ido creando diferentes modelos a partir de CoMFA y CoMSIA que mejoran algunos aspectos de la correlación de actividad con estructura (Verma, Khedkar, & Coutinho, 2010).

Una forma de representar también una estructura para poder encontrar una correlación con su actividad es mediante sus descriptores. Estos pueden ser de diferentes tipos, pero uno que es de mucha ayuda es el de huellas digitales moleculares. Estas son representaciones moleculares en función de secuencias de átomos vinculados, incluyendo la identidad de cada átomo, para formar una "ruta". El algoritmo de huella digital genera varias rutas y a cada colección le asigna un bit. Entre más corta sea la huella, más rutas habrá representadas en cada bit. Este método es ampliamente utilizado en combinación con coeficientes de similaridad. Estos calculan la similitud entre dos huellas digitales moleculares de la misma longitud. Su eficiencia ha hecho a esta combinación de métodos una de las más utilizadas para análisis QSAR (Srinivas, Priyadarshini, Praveen, Pradeep, & Narahari, 2007).

Al realizar un análisis QSAR, es importante recordar que el resultado numérico puede ser uno o varios, dependiendo del método utilizado. Generalmente se obtiene un coeficiente de correlación que indica qué tan similar es la estructura probada con

las anteriores. Este da una vaga idea de la estructura líder que se puede derivar de la base de datos con la que se construyó el modelo (Verma, Khedkar, & Coutinho, 2010).

Un gran problema del diseño de fármacos *in silico* es que el docking puede dar, como resultados, falsos positivos. Para validar la conformación hallada en un docking, se utilizan una de 3 técnicas: docking consigo mismo, utilizar una conformación hallada para clasificar las moléculas en una base de datos como activas o no activas, y 3D-QSAR. En este último método, la conformación se considera válida si su alineación en 3D con otros ligandos explica una variación en bioactividad (e.g. CoMFA). Esto, aunque es un método muy efectivo, puede consumir tiempo, por lo que también se puede establecer una relación entre los puntos de contacto de los ligandos con el receptor y de allí correlacionar la estructura con la actividad buscada (Taha, y otros, 2011).

Finalmente, al tratarse de propiedades farmacocinéticas, existen una serie de descriptores que hacen el análisis QSAR más fácil. Estos son las reglas de Lipinski. Después de estudiar muchos de los medicamentos producidos por Merck y Pfizer, se notó que había una tendencia en algunas propiedades de estos: peso molecular, lipofiliidad, átomos donadores de puentes de hidrógeno y átomos aceptores de puentes de hidrógeno. Se planteó algunos modelos y después de probar su capacidad predictiva se llegó a la siguiente conclusión:

Para un medicamento de administración oral, este debe de tener las siguientes propiedades:

- Peso molecular por debajo de los 500 daltons.
- Coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$) no mayor de 5.
- No debe de tener más de 5 átomos donadores de puentes de hidrógeno.
- No debe de tener más de 10 átomos aceptores de puentes de hidrógeno.

Con esto se garantiza una buena absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) del medicamento. La toxicidad del mismo, por estar relacionada de cierta manera a estas propiedades, es directamente afectada al cumplirse las reglas

anteriores. Por esta razón también se incluye dentro del análisis (Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, 2000).

Computacionalmente se pueden determinar muchas de estas propiedades, excepto por el coeficiente de partición. Por esta razón han aparecido varios modelos para el modelado de esta propiedad. Y si bien las técnicas para la determinación de estas propiedades no son óptimas, proveen una gran ventaja en el desarrollo de medicamentos nuevos. Al poder modelar las propiedades de ADME/Tox de un compuesto, se resuelve uno de los grandes problemas que tiene el HTS. Este tiende a generar compuestos más lipofílicos, lo cual, en medicamentos de administración oral, no es conveniente (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 2001).

13.10 Bioenergética y termodinámica

La bioenergética es el estudio cuantitativo de las transducciones de energía que tienen lugar en las células vivas y de la naturaleza y función de los procesos químicos sobre los que se basan estas transducciones (Nelson, 2009).

El proceso termodinámico se da cuando cambia el estado de un sistema, en este cambio pueden variar una o más propiedades del sistema (Cedrón, 2011).

El trabajo en termodinámica siempre representa un intercambio de energía entre un sistema y su entorno. La energía interna, es la suma de todas las energías existentes en el sistema (cinética, térmica, potencial, etc.). Es la suma de la energía transferida en forma de calor y la energía transferida en forma de trabajo. La variación de la energía interna de un sistema es igual a la suma del intercambio de calor entre el sistema y los alrededores y el trabajo realizado por el sistema (Cedrón, 2011).

Uno de los principales objetivos del estudio de la termodinámica, al menos por lo que respecta a los químicos, es poder predecir si ocurrirá alguna reacción. En condiciones especiales conocer esto es importante para una persona que se dedica a la síntesis de compuestos en un laboratorio de investigación, en la manufactura de productos químicos a nivel industrial o bien para tratar de entender los complicados procesos biológicos de una célula (Cedrón, 2011).

13.10.1 Las transformaciones biológicas de energía obedecen las leyes de la termodinámica

Muchas observaciones cuantitativas realizadas por físicos y químicos sobre la interconversión de las diferentes formas de energía condujeron a la formulación, en el siglo XIX, de dos leyes fundamentales de la termodinámica. La primera ley es el principio de conservación de la energía: en cualquier cambio físico o químico, la cantidad total de energía en el universo permanece constante; la energía puede cambiar de forma o puede ser transportada de una región a otra, pero no puede ser creada ni destruida. La segunda ley de la termodinámica, que se puede enunciar de diversas maneras dice que el universo tiende siempre hacia un aumento del

desorden: en todos los procesos naturales, aumenta la entropía del universo (Nelson, 2009) .

Los organismos vivos consisten en colecciones de moléculas mucho más organizadas que los materiales circundantes a partir de los cuales están construidos y mantienen y producen orden, aparentemente inconscientes de la segunda ley de la termodinámica. No obstante, los organismos vivos no violan la segunda ley sino que operan estrictamente dentro de ella. Para discutir la aplicación de la segunda ley a los sistemas biológicos, debemos definir primero estos sistemas y su entorno (Nelson, 2009).

El sistema reaccionante es el conjunto de materia que está experimentando un proceso químico o físico determinado, puede ser un organismo, una célula o dos compuestos que reaccionan. El sistema reaccionante y su entorno conjuntamente constituyen el universo. En el laboratorio, algunos procesos químicos o físicos pueden llevarse a cabo en sistemas aislados o cerrados, en los que no se intercambia materia ni energía con el entorno. Sin embargo, las células y organismos vivos son sistemas abiertos que intercambian tanto materia como energía con su entorno; los sistemas vivos no están nunca en equilibrio con su entorno y las constantes transacciones entre el sistema y el entorno explican cómo los organismos pueden crear orden en su interior mientras operan dentro de la segunda ley de la termodinámica (Nelson, 2009).

Cantidades termodinámicas que describen los cambios de energía que tienen lugar en una reacción química:

- La energía libre de Gibbs, G , expresa la cantidad de energía capaz de realizar trabajo durante una reacción a temperatura y presión constantes. Cuando una reacción transcurre con liberación de energía (es decir, cuando el sistema cambia de manera que tiene al final menos energía libre), la variación de energía libre, ΔG , tiene signo negativo y se dice que la reacción es exergónica. En las reacciones endergónicas, el sistema gana energía libre, por lo que ΔG , es positiva.

- La entalpía, H, es el contenido calórico del sistema reaccionante. Refleja el número y clase de enlaces químicos en los reactivos y productos. Cuando una reacción química libera calor, se dice que es exotérmica; el contenido calórico de los productos es menor que el de los reactivos y ΔH tiene, por convención un valor negativo. Los sistemas reaccionantes que toman calor del entorno son endotérmicos y tienen valores positivos de ΔH .
- La entropía, S, es una expresión cuantitativa de la aleatoriedad o desorden de un sistema. Cuando los productos de una reacción son menos complejos y más desordenados que los reactivos se dice que la reacción transcurre con ganancia de entropía (Nelson, 2009).

Las unidades de ΔG y ΔH son joules/mol o calorías/mol (recuérdese que 1 cal son 4.18 J); las unidades de entropía son joules/mol*Kelvin (J/mol*K) (Nelson, 2009).

En las condiciones existentes en los sistemas biológicos, las variaciones en energía libre, entalpía y entropía están relacionadas entre sí por la ecuación

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

En la que ΔG es la variación de energía libre de Gibbs del sistema reaccionante, ΔH es la variación de entalpía del sistema, T es la temperatura absoluta y ΔS es la variación de entropía del sistema reaccionante. Por convención, ΔS tiene signo positivo cuando aumenta la entropía y ΔH , como se ha indicado anteriormente, tiene signo negativo cuando se libera calor del sistema a su entorno. Cualquiera de estas condiciones, que son típicas de los procesos favorables, tienden a hacer ΔG negativa. De hecho, la ΔG de un sistema que reacciona espontáneamente es siempre negativa (Nelson, 2009).

La segunda ley de termodinámica afirma que la entropía del universo aumenta durante todos los procesos químicos y físicos, pero no requiere que el incremento de entropía tenga lugar en el propio sistema reaccionante. El orden producido en el

interior de las células a medida que crecen y se dividen está compensado de sobra por el crecimiento y división. En pocas palabras, los organismos vivos conservan su orden interno tomando de su entorno energía libre en forma de nutrientes o de luz solar y devolviendo al entorno una cantidad igual de energía en forma de calor y entropía (Nelson, 2009).

13.10.2 Las células precisan fuentes de energía libre

Las células son sistemas isotérmicos: funcionan a temperatura prácticamente constante (y a presión constante). El flujo de calor no es una fuente de energía para las células porque el calor puede realizar trabajo solamente cuando pasa a una zona u objeto a menor temperatura. La energía que las células pueden y deben utilizar es la energía libre, descrita por la función de energía libre de Gibbs, G , que permite la predicción de la dirección de las reacciones químicas, su posición exacta de equilibrio y la cantidad de trabajo que pueden llevar a cabo, teóricamente, a temperatura y presión constantes. Las células heterotróficas adquieren energía libre de las moléculas de nutrientes y las células fotosintéticas la adquieren de la radiación solar absorbida. Ambos tipos de células transforman esta energía libre en ATP y otros compuestos ricos en energía capaces de proporcionar energía para trabajo biológico a temperatura constante (Nelson, 2009).

María Estefanía González Álvarez
Tesisista

Lic. Omar Ernesto Velásquez González
Asesor

Dra. Sully Margat Cruz Velásquez
Asesora

Lcda. Lucrecia Margarita Peralta Azmitia de Madriz
Revisora

MSc. Hada Marieta Alvarado Beteta
Directora de Escuela Química Farmacéutica

Dr. Rubén Velásquez Miranda
Decano
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia