



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE INGENIERA QUÍMICA

**Técnicas y aplicaciones del modelado molecular sobre análogos
de dillapiol, moléculas inhibidoras del CYP450 3A4.**

Trabajo de fin de carrera.

AUTORA: Pineda Sotomayor Edith Nathalie

DIRECTOR: Compadre Cesar Manuel, Ph. D.

LOJA-ECUADOR

2012

Certificación

Doctor

Cesar M. Compadre

DIRECTOR DE TESIS DE GRADO

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado **“Técnicas y aplicaciones del modelado molecular sobre análogos de dillapiol, moléculas inhibidoras del CYP450 3A4”**; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, Agosto del 2012

f).....

Cl.....

Cesión de derechos

Yo, Edith Nathalie Pineda Sotomayor, declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos y acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de La Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte de Patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....

Nathalie Pineda Sotomayor

CI

DEDICATORIA

Dedico este importante paso en mi vida a mis padres y hermanos.

A mi padre por ser siempre incondicional, siendo mi apoyo, mi amigo y consejero constante. Por enseñarme día a día el valor de la familia, y por estar siempre presente.

A mi madre Margarita, por ser la compañía diaria y un gran ejemplo de mujer.

A mis hermanos Raúl, Margarita y Mariasol.

Y a las personas que sabiamente Dios ha puesto en mi camino a lo largo de la vida.

Nathalie Pineda Sotomayor

AGRADECIMIENTO

En primer lugar al padre creador por permitirme poco a poco construir y alcanzar mis sueños; a mis padres y hermanos, por enseñarme y mostrarme día a día el valor de la familia; con su incondicional apoyo y ser fuente de inspiración.

Al Doctor Cesar Compadre, por sus sabios consejos, por su presencia incondicional en el desarrollo del presente trabajo de investigación, por sus valiosos aportes, comentarios y sugerencias.

Nathalie Pineda Sotomayor

INDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
CERTIFICACIÓN.....	II
CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
INDICE.....	VI
RESUMEN EJECUTIVO	X
ARTÍCULO.....	XI
I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	
1.1 Fin del proyecto.....	2
1.2 Propósito del proyecto.....	2
1.3 Componentes del proyecto.....	2
II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
A. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD	7
1. QSAR	7
2. CoMFA.....	8
B. DESCRIPTORES MOLECULARES.....	12
1. Métodos Semi-empíricos.....	12
2. SCF-MO.....	13
3. Coeficientes de partición.....	14
III. RELACIONES ESTRUCTURA ACTIVIDAD PARA LA INHIBICIÓN DEL CYP450 3A4 MEDIANTE DILLAPIOL Y DERIVADOS	
A. Introducción.....	15
1. Estructura, inhibición y mecanismo del Citocromo P450.....	15
2. Dillapiol y derivados.....	18
3. Importancia.....	18

B. Métodos	
1. Building Training set.....	18
2. Actividad biológica de dillapiol y derivados.....	23
3. Alineación de dillapiol y derivados.....	24
4. Determinación de cargas.....	25
5. Coeficientes de partición.....	26
6. CoMFA.....	26
7. PLS.....	26
IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS	
A. Análisis de la estructura del grupo de datos.....	27
1. Análisis PLS.....	27
2. Análisis PLS con cálculos Gaussian.....	33
B. Análisis General.....	34
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
A. Conclusiones.....	37
B. Recomendaciones.....	37
VI. BIBLIOGRAFÍA	
A. Bibliografía.....	38
VII. ANEXOS	40

ABREVIATURAS

AM1: Austin Model 1

CoMFA: Conformational Field Analysis

CSD: Cambridge Structure Database

CYP: Citocromo

CYP3A4: Citocromo 3A4

DFT: Funcional de la densidad

GAUSSIAN: Software comercial de uso en química teórica

HOMO: High Occupied Molecular Orbital

LOG P: Coeficiente de partición o reparto

LUMO: Lowest Un-occupied Molecular Orbital

PLS: Partial Least Square

PM3: Parametric Method 3

QSAR: Quantitative Structure Activity Relationship

SAR: Structure Activity Relationship

SCF: Self Consistent Field

SCF-MO: Self Consistent Field Molecular Orbital
SYBYL: Software usado para modelado molecular
TOM: Teoría de Orbitales Moleculares

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Estructura química de las moléculas.....	5
Tabla 2. Inhibición de dillapiol y derivados IC ₅₀	24
Tabla 3. Métodos con los que se trato la base de datos	27

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Eneldo.....	3
Figura 2. Estructura química del fragmento.....	6
Figura 3. Regiones en 3D CoMFA.....	9
Figura 4. Ciclo del Citocromo P-450	17
Figura 5. Conformación de la molécula # 1 con la menor energía de minimización.....	19
Figura 6. Conformación de la molécula # 2 con la menor energía de minimización.....	19
Figura 7. Conformación de la molécula # 3 con la menor energía de minimización.....	20
Figura 8. Conformación de la molécula # 4 con la menor energía de minimización.....	20
Figura 9. Conformación de la molécula # 5 con la menor energía de minimización.....	20
Figura 10. Conformación de la molécula # 6 con la menor energía de minimización.....	21
Figura 11. Conformación de la molécula # 7 con la menor energía de minimización.....	21
Figura 12. Conformación de la molécula # 8 con la menor energía de minimización.....	21
Figura 13. Conformación de la molécula # 9 con la menor energía de minimización.....	22
Figura 14. Conformación de la molécula # 11 con la menor energía de minimización.....	22
Figura 15. Conformación de la molécula # 12 con la menor energía de minimización.....	22

Figura 16. Plantilla para alinear la base de datos	25
Figura 17. Set de moléculas alineadas	25
Figura 18. SYBYL-X1.3 Análisis de variables.....	28
Figura 19. SYBYL-X1.3 Análisis validado PLS	28
Figura 20. Número óptimo de componentes	29
Figura 21. Resumen de resultados obtenidos en CoMFA	29
Figura 22. Molécula # 1 en CoMFA	30
Figura 23. Molécula # 2 en CoMFA	30
Figura 24. Molécula # 3 en CoMFA	30
Figura 25. Molécula # 4 en CoMFA	31
Figura 26. Molécula # 5 en CoMFA	31
Figura 27. Molécula # 6 en CoMFA	31
Figura 28. Molécula # 7 en CoMFA	32
Figura 29. Molécula # 8 en CoMFA	32
Figura 30. Molécula # 9 en CoMFA	32
Figura 31. Molécula # 11 en CoMFA	33
Figura 32. Molécula # 12 en CoMFA	33
Figura 33. Número óptimo de componentes.....	34
Figura 34. Resumen datos de salida	34
Figura 35. Características estructurales que incrementan la actividad	35
Figura 36. CoMFA molécula 05	35
Figura 37. CoMFA molécula 07	36
Figura 38. CoMFA molécula 12	36

RESUMEN EJECUTIVO

En el presente trabajo se realizó ensayos de fluorescencia de alto rendimiento para identificar el efecto inhibitorio que tienen algunas moléculas de dillapiol aisladas y sintetizadas previamente sobre el citocromo humano CYP 450 3A4. Con la información obtenida, se precedió a determinar nuevos descriptores que nos sirvieron para desarrollar un modelo molecular utilizando QSAR y análisis 3D-QSAR y CoMFA.

Estos análisis indicaron que la actividad se correlaciona con el volumen estérico de los sustituyentes y sus propiedades electrostáticas en un patrón característico determinado por el análisis de CoMFA.

I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 Fin del proyecto

El objetivo de esta investigación es contribuir en el campo de desarrollo e innovación de medicamentos, abaratando costos de producción y optimizando tiempo de investigación en síntesis química. Además soportar el uso de modelado molecular dentro del diseño de fármacos.

1.2 Propósito del proyecto

Este estudio nos permitirá entender las relaciones estructura toxicidad del conjunto de moléculas, determinando la razón de la actividad e inactividad de las mismas.

1.3 Componentes del proyecto

1. Conocer técnicas y procedimientos para el estudio de inhibición de la metabolización enzimática por el Citocromo P450-BD-Gentest CYP 3A4 con un plato lector *Spectramax M5 microplate reader*.
2. Manejar técnicas de modelado molecular dentro del diseño de fármacos.
3. Sugerir la razón de la actividad de los compuestos basados en el modelo elaborado.

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El presente trabajo de investigación hace referencia al uso de la química computacional en el diseño de fármacos. Se incluye tanto los ensayos biológicos de actividad inhibitoria del citocromo P450 3A4 (CYP3A4) de moléculas de dillapiol (eneldo) como los estudios de relación estructura actividad (3D-QSAR).

El eneldo (*Anethum graveolens*) es una planta herbácea anual perteneciente a la familia de las apiáceas. Se tiene mención de ella desde la antigüedad. Es oriunda de la región oriental del mar Mediterráneo, donde hoy abunda. Es aromática, mide, aproximadamente, de 30 cm a más de un metro de altura; es de tallo largo y estriado, de flores amarillas dispuestas en umbelas, que rematan al tallo, y de hojas laciniadas (ver Fig.1). Sus hojas y frutos son usados en cocina como condimentos, y sus semillas se emplean en la preparación de ciertas infusiones con fines terapéuticos. (1)



Fig. 1 Eneldo. (Fuente original: Prof. Dr. Otto Wilhelm Thomé *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* 1885, Gera, Germany)

Entre sus propiedades se encuentra: estimular las secreciones digestivas, se usa contra flatulencias y dispepsias y para el hipo espasmódico. Además atenúa espasmos uterinos y dolores de la menstruación. (1)

En la Europa continental es habitual el uso del eneldo en todos los guisos de pescado, pues mejora su sabor y los hace más fáciles de digerir. Es famoso por su afinidad con el pescado y por su utilización en los encurtidos. Es dulce, aromático y ligeramente amargo. Es una hierba muy utilizada

en la cocina escandinava: ingrediente muy importante del salmón marinado, se usa también, en las conservas de arenque y como condimento en la conservación de los pepinos. En Alemania y la Europa oriental se emplea en adobos, como conservante de la col fermentada y de los pepinillos pequeños, y se conoce como vinagre de eneldo. Desafortunadamente es así como muchas personas, alrededor del mundo, utilizan el eneldo, sin saber que los principales componentes del mismo, son el dillapiol y sus derivados, conocidos inhibidores del CYP3A4. (2)

El citocromo P450 3A4 en el hombre es una proteína asociada a las membranas citoplasmática, mitocondrial y del retículo endoplásmico. La mayoría de los CYP actúan sobre varios sustratos, pudiendo algunas de ellas catalizar varios tipos de reacciones. *In vivo*, estos sustratos incluyen numerosas drogas o componentes tóxicos derivados de metabolismo. Las enzimas del citocromo P450 están presentes en la mayoría de los tejidos del organismo, jugando un papel fundamental en la síntesis de hormonas (estrógenos y testosterona), colesterol o vitamina D3. Por otra parte, el CYP constituye el mayor complejo enzimático involucrado en el metabolismo de los fármacos en nuestro organismo. Algunos de estos fármacos tienen la capacidad de inducir o inhibir la actividad de los citocromos. (7)

Examinando las estructuras del grupo de moléculas (Tabla 1), podemos inferir que el fragmento común (ver. Fig. 2), metilendioxi-benceno que comparten el dillapiol y sus derivados, interfiere con el mecanismo del CYP P450 3A4.

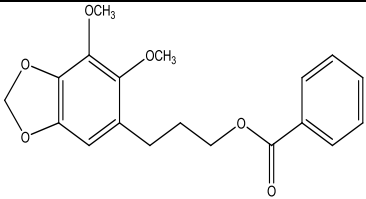
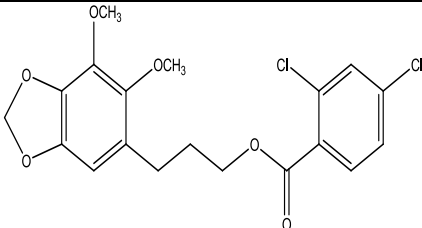
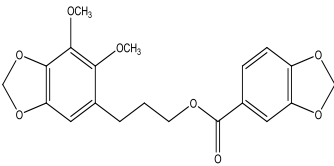
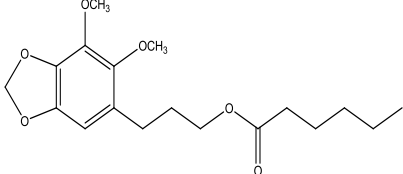
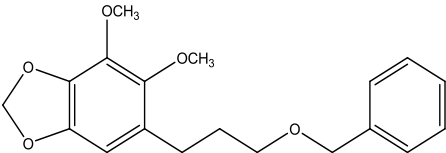
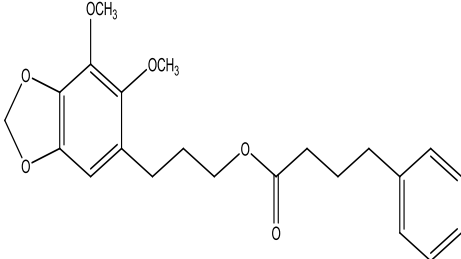
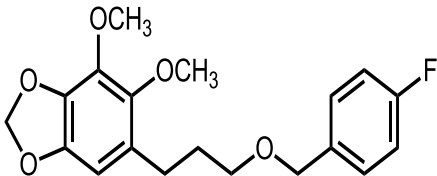
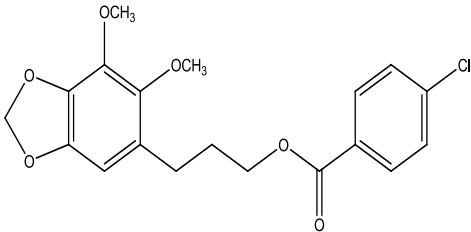
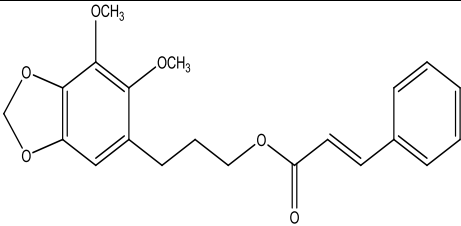
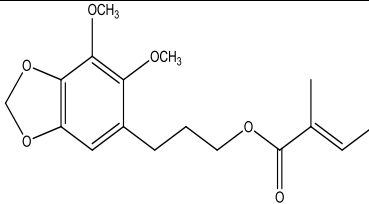
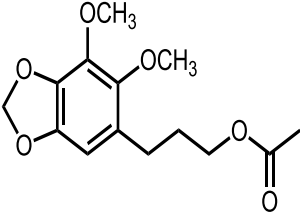
Entonces, ¿Existe realmente una relación entre la estructura de este grupo de productos químicos y su actividad inhibitoria CPY450 3A4? Si es así, ¿Qué es? ¿Cómo se podría diseñar nuevas moléculas con propiedades específicas? Para responder todas estas inquietudes, se utilizó un enfoque de la química computacional para explorar la relación entre la actividad inhibitoria CYP3A4 del grupo de moléculas y sus diferentes propiedades. Es así como fue posible expresar un modelo, que más tarde sirvió para predecir propiedades físicas, químicas y biológicas sobre estructuras conocidas; sirviéndonos además como filtro para determinar la potencialidad de otros en la inhibición del CYP450 3A4, y además proponer la síntesis de nuevos productos naturales.

Es importante mencionar que el dillapiol y sus derivados están siendo utilizados como sinergistas¹ de insecticidas, el hecho de ser un producto natural, ha llamado la atención de muchos, pues con su aplicación se contribuirá en la conservación ambiental. Entonces también se puede utilizar el modelo para optimizar el sinergismo, es decir, hacerlo más poderoso. Será de gran valor en

¹ Cuando la interacción da lugar al aumento de efecto de uno o de los dos fármacos se habla de efecto sinérgico. Una sinergia de suma es cuando el efecto final es aproximadamente igual a la suma de los efectos de ambos fármacos. Cuando el efecto final es mucho mayor del esperado por esta suma se trata de una sinergia de potenciación.

la optimización de su diseño, modificación y procesamiento. Tanto el tiempo y el coste de la síntesis se pueden reducir, conociendo previamente y con precisión sus propiedades.

Tabla 1. Estructura química de las moléculas

 <p>Molécula # 1</p>	 <p>Molécula # 2</p>
 <p>Molécula # 3</p>	 <p>Molécula # 4</p>
 <p>Molécula # 5</p>	 <p>Molécula # 6</p>
 <p>Molécula # 7</p>	 <p>Molécula # 8</p>
 <p>Molécula # 9</p>	 <p>Molécula # 11</p>
 <p>Molécula # 12</p>	

En el enfoque tradicional, una molécula, producto químico, o derivados es diseñado y sintetizado físicamente, es decir en el laboratorio, luego se comprueban sus propiedades. Si las propiedades fallan, estos se descartan, y se inicia nuevamente con la síntesis química, sin embargo ya se han perdido recursos económicos y lo más importante tiempo. El nuevo enfoque pretende que en el diseño molecular, nos sirva para predecir estas propiedades sobre la base de cálculos teóricos. Las interacciones farmacológicas ocurren cuando el metabolismo de fármacos cambia, y por consiguiente la eficacia y la toxicidad de un medicamento cambian. Los inhibidores del CYP3A4 pueden cambiar el metabolismo de los fármacos por lo tanto inducir interacciones fármaco-fármaco. A pesar de que estas interacciones (fármaco-fármaco) son generalmente de ocurrencia negativa que hay que evitar, algunas interacciones CYP3A4 se han utilizado para lograr beneficios terapéuticos. En la década de los 90 se conoció que el Ketoconazol (inhibidor del CYP3A4) duplica la biodisponibilidad oral de la ciclosporina administrada al mismo tiempo y reduce la dosis de requerida adecuada en un 60 a 80% (11).

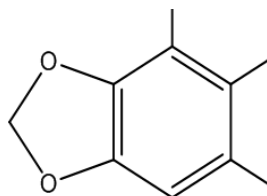


Fig.2 Estructura del fragmento, *metilendioxi*benzeno.

Recientemente se ha informado más y más interesantes aplicaciones de esta actividad inhibidora CYP450 mediante la administración de inhibidor de CYP3A4 para lograr un efecto terapéutico beneficioso. Se informó que el saquinavir (inhibidores de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia adquirida VIH) tiene baja biodisponibilidad oral, sin embargo pueden ser profundamente potenciados mediante la adición de ritonavir. El ritonavir es un inhibidor de la enzima CYP3A4 (5). Se informó además que los médicos que han co-administrado la ciclosporina, con agentes ahorradores (CSA) como el ketoconazol, anti fúngicos azoles y los antagonistas del calcio, fármacos terapéuticos con los cuales se puede lograr menores dosificaciones de ciclosporina. (11)

Sabemos que el orbital exterior de una molécula es el más activo y principal responsable de las propiedades químicas, físicas y biológicas de la misma. Entonces podemos inferir que existe información extremadamente útil en los orbitales de las moléculas. Esta información puede ser obtenida con los bien conocidos cálculos de mecánica cuántica *Self Consistent Field Molecular Orbital* (SCF-MO). Los cálculos realizados al grupo de moléculas disponibles fueron *ab initio* SCF-MO.

Una vez obtenidas algunas propiedades con la ayuda de la mecánica cuántica, correlacionamos las estructuras moleculares con las propiedades de interés CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*).

Las estructuras tridimensionales de dillapiol y sus derivados fueron obtenidas a partir de fragmentos de la base de datos de Cambridge (*Cambridge Structure Database*), más tarde con la ayuda del simulador molecular del software SYBYL, se optimizó el ángulo de enlace, longitud de enlace y el ángulo diedro. Finalmente, se corrió el análisis conformacional para obtener la energía mínima de conformación de cada una de las estructuras. Se usó el mismo método para determinar la cada una de las estructuras, modificando grupos y obteniendo optimizaciones.

Los descriptores moleculares, las cargas de cada molécula y cargas atómicas, se obtuvieron mediante cálculos de mecánica cuántica. Se construyó una base de datos con la estructura tridimensional de cada una de las moléculas y fueron alineadas, poniendo como base de superposición su estructura común.

Los campos estéricos y electrostáticos de cada molécula se definen por la energía de la interacción de las moléculas con un átomo en una serie de puntos de malla que lo rodean. El mínimo cuadrados parciales (PLS) fue utilizado para correlacionar los campos moleculares con la actividad biológica.

A. RELACIÓN ESTRUCTURA- ACTIVIDAD

1. QSAR

La actividad biológica de cualquier compuesto es una consecuencia directa de su estructura molecular. El acrónimo QSAR está basado en el nombre en inglés "*Structure Activity Relationships*" un método para relacionar cuantitativamente la actividad biológica observada a las características estructurales en una relación matemática. Las investigaciones de la relación entre la estructura química y la actividad de los compuestos (SAR) son útiles en la comprensión de la actividad de interés y en la predicción de la actividad de nuevos compuestos basados en el conocimiento de la estructura química. Estas predicciones se pueden lograr mediante la cuantificación de la SAR. Corwin Hansch (1964) y sus colaboradores desarrollaron relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) en la década de 1960 y la ecuación QSAR más tarde generalizado para la actividad biológica. Siendo esta, la suma de los efectos estéricos, electrónicos e hidrofóbicos y la interacción de los compuestos con algún receptor determinan la actividad biológica, como se expresa en la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad Biológica} = f(\text{estéricas}) + f(\text{electrónicas}) + f(\text{hidrofóbicas}) + f(\text{otras})$$

La actividad biológica es una relación lineal de energía libre que se llama extra-termodinámica, porque es sólo una aproximación de la actividad biológica y se puede reducir a la

energía libre al unirse a, o en reacción con una bio-molécula. Es evidente que la elección de las propiedades fisicoquímicas es de crucial importancia para obtener resultados satisfactorios. La actividad biológica de las moléculas se mide habitualmente en ensayos para establecer el nivel de inhibición de determinadas transducciones² de señales o rutas metabólicas. Las sustancias químicas pueden ser también biológicamente activas si poseen toxicidad. El descubrimiento de fármacos, a menudo, supone el uso de QSAR para identificar las estructuras químicas que podrían tener buenos efectos inhibidores sobre una diana biológica específica y tener baja toxicidad (actividad no-específica). La predicción del coeficiente de partición (Log P) es de especial interés. Es una medida importante en la identificación de sustancias con potencial interés farmacológico.

Los QSAR se construyen mediante el análisis de propiedades conocidas, medidas experimentalmente en el laboratorio, o calculadas. Estas propiedades se definen usando una serie de descriptores que representan las características del sistema que influyen en la propiedad de interés. Los descriptores más comunes incluyen propiedades termodinámicas (como las energías del sistema), propiedades electrónicas (valor de la más baja o más alta ocupación de los orbitales moleculares, HOMO, LUMO), o las funciones que representan la forma molecular (estructura, el número de enlaces, etc.).

Para los presentes estudios de QSAR, se generó una hoja de cálculo, en donde se organizó a modo de que cada fila horizontal corresponde a una molécula y cada columna corresponde a una propiedad de un compuesto. Un QSAR se define mediante el análisis de todos estos datos a fin de establecer una ecuación que describa la relación entre la propiedad (actividad) y los descriptores. Los métodos que pueden utilizarse para establecer esta correlación, incluyen técnicas de regresión, análisis de componentes principales, y algoritmos genéticos. El QSAR nos indica qué descriptores son más estadísticamente significantes en la determinación de la propiedad, lo que nos permite centrarnos sobre las características moleculares, que esos descriptores representan.

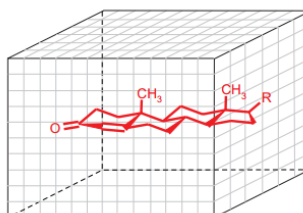
Los análisis QSAR nos ayudarán a aprovechar al máximo los datos, sin importar si estos son experimentales, simulados o de una base de datos previa. El QSAR también puede utilizarse para calcular predictivamente una propiedad de un nuevo compuesto para el cual los descriptores son conocidos o pueden ser calculados.

2. COMFA

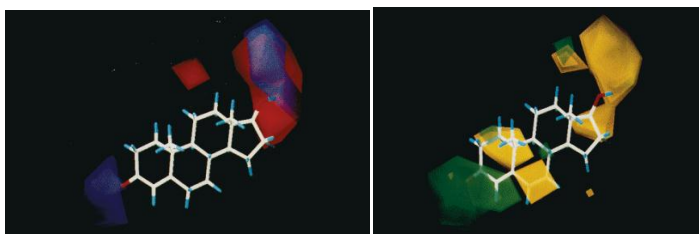
El análisis comparativo del campo molecular (CoMFA “*Comparative Molecular Field Analysis*”) es un enfoque QSAR cuyos modelos 3D han tenido éxito en la explicación y la predicción de las actividades de muchos tipos de moléculas, en el que incluyen compuestos sintéticos (12), y productos naturales.

² Por definición, es la transformación de un tipo de señal o energía en otra de distinta naturaleza.

CoMFA se basa en que las diferencias en una propiedad se relacionan a menudo con las formas de los campos no-covalentes (campos electrostáticos y estéricos) alrededor de las moléculas ensayadas (4). En CoMFA, las moléculas están representadas y se comparan por sus campos estéricos y electrostáticos muestra en las intersecciones de uno o más puntos en una región que abarca 3-dimensiones.



A.



B.

C.

Fig. 3 Regiones en 3D CoMFA

A. Diagrama mostrando la región en 3D, en la que se alinean las moléculas para efectuar el análisis de CoMFA.

B. Colores con los que generalmente se representan los campos electrostáticos.

C. Colores con los que generalmente se representan los campos estéricos en un análisis CoMFA

En CoMFA, cada columna de parámetros estructurales registra la intensidad de un tipo particular de interacción, con un átomo de carga especificada y propiedades estéricas para cada uno de los compuestos, en un punto particular en el espacio. Entonces la red tridimensional es llenada por la energía de interacción estérica neta de todos los átomos de la molécula, con un átomo de prueba situado en un punto dado en la red. La energía electrostática también se calcula y registra en una columna de parámetro estructural diferente. El átomo de prueba se mueve entonces a punto y las energías estéricas y electrostáticas de la interacción se vuelven a calcular y poner en otro par de columnas. El átomo de prueba sigue viajando a través de la red general hasta que todos los compuestos se han procesado. En cada fila de la tabla resultante se describen los campos ejercidos por una conformación particular de una molécula con cualquier átomo circundante. Antes de crear la

tabla, las moléculas deben estar alineadas, usando una estructura común o con alguna regla de alineación.

Como en cualquier estudio QSAR, el objetivo de CoMFA es encontrar una correlación matemática que relaciona la actividad biológica con la intensidad de las fuerzas, en este caso. Mínimos cuadrados parciales (PLS) es una de las técnicas utilizadas para producir una ecuación QSAR a describir o predecir la correlación entre una propiedad (las variables dependientes) y uno o más descriptores (variables independientes).

PLS es una herramienta de gran alcance general y muy poderosa que se usa para derivar relaciones lineales entre columnas de datos y fue desarrollado por S. Wold y sus colaboradores (3). La mayoría de PLS se llevan a cabo en dos etapas. La primera, es una validación cruzada que se utiliza para encontrar el número óptimo de componentes y nos muestra un modelo apropiado para los valores de los datos, y la segunda etapa se realiza mediante el número óptimo de componentes para establecer el único modelo que mejor represente a los datos.

La técnica utilizada en PLS para evaluar la capacidad predictiva de un modelo QSAR es la validación cruzada. La validación cruzada, también conocida como “*Leave one out*”-“dejar uno fuera”-, procede por la omisión de una de las dependientes, y la predicción de la variable omitida, por lo que no hay aleatoriedad en las asignaciones.

Con la cros-validación uno de los valores experimentales conocidos se trata como desconocido. El análisis que se da con una validación cruzada se repite, exceptuando el compuesto temporalmente desconocido. La ecuación resultante se utiliza para predecir la medición experimental para el compuesto omitido, y los errores individuales cuadrados se van acumulando. El ciclo de la validación cruzada se repite, dejando de lado un compuesto diferente, hasta que cada compuesto ha sido excluido y predicho exactamente una vez. El resultado de la validación cruzada es la suma de los cuadrados de los errores de predicción, a veces llamado PRESS (*Predictive Residual Sum of Squares*). El PRESS es la incertidumbre en la predicción de un compuesto determinado, basándose en el análisis realizado con los otros compuestos en la base de datos.

En PLS, las iteraciones continúan hasta que el PRESS no disminuye significativamente. Una forma de pensar sobre el proceso es reconocer que sólo una parte de la información en la tabla de QSAR es "señal" de una relación coherente entre la actividad y los descriptores estructurales que pueden ser utilizados para predecir de forma fiable las estructuras desconocidas y/o actividades desconocidas. El resto es el "ruido" que podría racionalizar mejor uno o dos valores experimentales individuales, pero que es probable que sea engañosa cuando se utilizan en las predicciones para moléculas desconocidas. Así, el valor PRESS es la medida para maximizar la relación señal-ruido en

el modelo PLS final. PRESS se expresa comúnmente como un valor r^2 (q^2) cross-validados en la evaluación del análisis global.

En CoMFA, generalmente se obtienen dos valores de r^2 , el no cross-validado y el cross validado. El cross validado es q^2 que suele ser inferior o muy inferior a la r^2 convencional. Los valores de q^2 pueden variar desde 1,0 a menos de 0.

Los valores no cross-validados pueden ser tanto clásico r^2 como convencional r^2 , es la proporción de la varianza original por la ecuación QSAR. No se ve afectado por la magnitud de la actividad predicha. Se trata de una medida de cuán bien un modelo en particular se ajusta a los datos. Los valores absolutos para el r^2 convencional pueden variar de 0,0 a 1,0. Un $r^2 = 1$ significa que la ecuación explica el 100% de la varianza y un $r^2 = 0$ significa que la ecuación no explica la variación de los datos. El cálculo de r^2 clásica es casi el mismo que q^2 , excepto que el PRESS se sustituye por la suma de los cuadrados de las diferencias entre el ajuste de mínimos cuadrados y las observaciones experimentales.

Un valor de q^2 de 1,0, corresponde a las predicciones perfectas, sin embargo, es muy poco probable, porque siempre hay alguna variación intrínseca asociada con la determinación de la actividad biológica. Sólo las ecuaciones con un r^2 razonable pueden ser utilizadas para un análisis final cross-validado.

Tenemos un riesgo al usar PLS, pues se puede pasar por alto si las correlaciones son correctas. Por ejemplo, podemos iniciar con 2 columnas perfectamente correlacionadas, y sucesivamente vamos aumentando el número de columnas, rellenas con números aleatorios y además la consecuente realización de PLS. En este caso, la correlación perfecta siempre sigue existiendo, con los valores de q^2 y r^2 de 1,0. Sin embargo, en la práctica, al ir aumentando las columnas, el valor promedio reportado de q^2 desciende significativamente, además que la probabilidad de que PLS demuestre una correlación significativa disminuye. Así, se podría señalar que el incremento de columnas y valores no correlacionados, opacan completamente la relación perfecta que teníamos al inicio.

El final de la mayoría de los estudios QSAR produce una ecuación lineal. Con los miles de términos en un CoMFA, QSAR haría solo una expresión. Sin embargo, como sabemos, cada punto de la red tiene un coeficiente de QSAR y cada coeficiente numérico ha conocido lugares en el espacio, la ecuación CoMFA-QSAR suele resumirse gráficamente como un mapa de contornos 3-D. Esta es la ventaja de CoMFA que puede proporcionar información sobre los requisitos de la estructura de máxima actividad en base a los mapas de contorno en 3D, que son codificados por colores. Por lo general, cada tipo de CoMFA (campo electrostático y el campo estérico) tendrá dos niveles de contorno, el más positivo y el negativo más. Estos mapas topográficos suelen proporcionar

información muy útil al sugerir nuevos compuestos con valores de propiedad más altos. Se sabe claramente que a mayor aumento estérico o al aumento de la interacción electrostática en una región, relacionado con una mayor actividad biológica. La ecuación CoMFA QSAR también puede utilizarse para predecir valores de las propiedades, proporcionando con ello la herramienta más conveniente para clasificar compuestos para su posterior síntesis.

C. DESCRIPTORES MOLECULARES

En los últimos años ha aumentado el número de personas que hacen química teórica. Este incremento se ha visto por el desarrollo de programas informáticos, que cada vez son más fáciles de usar. La química teórica se puede definir como la descripción matemática de la química. La química computacional es un término que se utiliza generalmente cuando un método matemático está lo suficientemente desarrollado que puede ser automatizado para la ejecución en un computador.

En la presente memoria, usamos paquetes informáticos para realizar algunas predicciones basadas en la relación entre las estructuras moleculares y propiedades moleculares, tales como la actividad biológica y propiedades conductoras.

1. Métodos semi-empíricos

El término "semi-empírico" se refiere a los métodos que utilizan el proceso general dictado por la mecánica cuántica, pero que se simplifica para ganar velocidad y se corrige mediante el uso de algunos datos experimentales. Todos estos métodos se caracterizan por la consideración de diversas simplificaciones en el operador de Fock y en la adición de ciertos parámetros. En ellos se busca:

- Simplicidad para poder aplicarlos a moléculas moderadamente grandes sin necesidad de un gran tiempo de cálculo.
- Se procura mantener el esquema SCF en la obtención de la función de onda.
- Se pretende tener en cuenta el menor número posible de electrones, pero siempre aquellos de interés químico, los de la capa de valencia.

El MOPAC *Molecular Orbital package* (paquete orbital molecular) es un paquete Semi empírico molecular desarrollado J.J.P. Stewart y sus colaboradores. Así se presentó al mundo por primera vez el método MNDO. El programa contiene además MNDO, MINDO/3, AM1 y PM3 hamiltonianos. Se utilizan para calcular geometrías moleculares y propiedades electrónicas. El programa se ejecuta en una amplia variedad de plataformas.

AM1 (*Austin Model 1*) se introdujo por primera vez en 1985 por Dewar, y se ha venido actualizado en varias ocasiones. Incluye parámetros para C, H, N, O, Cl, Br, I, Si, P, S, B, Zn, Hg, Ge y Se. AM1 en promedio producen menos errores en el cálculo de los momentos dipolares.

PM3 (*Parametric Method 3*) fue introducido por Stewart en 1989. Además de los elementos AM1, incluye parámetros para Ga, In, Tl, Pb, As, Te, Sb, Bi, Se. Es la forma más precisa con parámetros del método semi-empírico disponible. El PM3 produce el cálculo más preciso de los potenciales de ionización. A partir de los informes de la literatura y la experiencia, PM3 puede dar el resultado más consistente en comparación con AM1 y Gaussian, cuando se aplica a sistemas de anillos múltiples. Las palabras clave utilizadas para el cálculo de los cálculos es PM3, +0 de carga neta, singlete, tiempo límite 3600, convergencia normal y precisa, la optimización completa, y por defecto las demás opciones.

2. SCF-MO

GAUSSIAN es un software comercial de uso en química teórica, resuelve la ecuación de Schrödinger molecular basándose en la Teoría de Orbitales Moleculares (TOM), en el cual a partir de unos parámetros iniciales, como el tipo de método *ab-initio* (Hartree-Fock, Möller-Plesset, etc.), Funcional de la Densidad (DFT) o semiempíricos, (AM1, PM3, y otros), funciones base (STO-3G, 6-31G, 6-311+G*, y otras), y coordenadas iniciales de la molécula, bien en coordenadas cartesianas (indicando la posición x, y, z de los átomos de la molécula) o en internas (matriz-z) (distancias, ángulos y diedros), y la carga y multiplicidad, calcula la función de onda molecular y a partir de ahí se obtienen una serie de propiedades atómicas y moleculares (energía de la molécula, optimización de las coordenadas, densidad electrónica, momentos dipolares, cuadrupolares, etc.) muy útiles para trabajos posteriores.

El tipo más común de cálculo *ab initio* se llama un cálculo Hartree Fock (abreviado HF). Las energías calculadas son por lo general en unidades llamadas Hartrees ($1 \text{ H} = 27,2114 \text{ eV}$). Esta versión del algoritmo de Hartree Fock calcula las interacciones entre núcleos atómicos, electrones en presencia de otros electrones y electrones que interactúan con los núcleos. Las funciones de base de inicio son derivadas de los átomos y geometrías. Los integrales atómicos se calculan para estas funciones de base y se utilizan para aproximar la densidad molecular. Esta densidad y las integrales calculadas previamente se utilizan para calcular las interacciones y para formar una matriz de Fock. Un SCF se utiliza hasta que converge la densidad molecular dentro de un límite aceptable.

Gaussian es un sistema de programas que realizan cálculos *ab initio* de los átomos y las moléculas. Es la clave para entender longitud de enlace y la energía de reacción. El tipo más común es el de Hartree-Fock, que calcula las interacciones no relativistas entre núcleos de átomos, los electrones en el presente de otros electrones y electrones que interactúan con los núcleos. Las palabras clave que se utiliza para ejecutar el cálculo de Gaussian son el método HF, base 3-21G, la carga +0, la multiplicidad según corresponda, cargas MK.

3. Coeficientes de partición

Anteriormente se demostró que la actividad biológica era dependiente del grado de solubilidad de muchas clases de moléculas (13). Es bien sabido que las membranas biológicas son hidrófobas³. Sólo a la molécula con la hidrofobicidad correcta se le permitirá entrar en la membrana. Si la hidrofobicidad se vuelve demasiado grande, la molécula se quedará en la membrana, y si la hidrofobicidad es demasiado pequeña, la molécula tampoco puede entrar a la membrana. La hidrofobia es expresada por el coeficiente de partición *Log P* (octanol/agua), que ha mantenido un escenario central en el campo de los estudios QSAR por más de 30 años.

El coeficiente de reparto puede proporcionar información termodinámica importante acerca de las fuerzas hidrófobas y polares de una molécula. La mayoría de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) involucran a las propiedades de la hidrofobicidad, como *Log P*. Tales relaciones bien reflejan el transporte al lugar de acción o unión a un sitio hidrófobo en una molécula de receptor. El cálculo estimado de los coeficientes de reparto, se realizó en el software SYBYL.

³ El término proviene del griego, donde se combinan las palabras *hydrós* (agua), y *fobos* (horror). Por lo tanto, algo hidrófobo es aquello que tiene horror al agua.

III. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD PARA LA INHIBICIÓN DEL CYP450 3A4 MEDIANTE DILLAPIOL Y DERIVADOS

A. INTRODUCCIÓN

1. Estructura, inhibición y mecanismo del citocromo P450

A lo largo de su evolución, los organismos vivos han estado expuestos de forma continua a un número creciente de sustancias químicas extrañas presentes en su entorno y susceptibles de acceder a su interior de modo accidental. Para salvaguardarse del libre acceso de estos compuestos, los organismos vivos interponen una serie de barreras de naturaleza física o biológica. No obstante, un número indeterminado de los mismos es capaz de superar dichos mecanismos de protección y contactar con las células y tejidos produciendo efectos de diversa índole. Los compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano, pero que son capaces de acceder a su interior se conocen con el nombre genérico de xenobióticos. Se trata de compuestos de naturaleza química muy variada, algunos de los cuales son de origen natural, entre los que destacan el mico-toxina o los alcaloides, si bien la inmensa mayoría son productos originados por la propia actividad humana, como los contaminantes ambientales o los compuestos químicos de síntesis. El vertiginoso desarrollo de la industria química en las últimas décadas ha hecho aumentar de forma excepcional el número de estos compuestos con el correspondiente aumento del riesgo de contacto con los mismos. Algunas estimaciones elevan a varios miles el número de moléculas nuevas introducidas cada año y que engrosan la ya larga lista de xenobióticos.

Estos compuestos pueden acceder a nuestro organismo mediante ingestión, inhalación, por vía parenteral o a través de la piel. Entre los mismos se incluyen fármacos, cosméticos, aditivos alimentarios, pesticidas, productos de uso doméstico, derivados de la combustión de carburantes, residuos procedentes de la industria química, etc. Los xenobióticos no son utilizados como nutrientes, por lo que no se incorporan a las rutas bioquímicas del metabolismo intermediario y no son degradados a través de estas vías metabólicas. Se trata, en general, de compuestos de naturaleza lipofílica por lo que pueden atravesar con relativa facilidad las membranas biológicas, acceder al interior de las células y unirse a estructuras celulares de carácter lipofílico. Al mismo tiempo, su eliminación del organismo es dificultosa, dado que la excreción de compuestos no volátiles se realiza a través de fluidos de naturaleza acuosa, principalmente orina. Ante esta situación, los organismos vivos han desarrollado sistemas metabólicos alternativos para acelerar la eliminación de estos compuestos.

Se trata de una serie de enzimas no integrados en las vías del metabolismo energético o intermediario del organismo y cuyos sustratos son los xenobióticos. Su función es la de convertir los

xenobióticos en moléculas más polares, más hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables. El papel de estas enzimas es clave para la supervivencia celular. De no existir tales vías metabólicas, una vez en el interior del organismo los xenobióticos tenderían a acumularse alterando el equilibrio celular, provocando alteraciones funcionales e incluso la muerte celular.

Al conjunto de procesos enzimáticos a los que se ven sometidos los xenobióticos en el organismo tendentes, en general, a su neutralización y eliminación se les conoce como reacciones de biotransformación o de metabolización de xenobióticos. Tradicionalmente estos procesos se han agrupado en dos fases o etapas. En la fase 1 los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y convertidos en productos más hidrosolubles gracias a la aparición de nuevos grupos funcionales de carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo). En la fase 2 los xenobióticos, o los metabolitos generados por las reacciones de la fase 1, se combinan con moléculas endógenas de carácter polar para formar productos de conjugación que son rápidamente excretados. En general, las enzimas de fase 1 son capaces de transformar múltiples sustratos y catalizar reacciones diferentes. Se trata de proteínas catalíticas de naturaleza muy diversa entre las que se incluyen enzimas con actividad monooxigenasa, como el citocromo P-450 o la flavin monooxigenasa, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas) el epóxido hidrolasa o esterasas y amidasas hepáticas y plasmáticas. El citocromo P-450 es sin duda el miembro más destacado de este grupo de enzimas y el que ha sido más ampliamente estudiado.

El citocromo P-450 es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. Todos los P-450's conocidos se nombran siguiendo un criterio común y se agrupan en familias y subfamilias en función de la similitud en la secuencia del ADN que los codifica. Las familias 1, 2, 3 están constituidas por enzimas encargadas de la bio-transformación de xenobióticos. Una de las características más significativas del grupo 3, es su baja especificidad, lo que permite que sean capaces de metabolizar un número casi ilimitado de sustratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis.

Algunos ejemplos de fármacos que se metabolizan principalmente por el CYP-450 3A4, incluyen:

- Inmunosupresores: ciclosporina, tacrolimus, y sirolimus
- Quimioterápicos: ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, etopósido, ifosfamida, paclitaxel, tamoxifeno, tenipósido, vinblastina, vindesina, gefitinib, etc.
- Bloqueantes de los canales de calcio: diltiazem, nifedipino, felodipino, y verapamil.
- Antibióticos macrólidos: eritromicina, telitromicina, y claritromicina
- Azoles antifúngicos: ketoconazol e itraconazol
- Inhibidores de la proteasa: saquinavir e indinavir

La acción de las enzimas puede explicarse en una serie de pasos químicos simples: comienza atrapándose el sustrato al Citocromo férrico (Fe^{3+}), un electrón es transferido al átomo Fe, pasando éste a su estado ferroso (Fe^{2+}), esta transferencia es a veces realizada por proteína Citocromo b5. Esta forma ferrosa se une a una molécula de O_2 . Se realiza una segunda reducción agregándose un electrón y además un protón. Este intermediario pierde una molécula de agua dejando un complejo $(\text{FeO})^{3+}$ que directamente oxida el sustrato. El mecanismo se resume en la siguiente figura (Fig. 4).

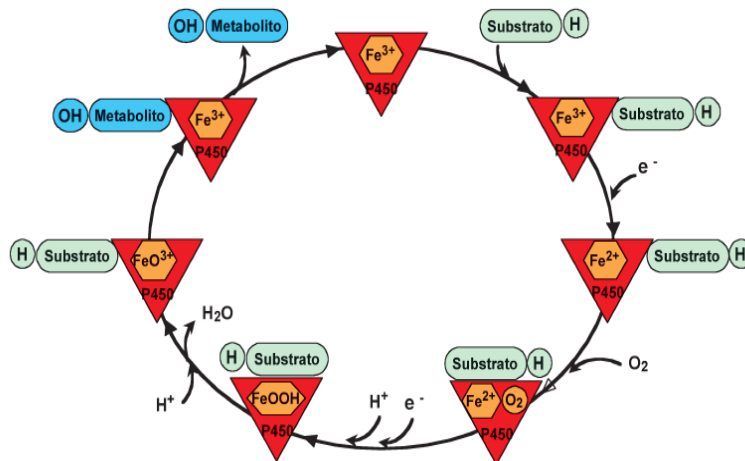


Fig.4 Ciclo del citocromo P-450

El desperfecto de cualquiera de estos pasos puede conducir a la inhibición de la actividad de la mono-oxigenasa. Dependiendo de la interacción entre el inhibidor y la enzima y los pasos particulares en el ciclo catalítico que están bloqueados, tal inhibición puede ser reversible (competitiva, no competitivo, no competitivo, mixto) o irreversible. Por ejemplo, dos sustratos alternativos para la misma enzima muestran inhibición competitiva. La relevancia clínica de este tipo de competencia en materia de medicamentos en los seres humanos depende de las afinidades relativas de las enzimas de los dos compuestos, las concentraciones alcanzadas en el sitio activo después de dosis terapéuticas, el papel del citocromo P450 en la eliminación total de los dos compuestos, y el índice terapéutico. En general, sin embargo, el más potente y / o inhibición selectiva del citocromo P450 se basan en un modo adicional de interacción con la enzima.

El mecanismo de la inhibición de los derivados de metilendioxi-benceno es que los compuestos actúan mediante la formación de un complejo metabólico-citocromo P-450. El intermedio metabólico implicado en la formación de complejos se realiza en dos pasos, el del carbono de metileno a un y la formación del complejo. El complejo, una vez formado es bastante estable, pero no implican la unión covalente a, o destrucción del citocromo P450.

El mecanismo de la inhibición causada por dillapiol y derivados puede incluir lo siguiente:

1. Formación de complejos con metabolitos P450 por el grupo metilendioxibenceno.
2. Inactivación auto catalítica de olefinas (doble enlace terminal).

El metilendioxibenceno se convierte en metabolitos (posiblemente carbenos) que forman un complejo con las formas ferrosa y férrica de los citocromos. El complejo con la forma férrica es disociable por compuestos lipofílicos, reactivando la actividad de la mono-oxigenasa.

2. Dillapiol y derivados

La Tabla. 1 mostró las estructuras de dillapiol y sus derivados, los componentes principales del eneldo. Las estructuras fueron dibujadas usando el programa Chem-Draw basado en el conjunto de datos proporcionados por nuestros colaboradores de la Universidad de Ottawa, Canadá. De la hoja estructuras, podemos observar que todos los productos químicos comparte el grupo metilendioxibenceno.

3. Importancia

La relación QSAR generada a partir de este modelo será útil para predecir las propiedades físicas, químicas y biológicas de las moléculas. Se puede utilizar para desarrollar un modelo tipo filtro para ciertos productos químicos que poseen efecto inhibitorio al CYP 450 3A4.

Esta relación también se puede utilizar para modificar moléculas y lograr propiedades físicas, químicas y biológicas específicas. Debido a que el dillapiol y sus derivados han sido utilizados como sinergista de insecticidas, podemos utilizar la relación encontrada para optimizar el sinergista y hacerlos más potentes. Será de gran valor en la optimización de su diseño, modificación y procesamiento. Tanto el tiempo y el coste de la síntesis se pueden acortar si las propiedades de las moléculas se predicen con precisión antes de su síntesis.

B. MÉTODOS

1. Building training set

Basados en el fragmento que se encontró en la base de datos *Cambridge Structure Database* (CSD), las moléculas de dillapiol y derivados se construyeron utilizando longitudes de enlace y ángulos similares. La razón principal por la que utiliza CSD es que, dada la minimización de energía tienden a dar un mínimo local en lugar de mínimo global, siempre es mejor empezar con estructura de alta calidad que se asemejen a la estructura cristalina tanto como sea posible.

Se uso la molécula #1 como base de construcción para las demás moléculas, se llevo a cabo un extenso análisis conformacional, obteniendo la estructura con menor minimización energética. No se llevaron a cabo más minimizaciones con el resto de componentes, sin embargo en cada caso se

demonstró que las conformaciones propuestas fueron correctas. La conformación de energía más baja de la molécula # 1 (ver Fig. 5) se utilizó luego para construir las otras estructuras.

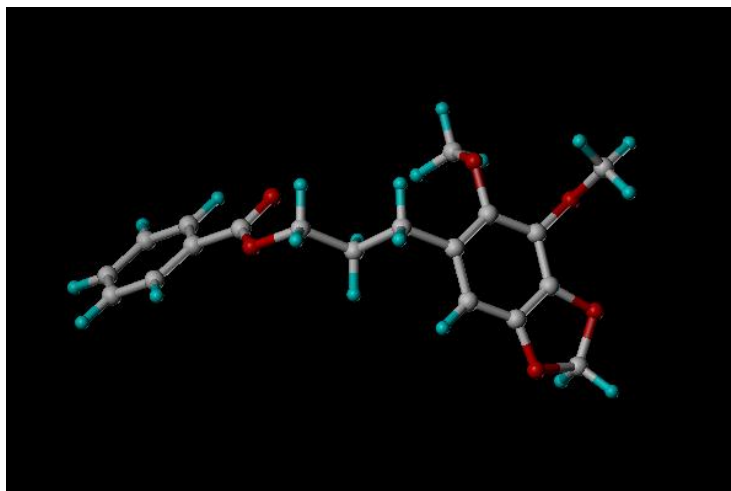


Fig.5 Conformación de la molécula # 1 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

Mantuvimos la conformación de la molécula base, y realizamos una minimización parcial usando mecánica molecular solo a la parte modificada de la molécula. Con esto, mantenemos la conformación mínima del fragmento común del set de moléculas. Esto nos ayuda a realizar con mayor facilidad y rapidez la posterior alineación de las moléculas, y por otro lado, ahorramos tiempo al ejecutar minimizaciones parciales que globales. Una vez que tenemos moléculas minimizadas, podemos construir a partir de las mismas las demás, modificando o añadiendo grupos funcionales y minimizándolos.

El set de moléculas, en su conformación mínima se muestra en las figuras. (Fig.6-Fig. 15)

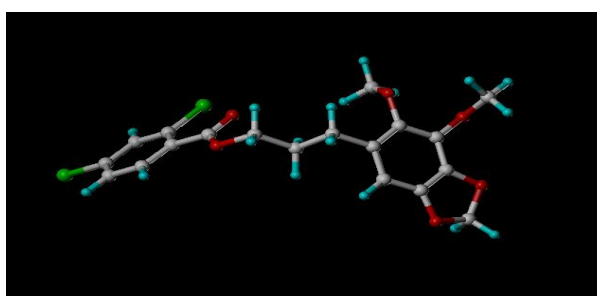


Fig.6 Conformación de la molécula # 2 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

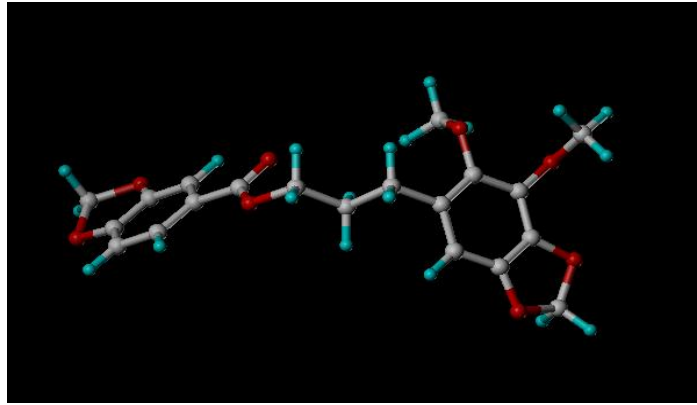


Fig.7 Conformación de la molécula # 3 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

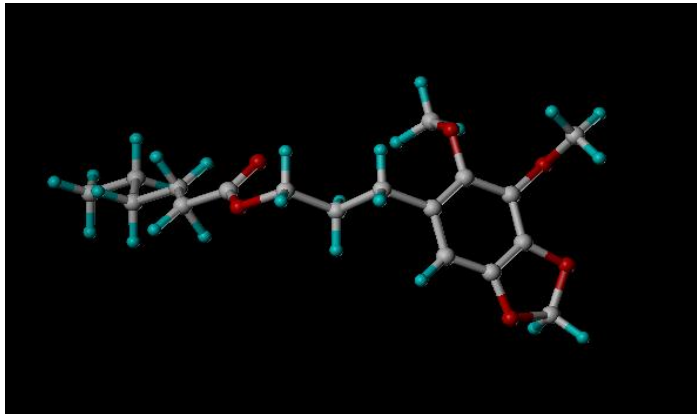


Fig.8 Conformación de la molécula # 4 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

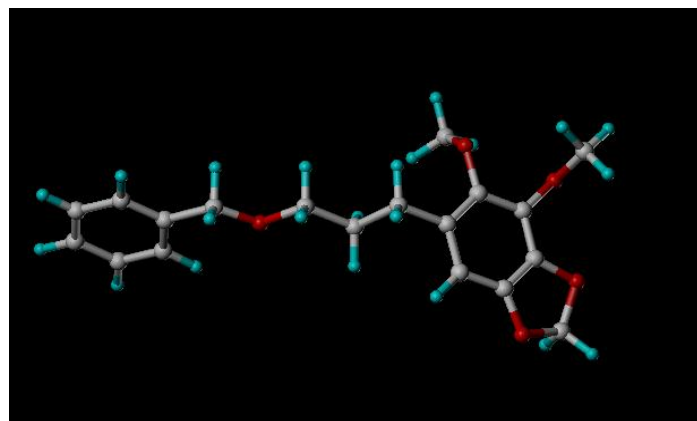


Fig.9 Conformación de la molécula # 5 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

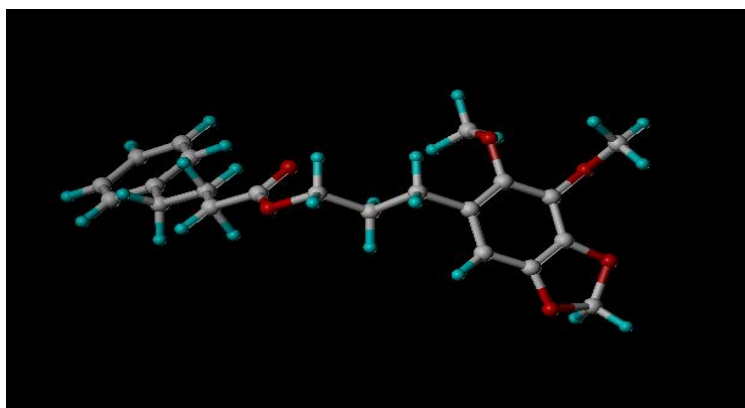


Fig.10 Conformación de la molécula # 6 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

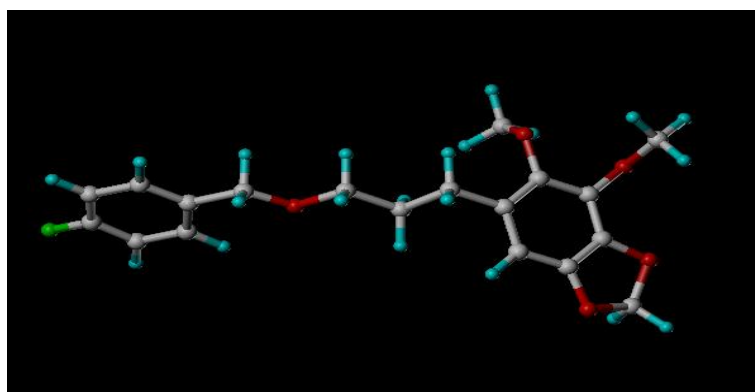


Fig.11 Conformación de la molécula # 7 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

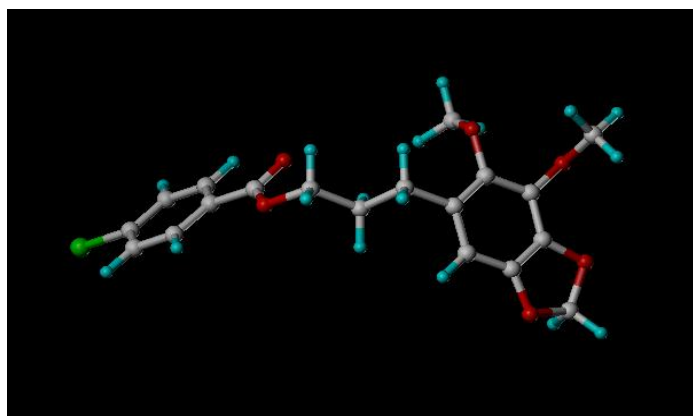


Fig.12 Conformación de la molécula # 8 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

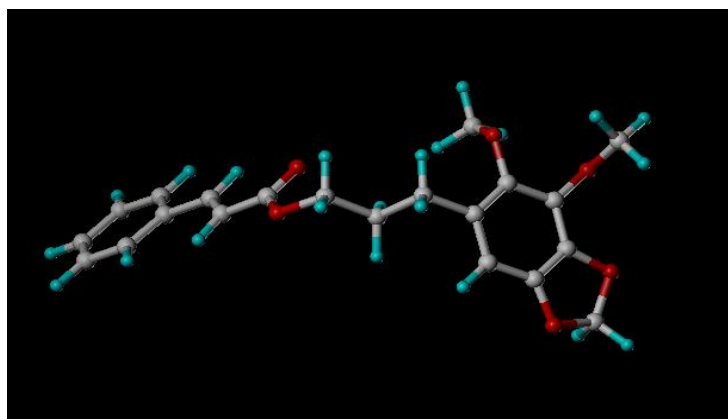


Fig.13 Conformación de la molécula # 9 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

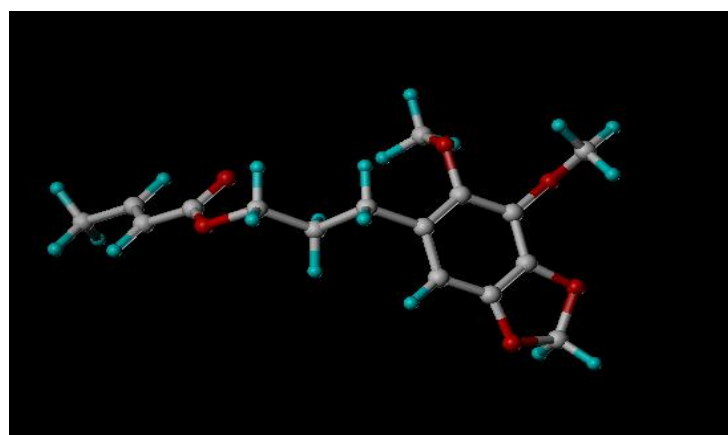


Fig.14 Conformación de la molécula # 11 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

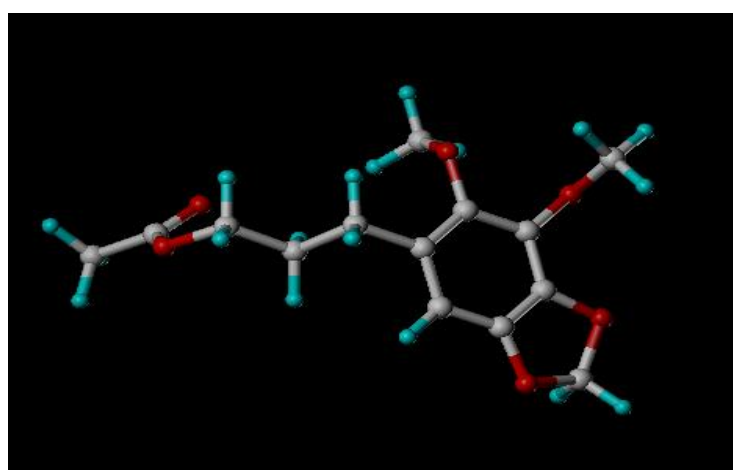


Fig.15 Conformación de la molécula # 12 con la menor energía de minimización

Fuente: La autora

2. Actividad biológica de dillapiol y derivados

La actividad inhibitoria del grupo de moléculas se expresa como la inhibición del citocromo P450. Se analizaron diluciones seriadas de los compuestos, a través de fluorescencia de alto rendimiento.

Los ensayos de inhibición enzimática fueron realizados con la isoenzima CYP3A4 (*BD Bioscience, Bedford, MA, USA*). El método usado fue descrito por Foster (2001). Este método también puede emplearse con las isoenzimas CYP19 y CYP2C19. Las muestras fueron preparadas previamente, y fueron evaluadas en las 3 semanas subsiguientes.

Se trabajó con 11 diferentes moléculas sintetizadas a partir de dillapiol. Las muestras fueron incubadas bajo la presencia del sustrato fluorescente DFT (dibenzylflorescein, 0.2 mmol L⁻¹). El porcentaje de inhibición de cada muestra se determinó en relación con el metabolismo de las mismas, con un porcentaje mayor o igual al 55%. Como control positivo se usó Ketoconazol (1 µg/ml, 2 µl por plato de lectura). Las lecturas fueron realizadas con un equipo (*Cytofluor 4000 Fluorescence Measurement System plate reader*) propio para lecturas de fluorescencia, con una excitación 485/20 y emisión de 535/25 y 50 de ganancia. (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

Todas las soluciones fueron preparadas en tubos centrífugos de plásticos de 1.5 ml. Los ensayos fueron realizados en platos de micro titulación -96 (*Corning Costar Brand, VWR, Mississauga, Ontario, Canadá*). Para realizar los ensayos, se prepararon los siguientes reactivos: solución tampón de fosfato de potasio al 0.5 M, pH 7.4, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (*Sigma, St.Louis, MD, USA*), 15 mg/ml de solución tampón de fosfato de potasio, y 10 mg de Ketoconazol/ml en metanol.

En cada hoyo de los platos de micro titulación, se añadió 100 µl de solución A [78 µl de solución NADPH + 1222 µl de agua destilada]; 90 µl de solución B [196 µl agua destilada + 1036 µl del solución de fosfato de potasio al 0.5M (pH 7.4) + 14 µl enzima + 14 µl DFT] o 90 µl de solución C [196 µl agua destilada + 1036 µl del solución de fosfato de potasio al 0.5M (pH 7.4) + 14 µl enzima desnaturalizada + 14 µl DFT]; 6 µl de agua destilada y 10 µl de las muestras. El control positivo fue preparado de manera similar, a excepción de que se incrementó el agua destilada a 8 µl y las soluciones de control fueron de 2 µl (metanol o ketoconazol).

Cada ensayo se realizó reduciendo al máximo la exposición de NADPH a la luz natural y fluorescente. Cada muestra se realizó por triplicado. La incubación se realizó a 37 ° C durante 20 minutos., las lecturas se registraron en los diferentes tiempos t= 0, 10, 20, 30 y 40 minutos.

Se observó que los compuestos presentaron una actividad inhibitoria IC₅₀ en un rango relativamente pequeño.

Tabla 2. Inhibición de dillapiol y derivados IC₅₀

COMPUESTO	PESO MOLECULAR (gr/mol)	IC ₅₀ (µg/mL)	PIC ₅₀ ⁴	CLOGP ⁵
01	344.36	0.0725	5.6766	4.1388
02	412.25	0.0590	5.8443	5.1248
03	388.37	1.02	5.5806	4.3248
04	338.17	1.1	5.4877	4.3258
05	330.37	2.2	5.1765	3.8278
06	386.44	1.6	5.3829	4.6858
07	348.33	3.6	4.9856	3.9708
08	378.80	0.59	5.8075	4.8518
09	370.40	0.88	5.6241	4.4928
11	322.35	0.50	5.8093	3.3538
12	282.11	2.6	5.0354	2.2098

Fuente: La autora

3. Alineación de dillapiol y derivados

Quizás entre los pasos más importantes para obtener un modelo molecular adecuado, están los ensayos biológicos, la obtención de estructuras y la alineación de los compuestos. Un buen alineamiento es un requisito indispensable para comparar cada elemento y/o grupo químico de las moléculas. En CoMFA es indispensable que las moléculas se alineen, para poder hacer comparaciones en la estructura y detectar si la misma influye sobre la actividad biológica, y así incrementar significativamente el r^2 en el modelo y explicar la relación estructura-actividad.

La alineación de las moléculas se logró mediante alineación manual en SYBYL. La plantilla que se uso para alinear esta base de datos se muestra en la figura siguiente. (Fig. 16)

⁴ Logaritmo negativo IC₅₀

⁵ CLOGP calculado usando SYBYL

Se tomaron los siguientes átomos: los 4 átomos de oxígeno que rodean el anillo aromático (metilendioxi-benceno) y los 2 carbonos subsecuentes al anillo, además del anillo.

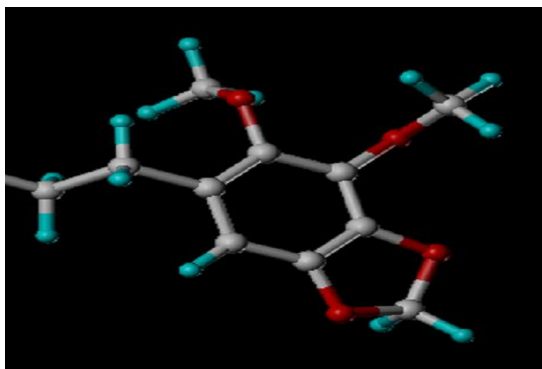


Fig.16 Plantilla para alinear la base de datos

Fuente: La autora

Se contraponen los átomos comunes, y la molécula toma la posición de la de referencia. El grupo de moléculas alineadas se muestra en la siguiente figura.

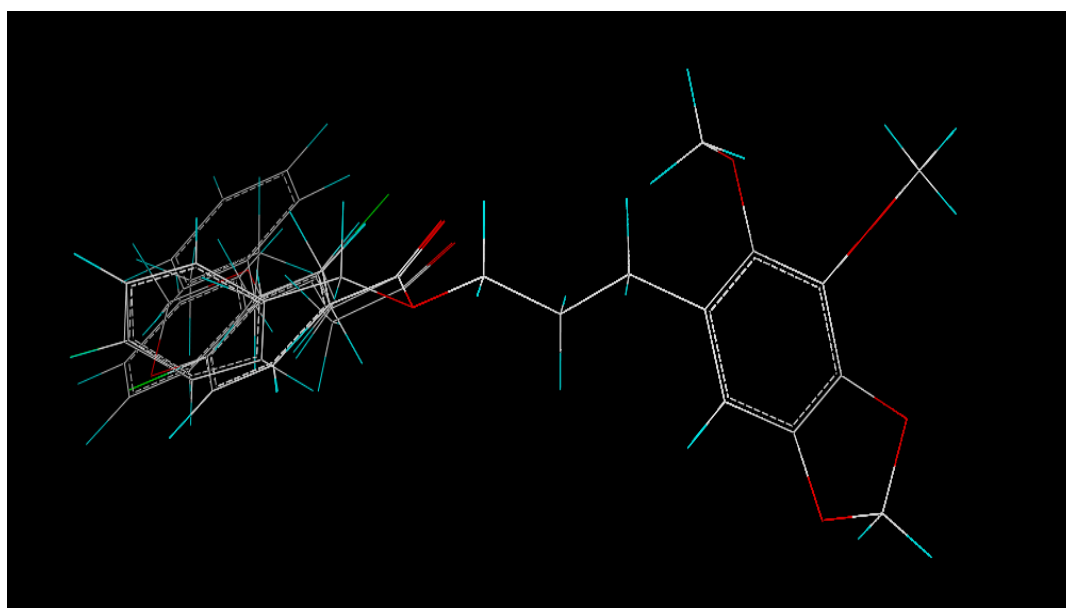


Fig.17.Set de moléculas alineadas

Fuente: La autora

4. Determinación de cargas

Las conformaciones minimizadas y las cargas son calculadas usando el funcional (Teoría del Funcional de la Densidad) DFT dentro de la aproximación B3LYP en código Gaussian 03. La base usada para representar las funciones es 6-311G. Los cálculos realizados se encuentran en el Anexo 1.

5. Coeficientes de partición

Los coeficientes de partición o reparto (LOGP) fueron calculados con SYBYL-X1.3. El método más simple para predecir $LogP$ consiste en parametrizar las contribuciones de varios átomos al coeficiente de partición molecular global. Usando ajuste por mínimos cuadrados limitado a un conjunto de compuestos de entrenamiento con coeficientes de partición medidos experimentalmente. Para obtener correlaciones razonables, los elementos químicos más frecuentes contenidos en las moléculas de fármaco (H, C, O, S, N, F, Cl, Br, I) se dividen en varios tipos de átomos diferentes dependiendo del entorno del átomo dentro de la molécula. La ventaja de este método es que es el más general, siendo capaz de suministrar al menos una estimación aproximada para un amplio conjunto de moléculas.

6. CoMFA

El análisis CoMFA fue realizado en el programa SYBYL-X1.3, usando los métodos para QSAR-CoMFA. Como variables se usan las fuerzas estéricas y electrostáticas. Las energías estéricas y electrostáticas fueron calculadas, usando SYBYL-X1.3 usando un átomo de carbono de prueba sp^3 hibridizado con una carga positiva +1 y una constante dieléctrica. Las contribuciones sobre las energías estéricas y electrostáticas fueron establecidas a un corte de +/- 30 kcal/mol. Para los campos CoMFA se asignó un mínimo sigma de 2,00 kcal / mol.

7. PLS

Los análisis de regresión se realizaron usando los métodos de PLS en SYBYL-X1.3. Los análisis PLS consisten en 2 pasos, el primero usando *Leave one out* con 10 componentes para hallar el número óptimo de los mismos, y para demostrar la validez del modelo; seguido de un análisis de PLS no cros-validado y usando el número de componentes óptimos para general el análisis CoMFA.

IV. RESULTADOS

A. Análisis de la estructura del grupo de datos

En el siguiente cuadro se muestra los estudios QSAR que se realizaron a cada una de las moléculas de la base de datos.

Tabla 3. Métodos con los que se trato la base de datos.

Dillapiol y derivados	MÉTODO						Alineación
	SYBYL-X1.3		MOPAC		Gaussian		
	Cargas	Geometría	Cargas	Geometría	Cargas	Geometría	
Molécula # 1	+ ⁶	+	+	+	+	- ⁷	+
Molécula # 2	+	+	+	+	+	-	+
Molécula # 3	+	+	+	+	+	-	+
Molécula # 4	+	+	+	+	+	-	+
Molécula # 5	+	+	+	+	+	-	+
Molécula # 6	+	+	+	+	+	-	+
Molécula # 7	+	+	+	+	+	-	+
Molécula # 8	+	+	+	+	+	-	+
Molécula # 9	+	+	+	+	+	-	+
Molécula # 11	+	+	+	+	+	-	+
Molécula # 12	+	+	+	+	+	-	-

Fuente: La autora

Cada estructura fue construida a partir de la base de datos de Cambridge, en una primera instancia se calcularon cargas MOPAC (PM3). Se obtuvo la energía mínima, optimizando la geometría. Se alinearon las moléculas y se calcularon nuevamente cargas en código Gaussian. En cada uno de los pasos, se alineo las moléculas manualmente.

1. Análisis PLS

En el siguiente apartado se resume parte del resultado del estudio CoMFA que se basan en cálculos PM3. Todas las moléculas de la base de datos fueron minimizadas una a una usando

⁶ + Se realizó el método sobre la estructura

⁷ - No se realizó el método sobre la estructura

SYBYL-X1.3. A continuación se usó el método PM3 para calcular las cargas, se leyó nuevamente las moléculas, y se prosiguió con la alineación manual. Finalmente se guardó estos datos en la base de datos “Dillapiol_01”. Después se construyó una nueva hoja de cálculo con el comando *Build New Molecular Spreadsheet*, seleccionando como base de datos “Dillapiol_01”, se guardaron todas las moléculas y se construyó el modelo CoMFA como sigue:

- 1.1 En un primer modelo se incluyó LOGP y la actividad inhibitoria PIC50. Usando como variable dependiente PIC50 (ver Fig. 18). Después de correr el análisis, obtenemos una nueva variable Residue_PIC50, la misma que corresponde a la diferencia del valor de la actividad inhibitoria experimental y predicha.

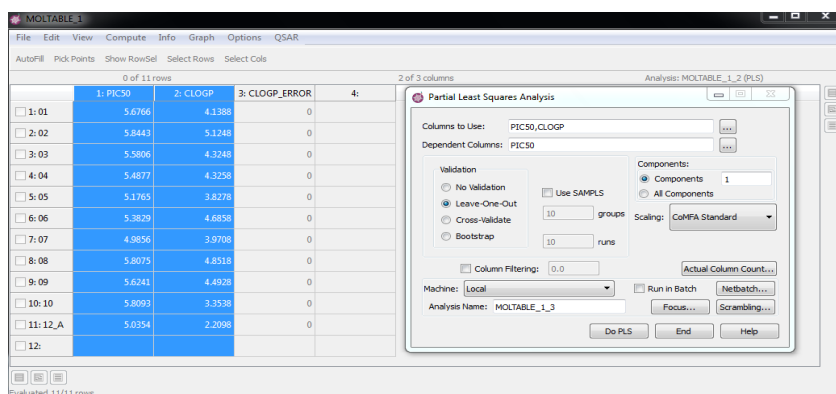


Figura 18. SYBYL-X1.3 Análisis de variables LOGP y PIC50.

Fuente: La autora

- 1.2 Para el modelo “Dillapiol_01” de CoMFA usamos los campos electrostáticos y estéricos como variables independientes (los valores son los mismos), y el Residue_PIC50 obtenido del logaritmo inverso de IC50 como la variable dependiente (ver Fig. 19)

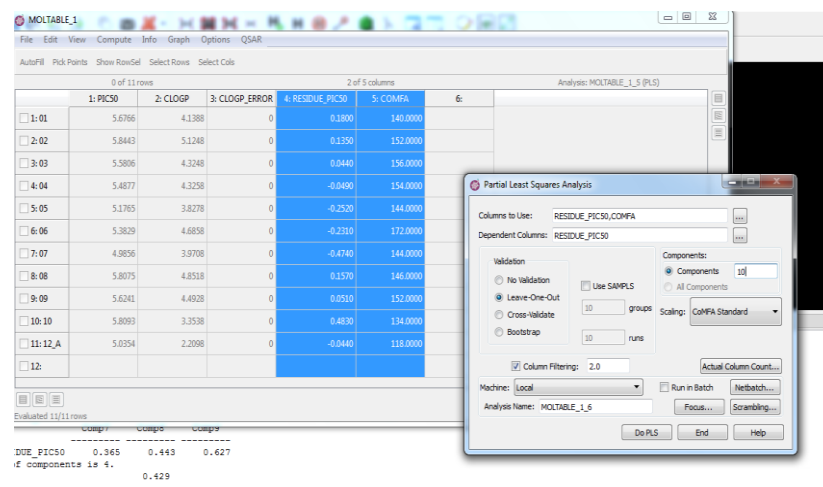


Figura 19. SYBYL-X1.3 Análisis validado PLS.

Fuente: La autora

Después se corrió un análisis cross-validado de PLS, para encontrar el número de componentes óptimo de 4 y un q^2 de 0.429 (ver Fig. 20)

```

Summary output
Standard Error of Predictions (Crossvalidated)
Run #          Comp1      Comp2      Comp3      Comp4      Comp5      Comp6
-----
  1  4 RESIDUE_PIC50    0.238    0.233    0.234    0.250    0.278    0.315
Run #          Comp7      Comp8      Comp9
-----
  1  4 RESIDUE_PIC50    0.365    0.443    0.627
Optimum # of components is 4.
R squared                      0.429

```

Figura 20. Número óptimo de componentes

Fuente: La autora

Un análisis de este tipo en el que su q^2 se acerque a 0.5, va a generar un r^2 más alto para el caso de análisis no validado. Cuando usamos el número de componentes óptimo obtenemos, un error de predicción bajo de 0.047, un r^2 de 0.980 (ver Fig. 21) y un valor de F de 74.032. De acuerdo a este modelo CoMFA los campos electrostáticos contribuyen con un 42,6 % sobre la actividad inhibitoria, mientras que los campos electrostáticos con un 57.4 %.

```

Relative Contributions
#          Norm.Coeff.  Fraction
-----
  1 COMFA (960 vars) (Steric)          1.080    0.426
  2 COMFA (960 vars) (Electrostatic)   1.455    0.574

Summary output
Standard Error of Estimate          0.047
R squared                          0.980
F values      ( n1= 4, n2= 6 )    74.032
Prob.of R2=0 ( n1= 4, n2= 6 )    0.000

```

Figura 21. Resumen de resultados obtenidos en CoMFA

Fuente: La autora

En las siguientes figuras (Fig.22-Fig.32) se muestra las moléculas con su resultado CoMFA y su posición de referencia dentro del modelo.

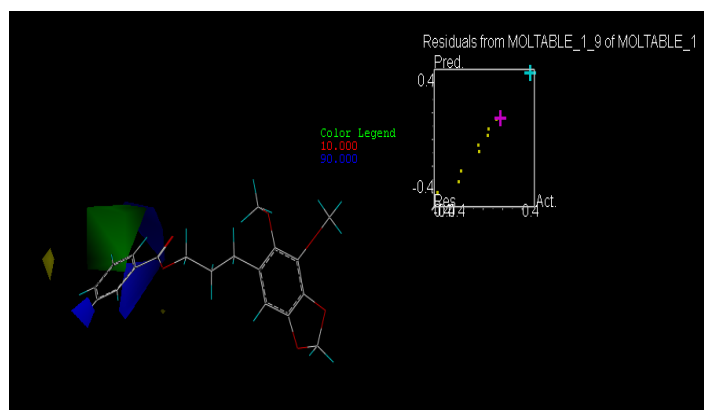


Figura 22. Molécula # 1 en CoMFA

Fuente: La autora

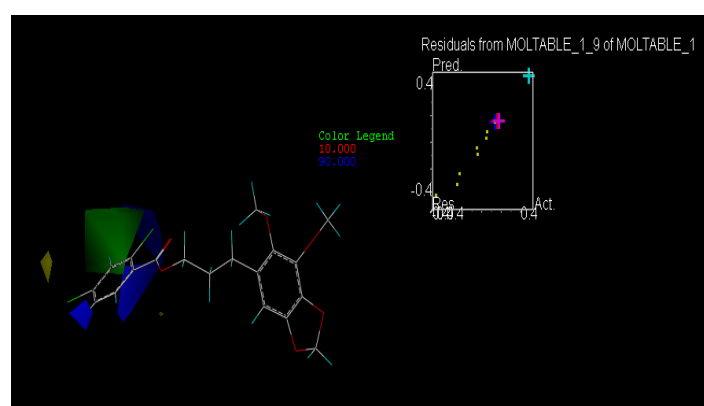


Figura 23. Molécula # 2 en CoMFA

Fuente: La autora

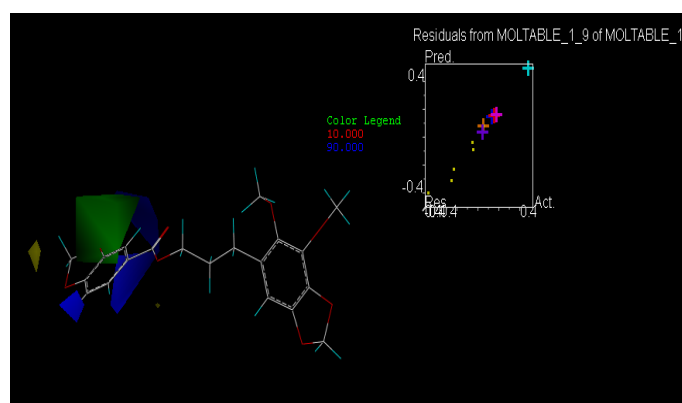


Figura 24. Molécula # 3 en CoMFA

Fuente: La autora

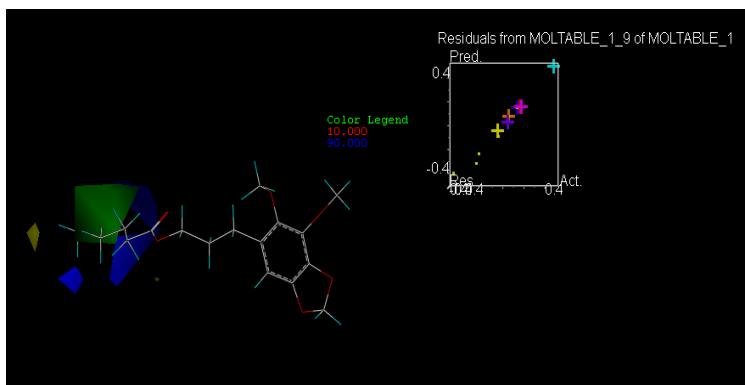


Figura 25. Molécula # 4 en CoMFA

Fuente: La autora

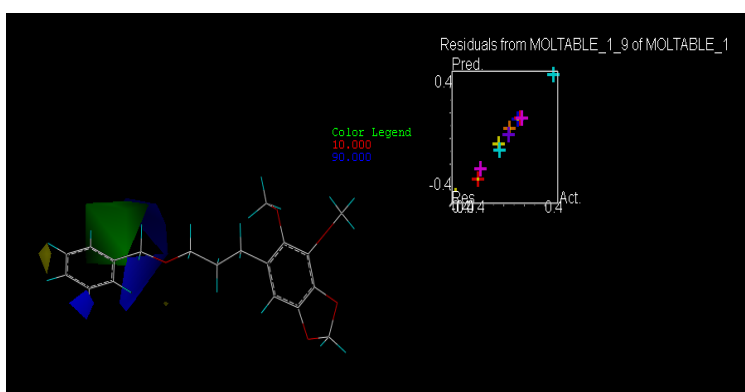


Figura 26. Molécula # 5 en CoMFA

Fuente: La autora

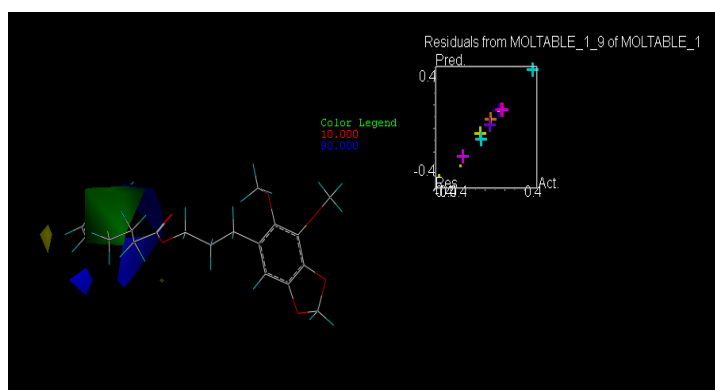


Figura 27. Molécula # 6 en CoMFA

Fuente: La autora

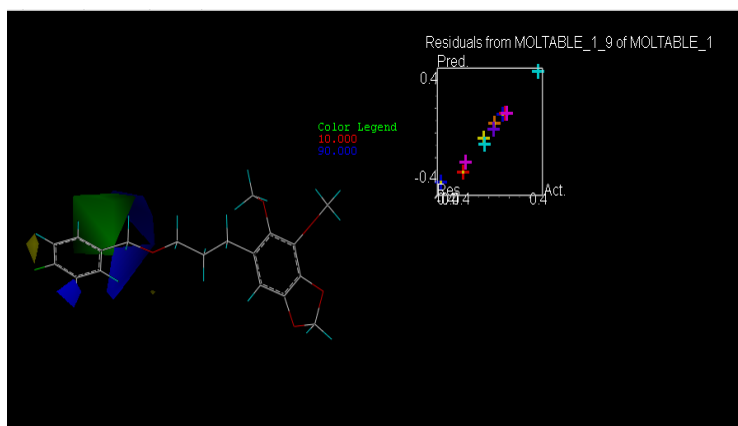


Figura 28. Molécula # 7 en CoMFA

Fuente: La autora

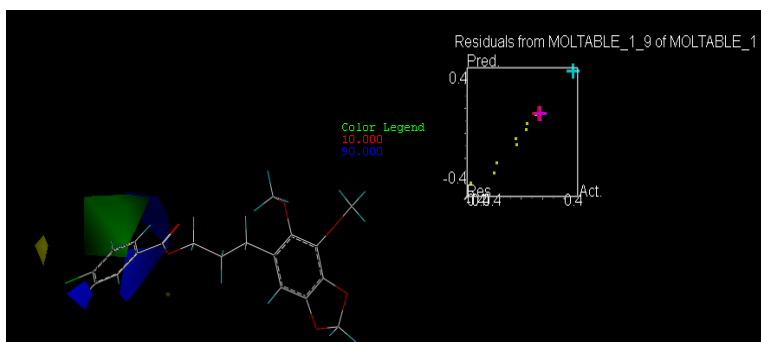


Figura 29. Molécula # 8 en CoMFA

Fuente: La autora

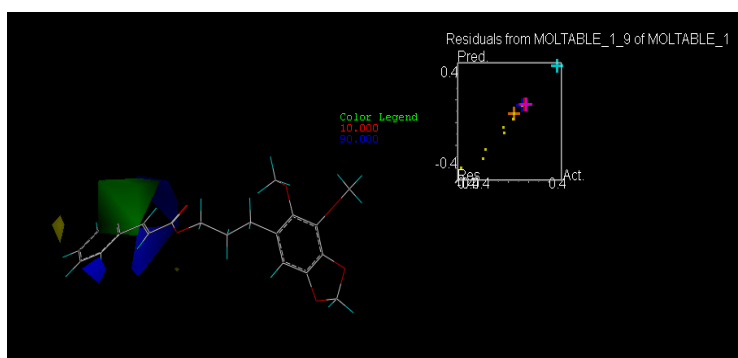


Figura 30. Molécula # 9 en CoMFA

Fuente: La autora

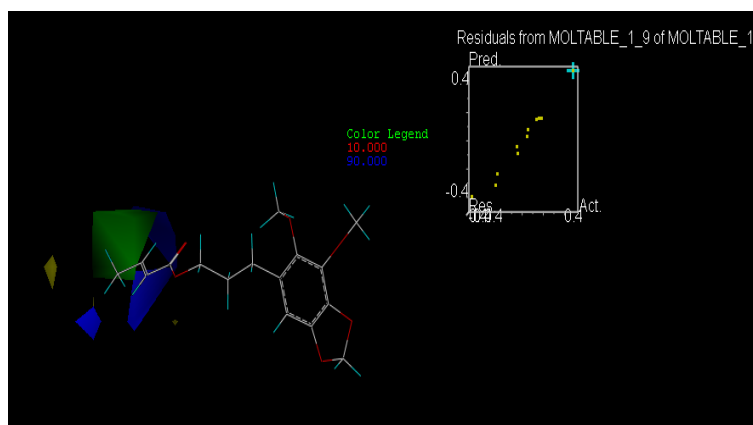


Figura 31. Molécula # 11 en CoMFA

Fuente: La autora

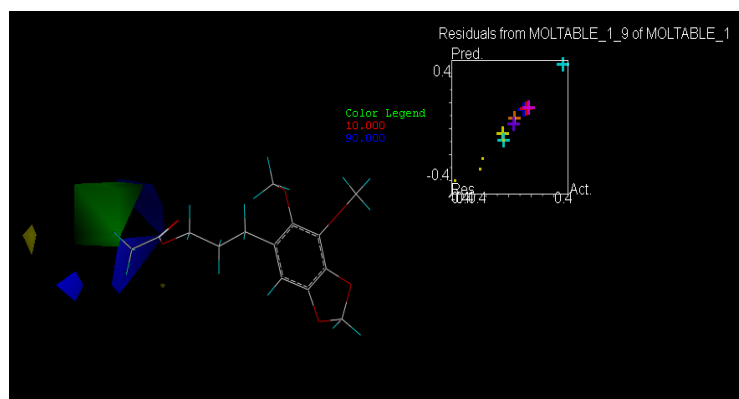


Figura 32. Molécula # 12 en CoMFA

Fuente: La autora

2. Análisis PLS con cálculos Gaussian

Basados en los resultados de Gaussian, se realizó nuevamente un análisis CoMFA. Todas las moléculas usadas en la base de datos fue minimizada previamente, por lo tanto solo se cambiaron los valores de las cargas en las mismas. Se alineó manualmente uno a uno los componentes de la base de datos. Se creó una nueva base de datos llamada DILLAPIOL. Se construyó una nueva hoja de cálculo, como sigue:

1. Para el presente modelo, se utilizó los campos electrostáticos y estéricos como variables independientes, y el logaritmo de la inversa de IC₅₀ como variable dependiente, a continuación se ejecutó validación cruzada PLS de análisis, y se encontró como óptimo un número de 7 componentes (Fig. 33), y un q^2 de 0.658. Cuando usamos el número de componentes óptimo obtenemos, un error de predicción bajo de 0.087, un r^2 de 0.965 (ver Fig.

34) y un valor de F de 11.893. De acuerdo a este modelo CoMFA los campos electrostáticos contribuyen con un 62.7 % sobre la actividad inhibitoria, mientras que los campos electrostáticos con un 37.3 %.

```
Optimum # of components is 7.  
R squared                0.658  
□
```

Fig. 33 Número óptimo de componentes

```
Summary output  
Standard Error of Estimate    0.087  
R squared                    0.965  
F values    ( n1= 7, n2= 3 )  11.893  
Prob.of R2=0 ( n1= 7, n2= 3 )  0.033  
□
```

Fig. 34 Resumen de datos de salida

B. ANÁLISIS GENERAL

Los estudios QSAR nos resultan útiles para proponer la síntesis química a partir de los compuestos existentes, o con estructura similar y/o adición de un nuevo grupo químico mediante simulación usando el software SYBYL-X1.3. De ahí la importancia de obtener un buen modelo, que nos permite predecir la actividad biológica de la molécula propuesta. Entre las estructuras del grupo de Dillapiol y sus derivados, se busca uno con actividad biológica alta, además de conocer porque esa estructura la hace más activa que otras. El objetivo es proponer un sinergista de insecticidas, que por el hecho de ser natural, causa menos impacto a la naturaleza.

Comparando los resultados obtenidos, podemos señalar que existe una estrecha relación entre la estructura y la actividad biológica del grupo de moléculas estudiadas, además que obtuvimos predicciones de actividad con un mínimo error (Fig. 35) es decir el modelo puede ser usado para predecir la actividad de otras moléculas.

Características estructurales que incrementan la bioactividad

De acuerdo a la actividad biológica experimental, sabemos que dentro del set de moléculas las más activas son los compuestos 02, 08 y 11. A primera instancia estas moléculas no parecen similares y es difícil ver el patrón que las hace activas. Por ejemplo las moléculas 2 y 8 tienen un anillo aromático en la cadena, y la molécula 11 tiene una cadena más corta. Aunque la molécula 2 y 8 tienen un anillo aromático, la diferencia radica en la posición de los cloros. Sin embargo cuando analizamos estas moléculas en relación a los contornos de CoMFA, la razón para la máxima potencia es evidente,

cuando consideramos que la cadena esta interaccionando estéricamente con la región verde. Esto se ilustra en la figura 35.

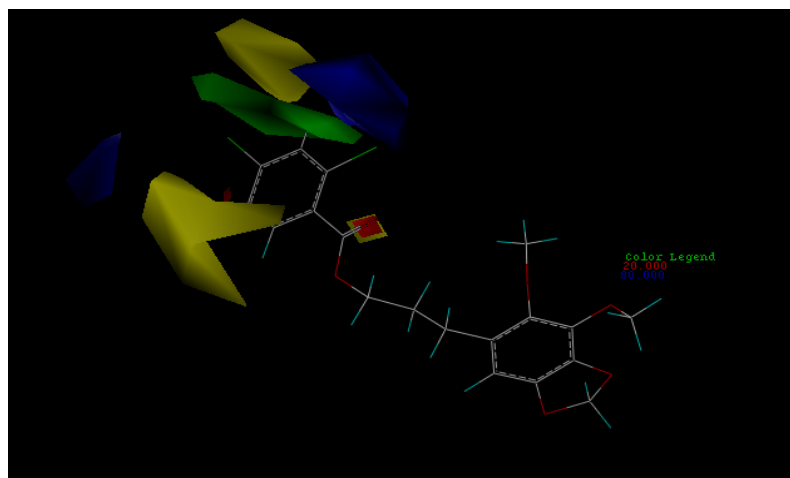


Fig. 35 Características estructurales que incrementan la actividad⁸

Fuente: La autora

Características estructurales que disminuyen la bioactividad

De acuerdo a la actividad experimental, sabemos que las moléculas menos activas son los compuestos 05, 07 y 12. Nuevamente el análisis de los contornos de CoMFA nos permite entender porque estas moléculas son menos activas. Como podemos ver en las figuras 36, 37 y 38 aunque estas moléculas tienen un anillo aromático al final de la cadena el anillo esta interaccionando con el contorno amarillo, que indica que en esa parte del receptor existe una zona de impedimento estérico.

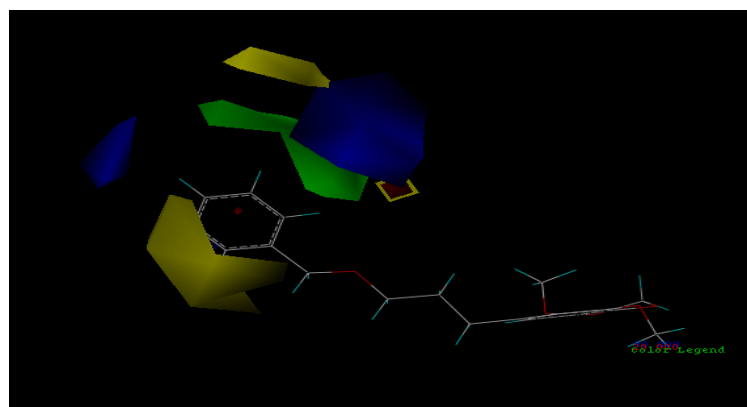


Fig. 36 CoMFA molécula 05.

Fuente: La autora

⁸ Los colores mostrados en las Fig. 35- Fig.38, simbolizan lo siguiente. Verde: mayor impedimento estérico, amarillo: menor impedimento estérico y azul: electronegatividad.

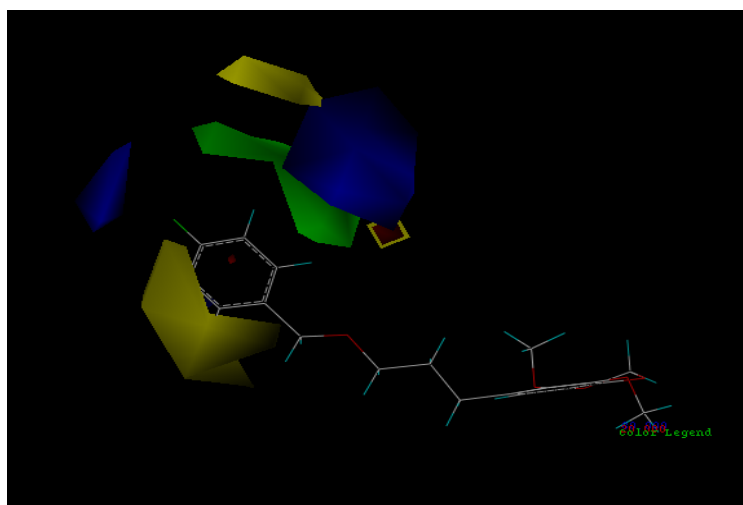


Fig. 37 CoMFA molécula 07.

Fuente: La autora



Fig. 38 CoMFA molécula 12.

Fuente: La autora

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A. CONCLUSIONES

El CYP3A4 interviene en la oxidación de numerosos fármacos y toxinas en el intestino y el hígado, y su inhibición puede producir interacciones farmacocinéticas al alterar el metabolismo de drogas con graves implicaciones clínicas. Sabemos que el dillapiol, es un potente inhibidor de esta enzima. En este trabajo hemos investigado las relaciones entre estructura y actividad de un grupo de 11 derivados de dillapiol utilizando QSAR, análisis 3D-QSAR y CoMFA. Estos análisis indicaron que la actividad se correlaciona con el volumen estérico de los sustituyentes y sus propiedades electrostáticas en un patrón característico determinado por el análisis de CoMFA (ver Fig. 35).

B. RECOMENDACIONES

Las pruebas en el laboratorio deben ser reproducidas por el mismo ensayista además que se debe seguir el protocolo, reduciendo así error en los resultados.

Para desarrollar un buen modelo es necesario contar con datos experimentales en un amplio rango de valores. Además es recomendable usar en SYBYL-X1.3 bases de estructuras obtenidas por cristalografía o a partir de estas construir las demás, para asemejar las estructuras lo más posible a la realidad.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Anonymous, *Drugs & Therapy Perspectives*, 2001, 17(6)
2. Budzinski, J.W., Foster, B.C., Vandenhoeck S., and Arnason, J.T., An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures, *Phytomedicine*, 2000; Vol. 7(4), 273-282.
3. Clark, T., *A handbook of computational chemistry: A practical guide to chemical structure and energy calculations*. John Wiley & son, Inc, 1985.
4. Cramer, III, R. D., Wold S.B. *Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)*. United States Patent 5, 025, 388, June, 18, 1991
5. Cramer, III, R.D., Patterson, D.E., Bunce, J. D., *Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)*. 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988; 110:5959-5967.
6. Cramer, III, R.D., Milne, M. 1979. The lattice model: A general paradigm for shape-related structure/ activity correlation, *Abstracts of Papers of the Am. Chem. Soc. Meeting*, April 1979, Computer Chemistry Section, no.44.
7. Cheng, F.; Yu, Y.; Shen, J.; Yang, L.; Li, W.; Liu, G.; Lee, P. W.; Tang, Y., *Classification of Cytochrome P450 Inhibitors and Noninhibitors Using Combined Classifiers*. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2011, 51 (5), 996-1011.
8. Choi, I.; Kim, S. Y.; Kim, H.; Kang, N. S.; Bae, M. A.; Yoo, S. E.; Jung, J.; No, K. T., *Classification models for CYP450 3A4 inhibitors and non-inhibitors*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009, 44 (6), 2354-2360.
9. Dagliyan, O.; Kavakli, I. H.; Turkay, M., *Classification of Cytochrome P450 Inhibitors with Respect to Binding Free Energy and pIC(50) Using Common Molecular Descriptors*. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2009, 49 (10), 2403-2411.
10. Dresser, G.K., Spence, J.D., and Bailey D.G. *Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition*, 2000; 38 (1), 41-57
11. Gomez, D.Y., Wachter V.J., Tomlanovich S.J., *The effects of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine*, 1995; 58: 15-9
12. Halpert J.R., *Structural Basis of selective cytochrome P450 inhibition*, *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.* 1995; 35: 29-53.
13. Hollenberg, P. F., *Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes*. *Drug Metabolism Reviews* 2002, 34 (1-2), 17-35.
14. Mishra, N. K., *Computational modeling of P450s for toxicity prediction*. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2011, 7 (10), 1211-1231.
15. Roy, K.; Roy, P. P., *QSAR of cytochrome inhibitors*. 2009, 5 (10), 1245-1266.
16. Tam, T. W.; Liu, R.; Arnason, J. T.; Krantis, A.; Staines, W. A.; Haddad, P. S.; Foster, B. C., *Actions of ethnobotanically selected Cree anti-diabetic plants on human cytochrome P450*

- isoforms and flavin-containing monooxygenase 3. *Journal of Ethnopharmacology* 2009, 126 (1), 119-126.
17. Vedani, A.; Smiesko, M., *In Silico Toxicology in Drug Discovery - Concepts Based on Three-dimensional Models. Atla-Alternatives to Laboratory Animals* 2009, 37 (5), 477-496.
 18. Waller, C. L, Oprea, T. I., Giolitti, A. M. and Garland R., Three-dimensional QSAR of human immunodeficiency virus (I) protease inhibitors. 1. A CoMFA study employing experimentally-determined alignment rules, 1993; 36: 4152-4160.
 19. Watkins, P.B., Role of cytochrome P450 in drug metabolism and hepatotoxicity, 1990; 10: 235-50.

ANEXOS



TITULACIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA

**COMFA ANALYSIS OF THE INHIBITION OF CYTOCHROME CYP 450 3A4 BY
DILLAPIOL AND ITS DERIVATES,**

**Nathalie Pineda¹, A. Francis Carballo², S. Liu², R.Lilin², J. Thor Arnason², Tony Durst²,
César M. Compadre³**

¹*Chemistry Engineering School, Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano s/n,
Postal Code 11-01-608, Loja-Ecuador.
e-mail:enpinedax@utpl.edu.ec*

²*Biology Department, Ottawa University, Ottawa, Ontario, Canadá.*

³*Pharmaceutical Sciences, University of Arkansas for Medical Sciences, 72205 North University
Av. Little Rock, Arkansas, USA
e-mail:CompadreCesarM@uams.edu*

Abstract:

Enzyme inhibition assays were used to identify the inhibitory effect of some previously isolated and synthesized dillapiol molecules against the human cytochrome CYP 450 3A4.

Using these information and other descriptors we develop a molecular model using 3-D quantitative structure-activity relationship. This model was used to understand the structural factors that determine the degree of inhibition of CYP 450 3A4 that this type of compounds may produce.

Keywords: CYP 450 3A4, dillapiol, PLS, QSAR, CoMFA.

I. INTRODUCTION

A large number of the world population relies on their knowledge of traditional medicine in order to meet their primary health needs. (1) Although conventional medicine progress, for social, cultural and economic reasons many communities continue using ancestral medicine. In other

cases and more frequently, many individuals combine conventional and traditional medicine as complementary or alternative therapies. For these reasons there is a potential of adverse effects on the human body, due to the interaction between drug and herbs. For example many of the phytochemicals isolated from natural products have a significant influence on the



TITULACIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA

disposition of drugs in the body, altering its activity, absorption, distribution and excretion. (3).

Pharmaceutical drugs, xenobiotics, as well as endogenous products are metabolized by a variety of cytochrome P450s (CYPs) that are widely distributed in the body. CYPs consist of numerous enzymes that have diverse metabolic roles and substrate specificities, each of which have a distinct effect on the rate of absorption and bioavailability of pharmaceutical drugs in the body.

Thus, there is potential for drugs interactions with each other. For example, a drug inhibits the enzyme that degrades a second drug, in the presence of both the blood levels increase and, subsequently, there could happen an overdose. On the other hand, if a drug induces the metabolism, the concentrations of the other drug could be under the therapeutic levels. This leads us to need a full knowledge of the enzymes involved in metabolism of drugs

However, not only the drugs are being studied in relation to the interactions, also natural products, could produce this interactions.

Dillapiol is a component of dill, an herbaceous, aromatic plant, with yellow flowers arranged in umbels, and lanceolate leaves. (Fig.1). There are report of uses of this plant since biblical times; people drink to relieve digestive problems. Its name refers to "calm", referring to its carminative properties.



Fig.1. Anethum graveolens

Source: Dr. Otto Wilhelm Thomé Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 1885, Gera, Germany

QSAR

It has been nearly 40 years since the quantitative structure-activity relationship (QSAR) paradigm first found its way into the practice of agrochemistry, pharmaceutical chemistry, toxicology, and eventually most facets of chemistry (1). Its



TITULACIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA

staying power may be attributed to the strength of its initial postulate that activity was a function of structure as described by electronic attributes, hydrophobicity, and steric properties as well as the rapid and extensive development in methodologies and computational techniques that have ensued to delineate and refine the many variables and approaches that define the paradigm.

We developed a model using SYBYL, and CoMFA contours to found the reason for activity of the molecules in the set. (Table. 1)

II. MATERIALS AND METHODS

P450 enzyme inhibition assays

Enzyme inhibition assays were conducted with CYP3A4 isozyme (BD Bioscience, Bedford, MA, USA). The method described by Foster (2001) was used for the isozyme. All samples were incubated in the presence of an enzyme and the fluorescent substrate dibenzylfluorescein (DBF) (0.2mmol L⁻¹). Percent inhibition of each sample was determined relative to metabolism in the presence of 55% ketoconazole at 1mg/ml in concentration, 2 ml per well, was used as the positive control. The Fluorescence readings were measured by a Cytofluor 4000 Fluorescence Measurement System plate reader (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with excitation and emission at 485=20 and 535=25 with two gains (50 and 57).

All assay solutions were prepared in 1.5-ml plastic centrifuge tubes. The assays were performed on 96-well microtiter plates (Corning Costar Brand, VWR, Mississauga, Ontario, Canada). The following reagents were prepared for the assays: 0.5M potassium phosphate buffer, pH 7.4, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH) (Sigma, St. Louis, MD, USA), 15 mg/ml of 0.5M potassium phosphate buffer, and 10 mg ketoconazole/ml in methanol.

Each plate well contained 100 ml of solution A (78 µl NADPH solution + 1222 µl distilled water); 90 µl of solution B [196 µl distilled water +1036 µl 0.5M potassium phosphate buffer (pH 7.4) +14 ml enzyme, 14 ml DBF], or 90 µl of solution C [196 µl distilled water + 1036 µl 0.5 M, potassium phosphate buffer (pH 7.4) +14 µl denatured enzyme, and 14 µl DBF]; 6 µl distilled water and 2ul of sample. The positive control wells were similarly prepared except that the amount of distilled water was increased to 8 µl and the control solutions were 2 µl methanol or ketoconazole.

Each well was prepared under gold lamps in order to reduce NADPH exposure to natural and fluorescent light. Each sample was tested in triplicate. CYP3A4 assays were incubated for 20 min at 37°C during which fluorescence was recorded at t = 0, 20, and 40 min.

The percent enzyme inhibition was calculated using the following equation:

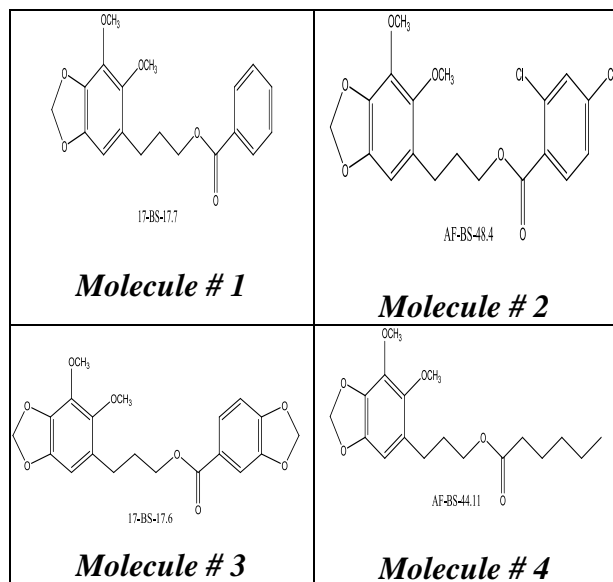


TITULACIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA

$$[100 - \{(T - [TB - CB]) / C\} * 100]$$

where T is test, C is control, TB is test blank, and CB is control blank. Both the control and test well blank readings were in the formula in order to compensate for endogenous fluorescence and quenching. The mean percent inhibition and coefficient of variance was calculated for two assays of triplicate well readings.

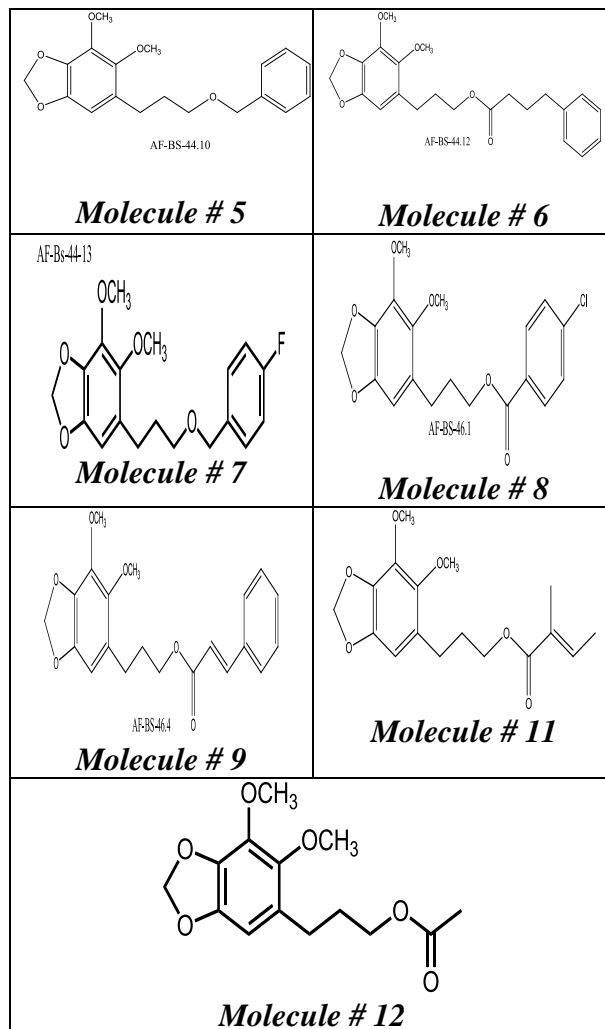
Table 1. Molecules set



QSAR y CoMFA

To construct the training set, we used fragments from the *Cambridge Structure Database*, and added the necessary groups using tools in SYBYL, molecules were minimized, and subject to conformational analysis, to determine the lowest energy conformation.

To align the molecules we used the fragment show belong. (Fig.2) We select at



least 3 common atoms and we opposed one to one the molecules.

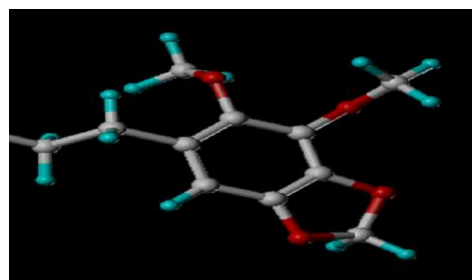


Fig.2 Fragment



TITULACIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA

To determine the charges we use DFT, inside the approximation B3LYP with Gaussian 03 code. The base used for represent the function is 6-311G. We used SYBYL platform to obtain partition coefficients, PLS, CoMFA and QSAR analysis

III. RESULTS

a. Biological data

The biological data show these IC₅₀ percent of inhibition, its shows that there are minimal changes in the structures that affect the toxicity of the molecules set.

Table2. IC₅₀ inhibition with the samples

Code	PM	IC50		
		mg/ml	μM	μg/ml
Mol 1	344.36	7.25X10 ⁻⁵	0.21	0.0725
Mol 2	412.25	5.9X10 ⁻⁵	0.14	0.0590
Mol 3	388.37	1.02X10 ⁻³	2.63	1.02
Mol 4	338.17	1.1X10 ⁻³	3.25	1.1
Mol 5	330.37	2.2X10 ⁻³	6.66	2.2
Mol 6	386.44	1.6X10 ⁻³	4.14	1.6
Mol 7	348.33	3.6X10 ⁻³	10.34	3.6
Mol 8	378.80	5.9X10 ⁻⁴	1.56	0.59
Mol 9	370.40	8.8X10 ⁻⁴	2.38	0.88
Mol 11	322.35	5.0X10 ⁻⁴	1.55	0.50
Mol 12	282.11	2.6X10 ⁻³	9.22	2.6

QSAR and CoMFA

For the CoMFA model we used PIC₅₀ as the dependent variable. After running a cross-validated PLS analysis we found that the

optimum number of compounds in the model is 4 a q² of 0.429. Running for a second time a PLS analysis we have an r² 0.980. According this CoMFA model the electrostatics camps contribute with 42.6% and the electrostatics camps 57.4%.

The most active molecule and the CoMFA analysis is show in the figure 3. The less active molecules are show in figures 4,5 and 6.

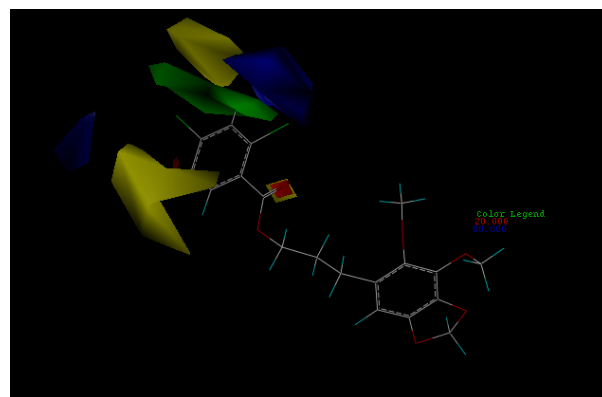
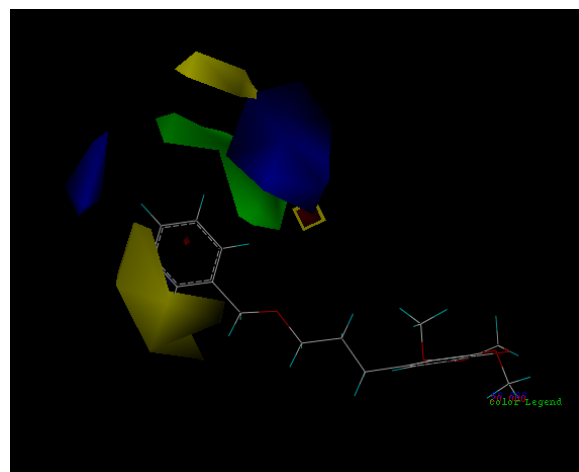


Fig 3. Structural characteristics that increase the activity





TITULACIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA

Fig 4. Structural characteristics that decrease the activity. Molecule 05

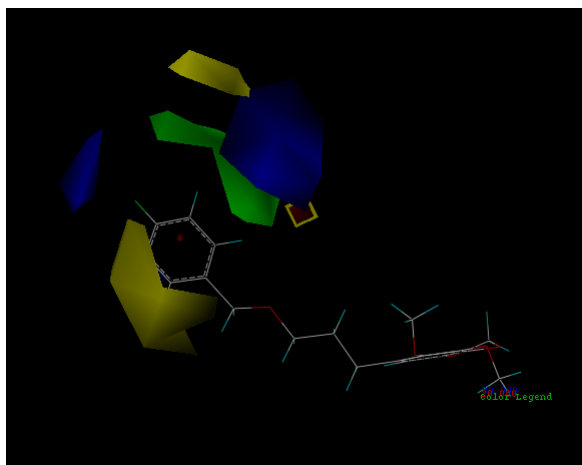


Fig 5. Structural characteristics that decrease the activity. Molecule 07

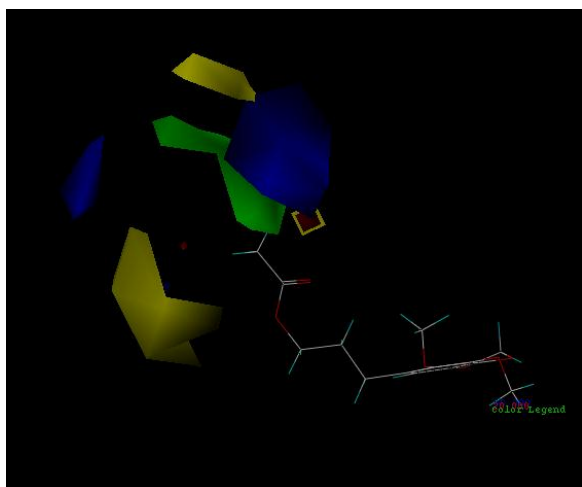


Fig 6. Structural characteristics that decrease the activity. Molecule 12

IV. DISCUSSION

The CYP3A4 is involved in the oxidation of many drugs and toxins in the intestine and

liver, and its inhibition may cause pharmacokinetic interactions by altering the metabolism of drugs with serious clinical implications. We know that dillapiol, is a potent inhibitor of this enzyme. In this study we investigated the relationship between structure and activity of a group of 11 derivatives using QSAR dillapiol 3D-QSAR analyses and CoMFA. These analyzes indicated that the activity correlates with the steric bulk of the substituents and their electrostatic properties in a characteristic pattern determined by the CoMFA analysis (see Figure 3).

REFERENCES

1. C. Hansch and A. Leo, *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1979
2. Choi, I.; Kim, S. Y.; Kim, H.; Kang, N. S.; Bae, M. A.; Yoo, S. E.; Jung, J.; No, K. T., Classification models for CYP450 3A4 inhibitors and non-inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009, 44 (6), 2354-2360.
3. Foster BC, Vandenhoeck S, Hana J, Krantis A, Akhtar MH, Bryan M, Budzinski JW, Ramputh A, Arnason JT; In vitro inhibition of human cytochrome P450- mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine* 10, 2003; 334-342.
4. Foster BC, Arnason JT, Briggs CJ; Natural health products and drug



TITULACIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA

- disposition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 2005, 203–226.
5. Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A, Paxton JP, Interactions of herbs with cytochrome P450, *Drug Met Rev* 35, 2003, 35–98.
 6. Budzinski, J.W., Foster, B.C., Vandenhoeck S., and Arnason, J.T., An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures, *Phytomedicine*, 2000; Vol. 7(4), 273-282.