

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**

Protocolo de investigación:

**Compendio de ejercicios virtuales de farmacología**

Proyecto genérico:

**Elaboración de material didáctico para el sistema modular de  
educación superior**

Etapas:

**Elaboración de material didáctico para apoyar al módulo los  
fármacos como modificadores de las funciones biológicas**

Alumno: Miguel Angel Guzmán Ruiz

Matrícula: 2172031302

Asesoras

Dra. Beatriz Godínez Chaparro

M en CF. Jazmín Santamaria Anzures

Fecha de inicio: 17/Enero/2022

Fecha de término: 5/Febrero/2023

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
Capítulo 1.SIMULADOR DE ÓRGANO AISLADO OBSim .....	4
1.1 EL PROGRAMA OBSim: Organ Bath Simulation .....	4
1.2 AGONISTAS Y ANTAGONISTAS.....	4
1.3 ESTRUCTURA Y FISIOLÓGÍA DEL ÍLEON DE COBAYO .....	6
1.4 PASOS PARA INSTALAR EL PROGRAMA OBSim.....	8
1.5 PARTES INTEGRALES DEL PROGRAMA OBSim: Organ Bath Simulation..	18
1.6 EJEMPLO .....	26
1.7 EJERCICIOS.....	36
Capítulo 2.DOCKING MOLECULAR ENTRE AINEs Y COXs CON AUTODOCK VINA EN WINDOWS 10. ....	39
2.1 CICLOOXIGENASAS (COX).....	40
2.2 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs).....	41
2.3 PROGRAMAS POR UTILIZAR Y SU INSTALACIÓN.....	42
2.3.1 Instalación del programa Avogadro (Hanwell et al., 2012) .....	43
2.3.2 Instalación del programa AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010).....	49
2.3.3 Instalación del programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer.....	55
2.3.4 Instalación del programa MGLTools (AutoDock Tools) .....	63
2.3.5 Instalación del programa PyMOL .....	69
2.4 EJEMPLO .....	83
2.4.1 Crear carpetas de fácil acceso para los archivos posteriores .....	84
2.4.2 Buscar la proteína de interés en RCSB PDB.....	85
2.4.3 Buscar un ligando en PubChem .....	88
2.4.4 Modificar un ligando en Avogadro .....	90
2.4.5 Modificar una proteína en PyMOL.....	95
2.4.6 Optimización del ligando en AutoDock Tools.....	103
2.4.7 Optimización de la proteína en AutoDock Tools .....	108

2.4.8	Ejecutar docking molecular con AutoDock Vina.....	122
2.4.9	Analizar resultados en AutoDock Tools.....	131
2.4.10	Presentación de resultados en 2D y 3D.....	142
2.5	EJERCICIOS.....	148
BIBLIOGRAFÍA .....		149

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Intestino delgado, obras de arte.....	7
Figura 2.	Clases de neuronas mientéricas.....	8
Figura 3.	Resumen abstracto de la técnica de Docking. ....	39
Figura 4.	Número de artículos publicados del año 2000 a 2017. ....	40
Figura 5.	La abstracción de un hidrogeno al ácido araquidónico (AA).....	41
Figura 6.	Mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Concentración molar deseada de acetilcolina a utilizar en íleon de cobayo. ....	27
Tabla 2.	Volúmenes por agregar de acetilcolina a partir de una concentración stock para lograr una concentración deseada. ....	28
Tabla 3.	Respuesta generada por acetilcolina en íleon de cobayo respecto a una concentración deseada.....	31
Tabla 4.	Logaritmo base 10 de concentración deseada de acetilcolina y efecto en porcentaje de la respuesta generada. ....	32
Tabla 5.	Volúmenes por agregar de atropina a partir de una concentración stock para lograr una concentración deseada. ....	33
Tabla 6.	Concentración y respuesta de acetilcolina en presencia de atropina 1nM considerando el efecto en porcentaje y la dosis efectiva 50 en molaridad. ....	35
Tabla 7.	Dosis de antagonista, razón de dosis, logaritmo negativo base 10 de la dosis del antagonista y logaritmo base 10 de la razón de dosis junto con el valor $pA_2$ . ....	36

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Respuesta generada por una concentración deseada de acetilcolina en íleon de cobayo.....	31
Gráfico 2.	Log <sub>10</sub> de concentración deseada de acetilcolina frente a efecto observado en porcentaje.....	32
Gráfico 3.	Respuesta de acetilcolina en presencia de atropina 1nM. ....	34
Gráfico 4.	Representación de Schild para el cálculo de $pA_2$ .....	36

## RESUMEN

Los fármacos como una herramienta principal en la salud necesitan ser analizados para comprobar su efecto terapéutico. Las células y los órganos diana donde el fármaco realiza su función, necesita estudiarse con la mayor precisión posible para así evitar efectos adversos o no deseados en otras células u órganos. El surgimiento de software que permita realizar prácticas y análisis de las interacciones entre células, órganos y demás con fármacos, permite varias ventajas, desde disminuir o erradicar el uso de animales de laboratorio, costos, alimentación, cuidados, tiempo y demás beneficios.

En el presente trabajo, se realiza un manual que aborda ejercicios virtuales de farmacología que faciliten el análisis y la comprensión de cómo actúan los fármacos sobre sus dianas terapéuticas, llevando a cabo una revisión y análisis de artículos en plataformas como Web of Science, PubMed, SciFinder, Google Academic, etc., e igualmente la investigación de las características, instalación y manejo de programas sobre docking molecular y simuladores virtuales para elaborar ejercicios con simuladores farmacológicos de acceso libre para estudiar y comprender el efecto que tiene el fármaco sobre el organismo.

El presente trabajo se divide en dos capítulos, en el primero, se elaboran ejercicios virtuales y una guía para la instalación y manejo del programa OBSim: Organ Bath Simulation (Strathclyde Pharmacology Simulations), el cual simula experimentos farmacológicos en tejidos aislados o animales completos, aplicando una variedad de medicamentos en concentraciones variables para lograr observar sus efectos farmacológicos. En el segundo, se elaboran ejercicios virtuales y guías para la instalación y manejo de diversos programas, los cuales se complementan para realizar acoplamiento molecular, prediciendo la interacción entre un fármaco y una proteína a nivel molecular.

## INTRODUCCIÓN

El uso de animales de laboratorio ha sido una parte central de la investigación para el descubrimiento de nuevos fármacos. Por consecuencia, es necesaria la educación y formación que permita a los estudiantes de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, obtener habilidades y conocimiento acerca del cuidado y manejo de los animales, así como el diseño experimental y el análisis estadístico que se lleva a cabo (Badyal & Desai, 2014; Elhajji & Bsheti, 2018).

Sin embargo, el uso de animales para experimentación ha llevado a muchos debates, entre ellos el tiempo y dinero elevados como el sacrificio de muchos ejemplares.

Partiendo de ello, es fundamental la búsqueda de nuevas alternativas que cumplan con los objetivos y puedan demostrar *in vitro* los resultados que se puedan observar *in vivo* (Singh et al., 2016; Sivakrishnan & Anbiah, 2021).

La pandemia de COVID-19 trajo consigo desventajas como la interrupción de la enseñanza en aulas presenciales. Los retos que conllevaban mover sistemas educativos del modo presencial al electrónico se hicieron mayormente presentes cuando se habló de las prácticas que ya se tenían en cuenta de forma presencial (Ezeala et al., 2021). En muchas universidades a nivel mundial, entre ellas la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), optaron por programas computacionales que simularan experimentos farmacológicos.

El objetivo de los simuladores farmacológicos es poder transmitir el conocimiento de la aplicación farmacológica como los conceptos básicos y clínicos a los estudiantes; siendo la simulación una técnica educacional que asemeja experiencias reales que replican aspectos de la práctica de manera interactiva (Andrews & Barta, 2020).

## Capítulo 1. SIMULADOR DE ÓRGANO AISLADO OBSim

### 1.1 EL PROGRAMA OBSim: Organ Bath Simulation

Los experimentos farmacológicos *in vitro* de órgano aislado proveen información relevante para el descubrimiento o cuantificación del efecto de los fármacos en tejidos específicos antes de su aplicación en humanos o animales vivos. Las propiedades farmacológicas de la mayoría de los fármacos actuales fueron elucidadas con este método y continúan siendo parte esencial en el proceso del descubrimiento de nuevos y mejores fármacos.

El programa OBSim: Organ Bath Simulation simula experimentos farmacológicos *in vitro* usando cuatro diferentes tipos de tejidos: íleon de cobayo, yeyuno de conejo, arteria de rata y biventer de pollo.

### 1.2 AGONISTAS Y ANTAGONISTAS

Para que los fármacos puedan ejercer su efecto, estos deben interactuar químicamente con los receptores celulares de acuerdo con su tamaño, carga eléctrica, forma y composición adecuada, provocando un cambio conformacional a nivel de la estructura molecular. Algunos receptores provocan la apertura de un canal iónico o una estimulación enzimática cuando un fármaco logra hacer contacto con ellos. Por lo tanto, un agonista farmacológico puede ejercer efectos similares a los agonistas endógenos como las hormonas y los neurotransmisores. Muchos de

ellos pueden provocar una respuesta máxima en el organismo, la cual es buscada por los fármacos para ejercer el mismo efecto. Los agonistas parciales provocan una respuesta media y pueden prevenir la unión de mediadores, disminuyendo la respuesta en el organismo (Bond & Ijzerman, 2006; Daeffler & Landry, 2000; Landry & Gies, 2008).

Los fármacos antagonistas ejercen el efecto contrario a los agonistas, estos buscan inutilizar los receptores a los que se unen o, en todo caso, impedir que un agonista, endógeno o farmacológico, ejerza su efecto. Estos pueden ser competitivos, compitiendo con otras moléculas, y evitan su unión a los receptores estabilizando al receptor en su estado inactivo, pero su efecto puede superarse, en algunos casos si la unión del antagonista no es covalente, aumentando la dosis del agonista. Aquellos antagonistas cuya unión es muy fuerte al receptor o covalente, se conocen como antagonistas irreversibles o pseudoirreversibles. También, están los antagonistas que no se unen al mismo sitio de unión que un agonista, se unen a un sitio diferente y actúan alostéricamente potenciando o inhibiendo la acción del agonista (Bond & Ijzerman, 2006; Daeffler & Landry, 2000; Landry & Gies, 2008).

Las respuestas a los medicamentos por lo general aumentan cuando incrementa la dosis. Sin embargo, llega un momento en el cual la respuesta llega a un límite no importando el aumento de dosis, la respuesta no aumentará haciendo una curva hiperbólica como consecuencia de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$E = \frac{E_{m\acute{a}x} \times C}{C + EC_{50}}$$

Donde E es el efecto observado en la concentración C.  $E_{m\acute{a}x}$  es la respuesta máxima que produjo o puede ser producida por el fármaco.  $EC_{50}$  es el 50% de efecto máximo de la concentración del fármaco (Christopoulos, 2014; Kenakin & Christopoulos, 2013; Kenakin et al., 2012; Shonberg et al., 2014).

En el equilibrio, la proporción de receptores ocupados por un agonista (A) disminuye en presencia de un antagonista (B). La unión del antagonista a los receptores impide la unión del agonista, pero la relación entre la ocupación y la respuesta del agonista no varía, por lo que el cociente entre las concentraciones de agonista cuando no hay antagonista presente [A] y cuando se encuentra un antagonista presente [A'] se conoce como la razón de dosis (Aronson, 2007; Arunlakshana & Schild, 1959; Gaddum, 1937; Tallarida et al., 1979).

La escala pA como una medida empírica del antagonismo farmacológico, se define como “el logaritmo negativo en base 10 de la concentración molar de un fármaco antagonista capaz de reducir el efecto de una dosis múltiple (x) de un fármaco agonista a aquel que produce una dosis única” (Schild, 1947).

El pA<sub>2</sub> puede definirse como el logaritmo inverso de la concentración molar del antagonista que hace necesario duplicar la concentración de agonista para obtener el mismo efecto que cuando el antagonista no está presente (Arunlakshana & Schild, 1959; Schild, 1947).

El procedimiento para calcular dicho valor consiste en tener valores amplios de logaritmos de razones de dosis representados en el eje de las ordenadas frente al logaritmo negativo de la concentración molar del antagonista en el eje de las abscisas, teniendo una recta cuya interpolación en el eje de las abscisas proporciona la medida del pA<sub>2</sub> (Aronson, 2007; Arunlakshana & Schild, 1959; Schild, 1947).

### **1.3 ESTRUCTURA Y FISIOLOGÍA DEL ÍLEON DE COBAYO**

El intestino delgado es donde ocurre la mayor parte de absorción de nutrientes y fármacos, ya que tiene una gran área superficial llena de vellosidades compuestas de una gran variedad de células desde su estructura, forma y tamaño. El íleon posee una pared vascular más delgada que el yeyuno y el duodeno, encontrándose en la parte distal del intestino delgado (Gabella, 1972; Kararli, 1995).

El sistema nervioso entérico (SNE) coordina y modula las funciones musculares, vasculares, inmunes y endocrinas, entre otras, esenciales en la digestión. La mayoría de las neuronas involucradas en las funciones musculares se encuentran en el plexo mientérico y submucoso (Figura 1) (Costa et al., 2000).

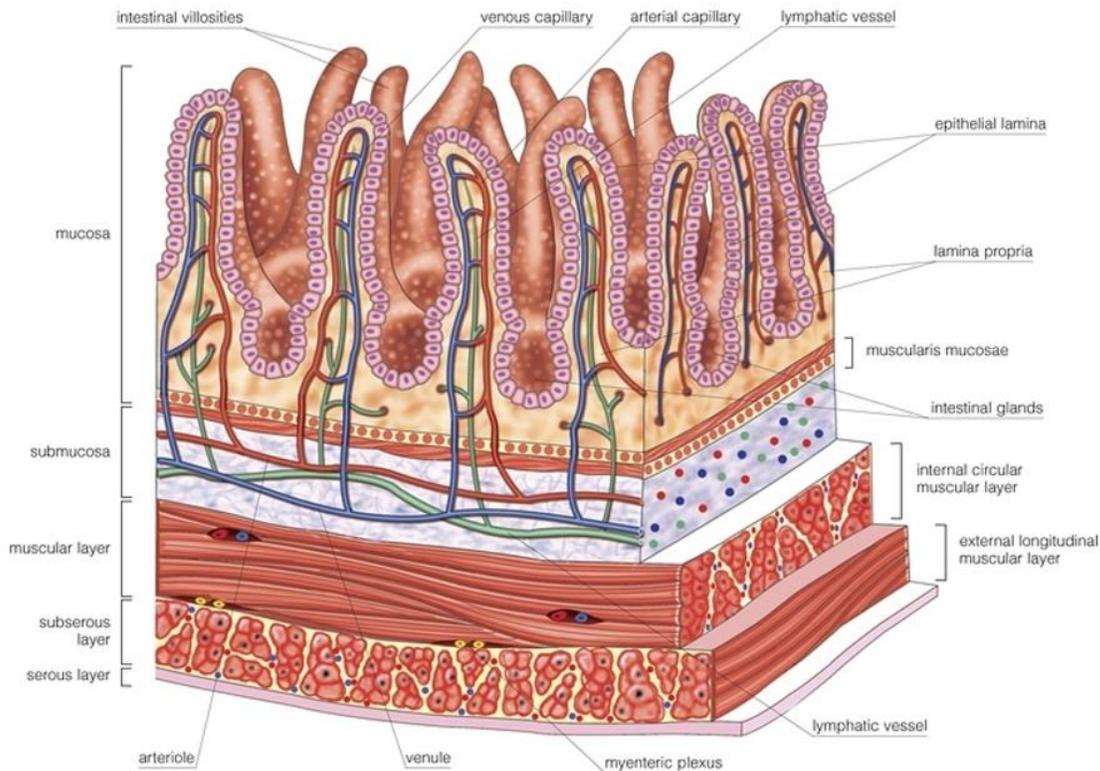


Figura 1. Intestino delgado, obras de arte. [Fotografía]. Obtenido de Encyclopædia Britannica ImageQuest. [https://imagequest.uam.elogim.com/search/132\\_1483075/1/132\\_1483075/cite](https://imagequest.uam.elogim.com/search/132_1483075/1/132_1483075/cite)

Las células nerviosas del sistema nervioso simpático (SNS) en el intestino son diferentes de acuerdo con su localización, forma, proporción, conexión y función (Figura 2); son sensibles a estimulaciones químicas y mecánicas, inervan los plexos entéricos y las zonas vasculares de las submucosas (Costa et al., 2000; Nasser et al., 2006).

Los receptores adrenérgicos,  $\alpha$ -adrenoreceptores y  $\beta$ -adrenoreceptores, son receptores acoplados a una proteína G. La liberación de los neurotransmisores, como la noradrenalina que se une a los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos y  $\beta$ -adrenérgicos, se regula por medio del SNS. La pre-sinapsis de los adrenoreceptores  $\alpha$ 2a en el plexo mientérico, hiperpolariza las terminales nerviosas e inhiben la liberación de noradrenalina y acetilcolina, haciendo que la noradrenalina no pueda ejercer su efecto de relajación en las células del músculo liso en los  $\beta$ -adrenoreceptores (Nasser et al., 2006).

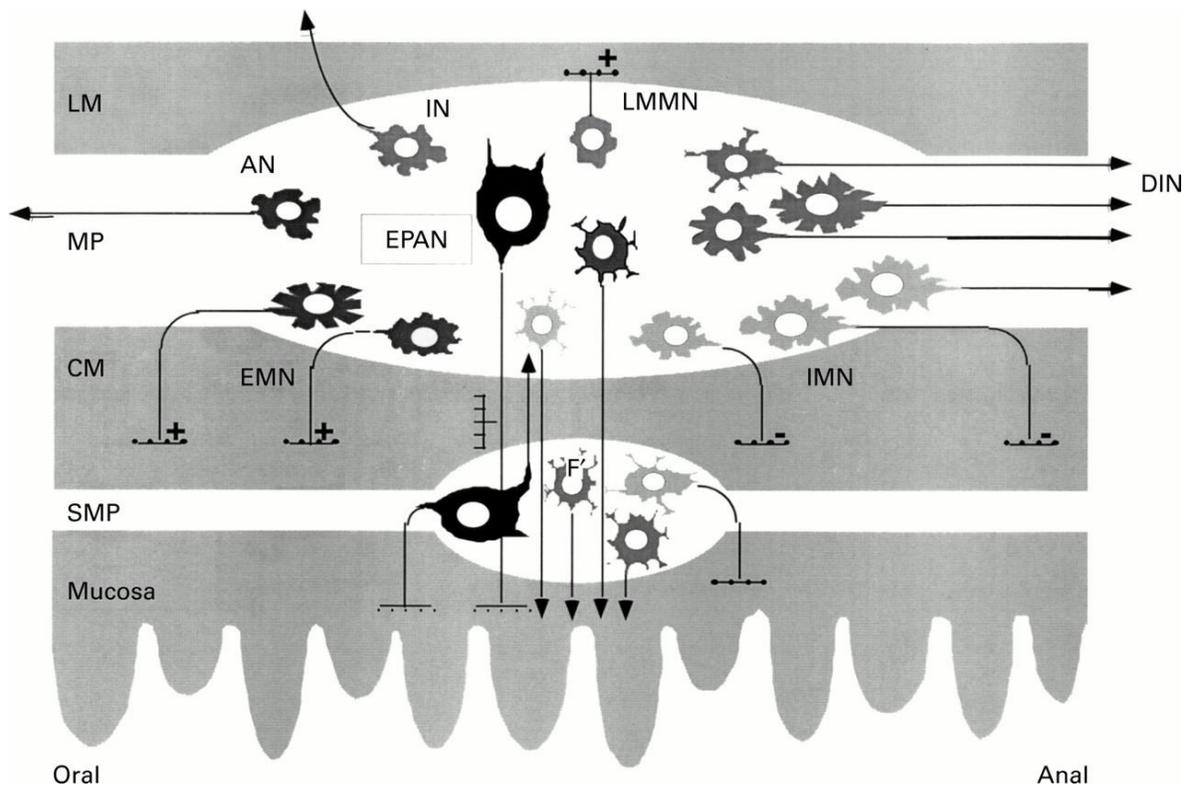


Figura 2. Clases de neuronas mientéricas. LM, músculo longitudinal; CM, músculo circular; MP, plexo mientérico; SMP, plexo submucoso; AN, neuronas ascendentes; IN, neuronas intestino-fugales; DIN, interneuronas descendentes; EPAN, neuronas aferentes primarias entéricas; EMN, motoneuronas excitatorias; IMN, motoneuronas inhibitorias; LMMN, motoneuronas longitudinales. Modificado de ((Costa et al., 1996)).

#### 1.4 PASOS PARA INSTALAR EL PROGRAMA OBSim

El programa OBSim fue diseñado por la Universidad de Strathclyde con el fin de proveer un simulador que cumpliera con los requisitos de estos experimentos y de manera gratuita.

Los requisitos mínimos que requiere el sistema son:

Sistema Operativo: Windows XP o superior

Procesador: Pentium 233 mHz o superior

Memoria: al menos 1 GB RAM

Gráficos: Tarjeta integrada gráfica o superior

Almacenamiento: al menos 50 MB

1.4.1 Acceder a la siguiente liga de internet dando clic en el enlace: [https://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software\\_sims.htm](https://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software_sims.htm)

Lo que conducirá a la siguiente pantalla:

**University of Strathclyde Glasgow**

Study with us | Work with us | Why Strathclyde?

Parent Page | Current page

## Strathclyde Pharmacology Simulations

The Strathclyde Pharmacology Simulations package is a suite of programs simulating pharmacological experiments on isolated tissues or whole animals. A range of drugs in varying concentrations can be applied and the effects observed. The programs will run under Windows 95 or later.

### Simulations

- [Virtual Cat](#)
  - [Installation File \(V3.0.0\) 1/2/21](#)
  - [Installation File \(V2.6.2 14/4/14\)](#)
  - [Source Code](#)
- [RatCVS: Rat Cardiovascular System](#)
  - [Installation File \(V3.3.7 30/7/20\)](#)
  - [Source Code](#)
- [Virtual Twitch](#)
  - [Installation File \(V2.2.1 8/10/14\)](#)
- [Virtual NM1](#)
  - [Installation File \(v2.1.9 8/10/14\)](#)
- [OBSim: Organ Bath Simulation](#)
  - [Installation file \(v3.6.05/07/21\)](#)
  - [Source Code](#)
  - [Old Version \(1.6.3\)](#)
  - [ObsSim](#)

Si el enlace no funciona, buscar en Google o cualquier motor de búsqueda lo siguiente: "OBSim strathclyde university", lo cual hará que aparezca la siguiente pantalla:

Google

OBSim strathclyde university

Todos | Maps | Imágenes | Noticias | Videos | Más | Herramientas

Cerca de 73 resultados (0.52 segundos)

Sugerencia: Buscar solo resultados en **español**. Puedes especificar el idioma de búsqueda en Preferencias.

<http://spider.science.strath.ac.uk> > s... Traducir esta página

**Strathclyde Pharmacology Simulations - Spider**

University of Strathclyde ... The Strathclyde Pharmacology Simulations package is a suite of programs simulating ... **OBSim**: Organ Bath Simulation.

OBSim: Organ Bath Simulation: Installation fil... RatCVS: Rat Cardiovascular System: Instal...  
EPSim: Rat Brain Slice Epilepsy Simulation: I... Virtual Cat: Installation File (V3.0.0) 1/2/21; ...

<https://norecopa.no> > norina > strat... Traducir esta página

**Strathclyde Pharmacology Simulations: OBSIM (Organ Bath ...**

7 abr 2021 — **OBSIM** belongs to The **Strathclyde** Pharmacology Simulations package that simulates pharmacological experiments on isolated tissues or whole ...

<https://norecopa.no> > norina > strat... Traducir esta página

**Strathclyde Pharmacology Simulations: The Virtual Cat**

7 abr 2021 — The simulation displays the effects of drugs on the cat's blood pressure, heart rate, skeletal muscle and nictitating membrane contractions.

<https://github.com> > OBSIM > blob Traducir esta página

**OBSIM/OBSimMain.pas at master · GitHub**

Contribute to johndempster/OBSIM development by creating an account on GitHub. ...  
(c) J. Dempster, University of Strathclyde 2005.

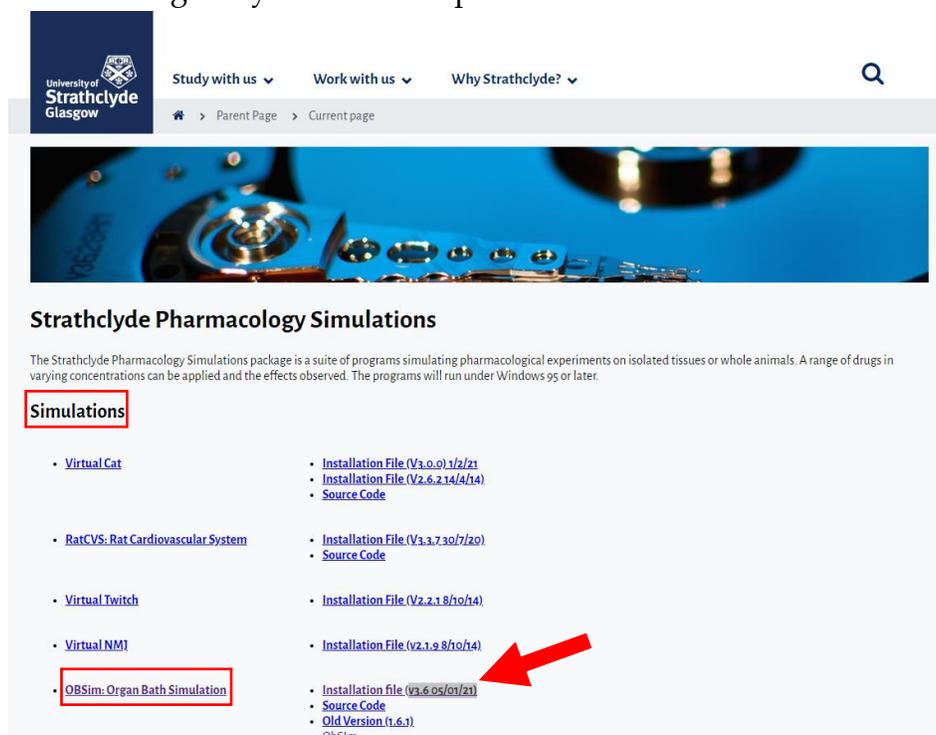
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> > pmc Traducir esta página

**Integration of computer-simulated practical exercises ... - NCBI**

por CC Ezeala · 2020 · Mencionado por 2 — For this, students used organ bath software (**OBSim**, from University of Strathclyde) to compare the efficacy and potency of histamine a ...

A continuación, dar clic donde se encuentra señalado (flecha roja) o en la primera opción que aparezca para llegar a la imagen del punto **1.4.1**.

**1.4.2** Una vez dentro de la página de la Universidad de Strathclyde, ubicar el programa de OBSim: Organ Bath Simulation en el apartado de **Simulations**. A continuación, dar clic al enlace llamado **Installation file (v3.6 05/01/21)** (flecha roja). *Nota:* Actualmente, se encuentra disponible la versión v4.1 23/08/22, ésta únicamente añade un instalador para equipos Macintosh, por lo que sí se dispone de dicho sistema operativo puede utilizarlo; en este manual se trabajará con la versión estable **v3.6 05/01/21** del programa en Windows ya que la versión de Windows que viene en el apartado v4.1 23/08/22 puede que arroje un problema al momento de descargarlo y sea más complicada su instalación.



University of Strathclyde Glasgow

Study with us ▾ Work with us ▾ Why Strathclyde? ▾

Parent Page > Current page

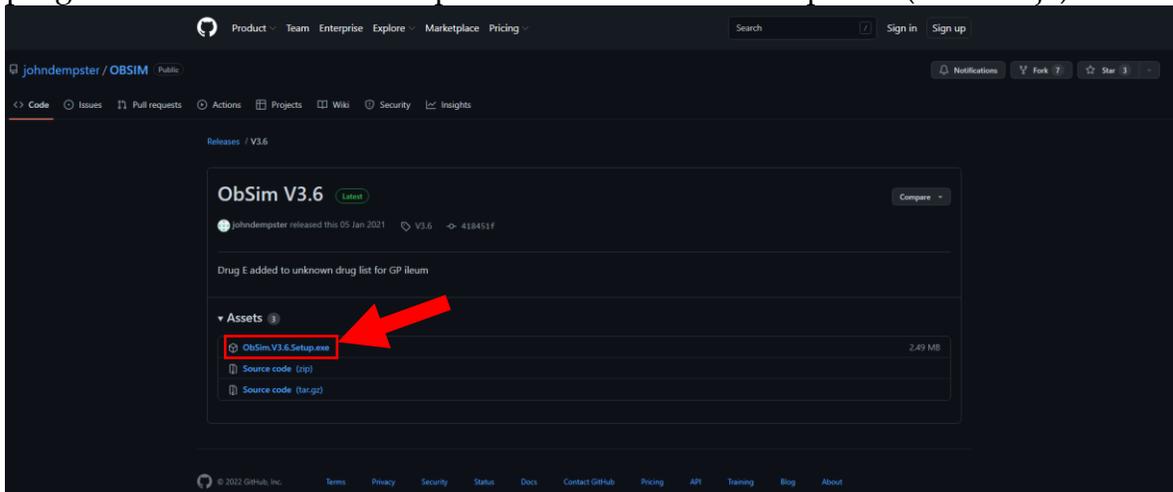
## Strathclyde Pharmacology Simulations

The Strathclyde Pharmacology Simulations package is a suite of programs simulating pharmacological experiments on isolated tissues or whole animals. A range of drugs in varying concentrations can be applied and the effects observed. The programs will run under Windows 95 or later.

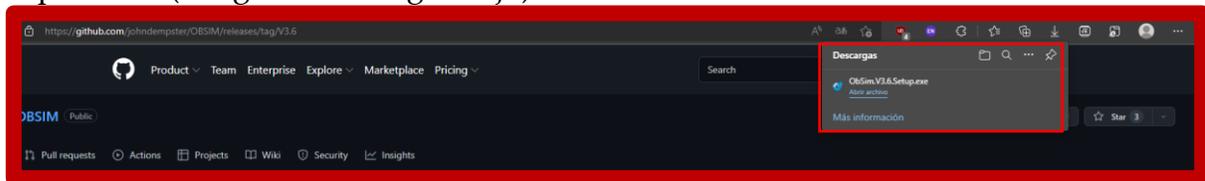
### Simulations

- [Virtual Cat](#)
  - [Installation File \(V3.0.0\) 1/2/21](#)
  - [Installation File \(V2.6.2 14/4/14\)](#)
  - [Source Code](#)
- [RatCVS: Rat Cardiovascular System](#)
  - [Installation File \(V3.3.7 30/7/20\)](#)
  - [Source Code](#)
- [Virtual Twitch](#)
  - [Installation File \(V2.2.1 8/10/14\)](#)
- [Virtual NM1](#)
  - [Installation File \(v2.1.9 8/10/14\)](#)
- [OBSim: Organ Bath Simulation](#)
  - [Installation file \(v3.6 05/01/21\)](#)
  - [Source Code](#)
  - [Old Version \(1.6.3\)](#)
  - [Obsim](#)

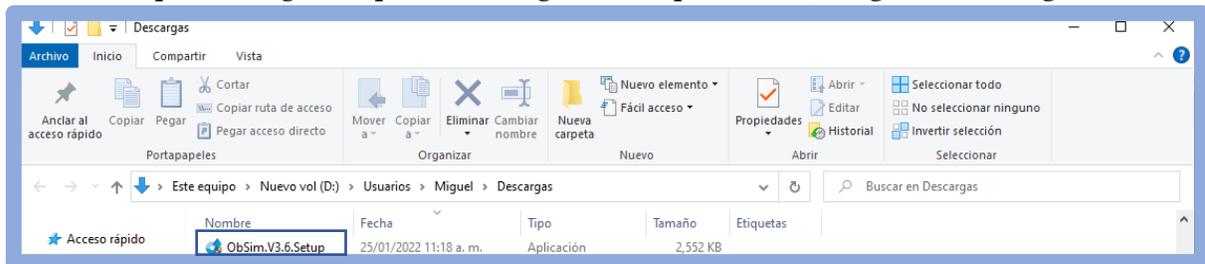
1.4.3 Aparecerá la siguiente pantalla donde se puede descargar el instalador del programa haciendo clic en el apartado “ObSim.V3.6.Setup.exe” (flecha roja):



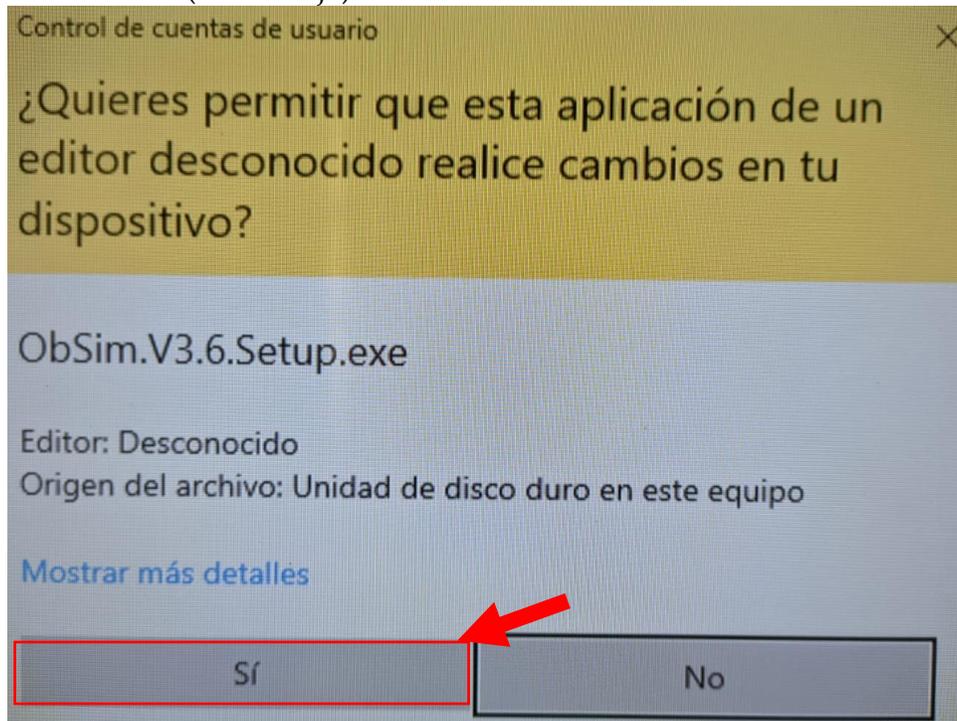
1.4.4 A continuación (dependiendo del explorador utilizado para descargar el programa) ubicar el instalador descargado en el acceso directo del mismo explorador (imagen con margen rojo).



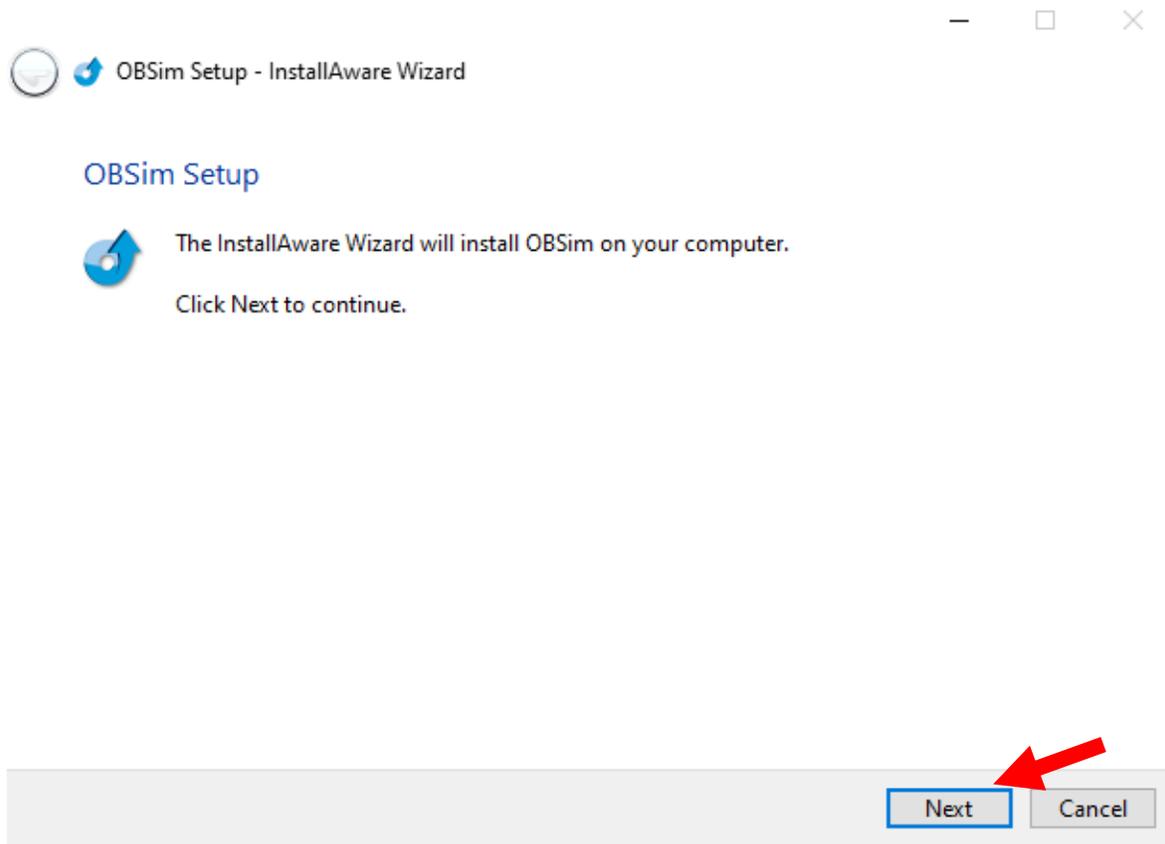
O en la carpeta designada para descargas del explorador (imagen con margen azul).



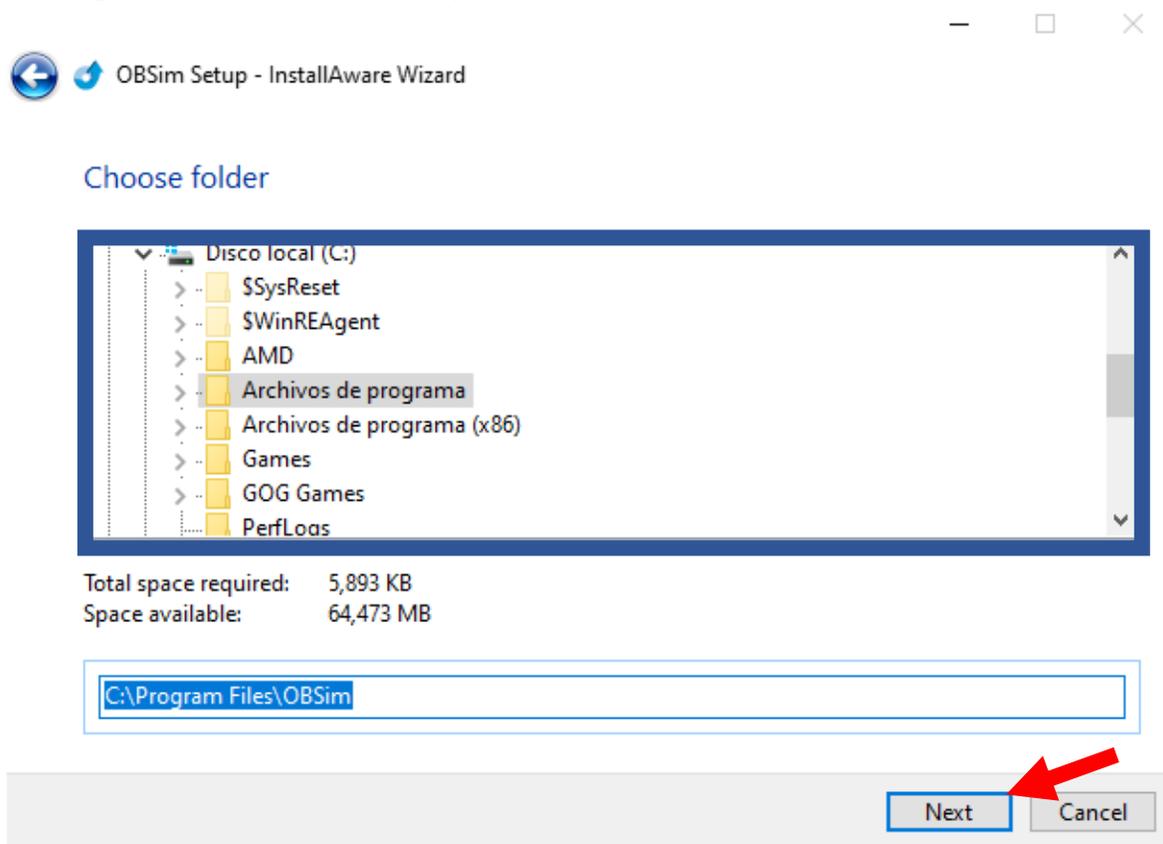
**1.4.5** Dar doble clic a la aplicación llamada "ObSim.V3.6.Setup" que se acaba de descargar y se ubica en la carpeta de "Descargas". Dependiendo del sistema operativo y los permisos de usuario, puede que aparezca la siguiente imagen, la cual aparece por falta de los permisos antes mencionados. Si es el caso simplemente dar clic en el botón "Sí" (flecha roja).



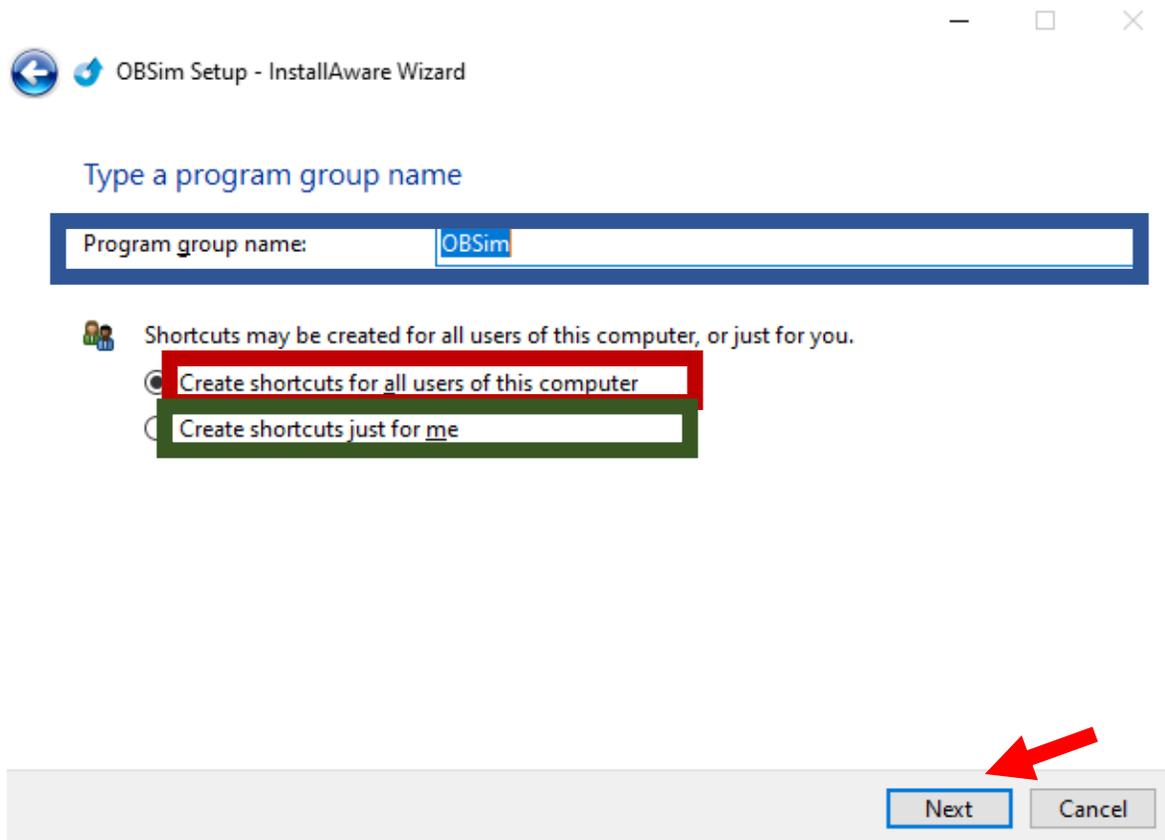
**1.4.6** El instalador del programa se hará presente, las indicaciones se encuentran en inglés. En la misma ventana, dar clic en el apartado “Next” (flecha roja) para continuar, ya que esta pantalla solo es la bienvenida al instalador del programa.



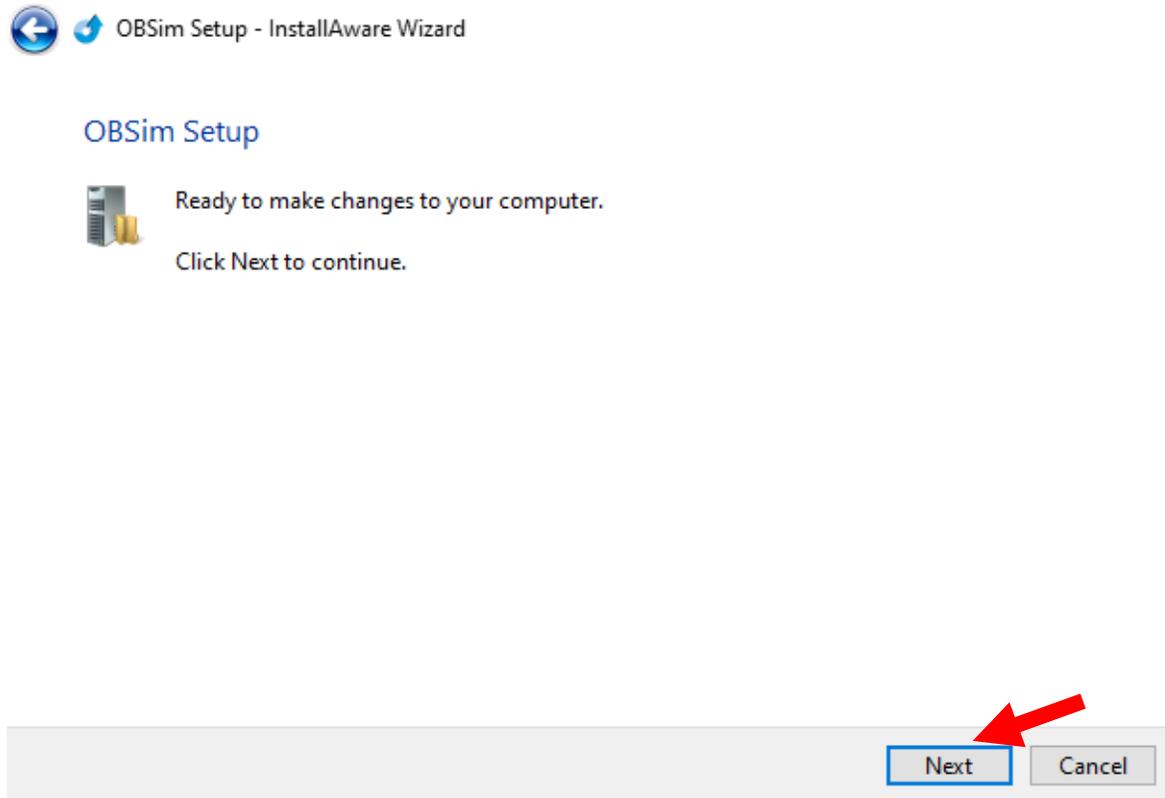
1.4.7 Seguido, aparecerá el apartado donde propone instalar el programa, por defecto se deja la ruta "C:\Program Files\OBSim" la cual instala el programa en una carpeta que se genera automáticamente en el Disco Local C, el cual es el predeterminado, generalmente en cualquier sistema operativo Windows, a menos que se tenga algún otro seleccionado. Si no se desea instalar en la ruta predeterminada, elegir la carpeta donde requiera instalar el programa [recuadro azul] (la carpeta OBSim se generará automáticamente una vez que se introduzca la nueva ruta). Una vez introducida la nueva ruta o dejado la predeterminada, dar clic en el apartado "Next" (flecha roja).



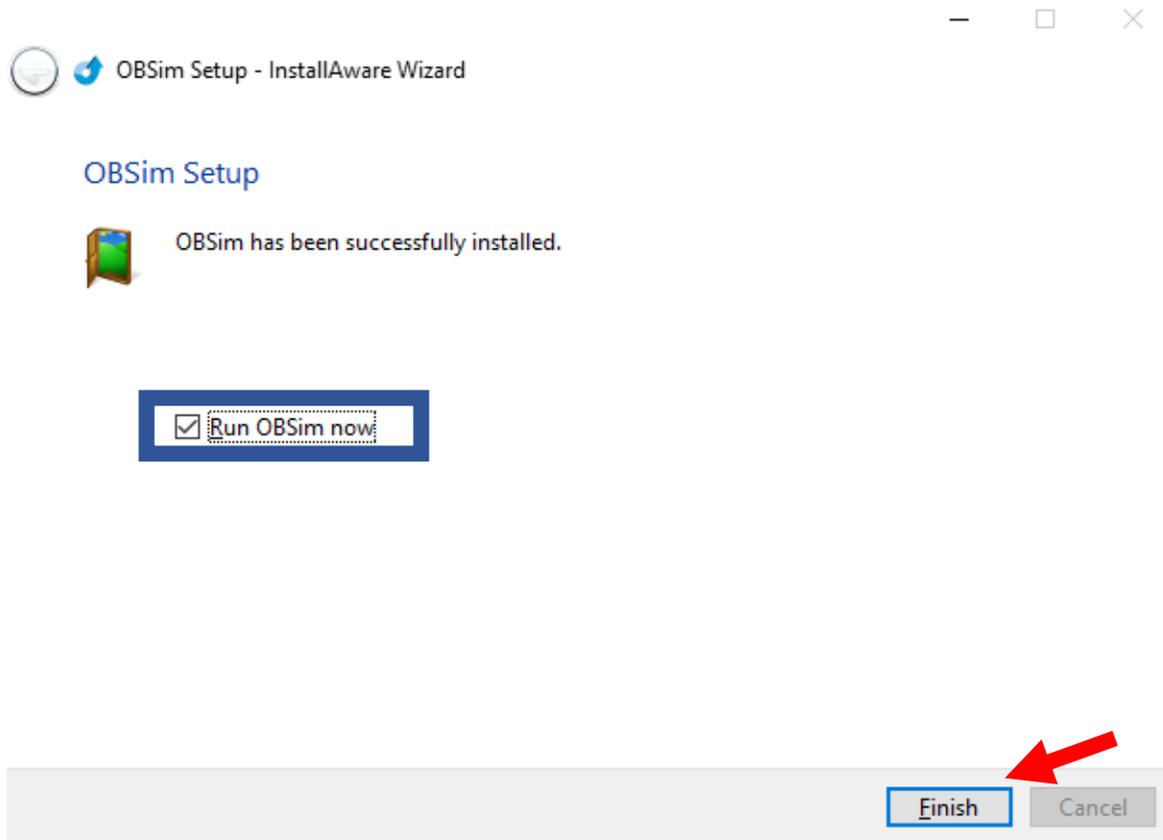
**1.4.8** La siguiente pantalla solicita que introduzca un nombre para un grupo de programas, el cual por defecto es "OBSim" si se desea colocar uno distinto, escribir en el recuadro azul el nombre deseado. Para crear un acceso directo para todos los usuarios que hagan uso de ese equipo de cómputo, dar clic en el recuadro rojo o únicamente para el usuario que está instalando el programa actualmente dar clic en el recuadro verde. Dar clic en "Next" para continuar (flecha roja).



**1.4.9** La siguiente ventana simplemente notifica que se harán los cambios seleccionados anteriormente. Dar clic en “Next” para continuar (flecha roja).



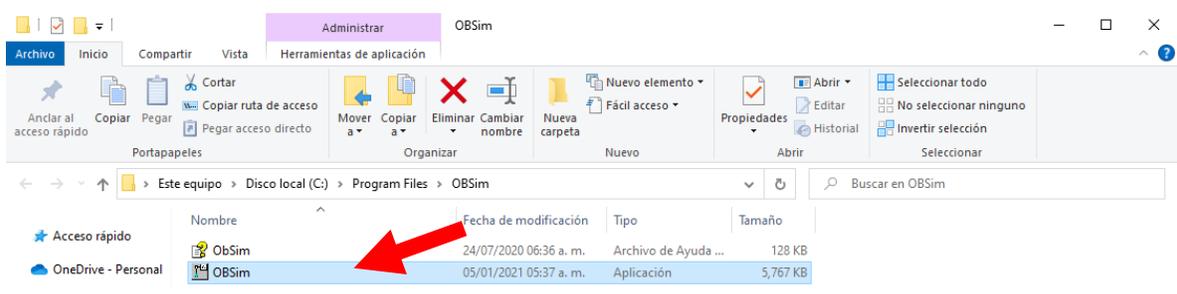
**1.4.10** Dependiendo de la velocidad del equipo de cómputo, el asistente de instalación procederá a instalar el programa de acuerdo con las opciones seleccionadas anteriormente. Una vez que concluya la instalación aparecerá la siguiente pantalla la cual permite cerrar el asistente de instalación y ejecutar el programa directamente una vez se cierre el asistente (recuadro azul). Para no ejecutar el programa directamente, desactivar la casilla "Run OBSim now". A continuación, dar clic en "Finish" para terminar la instalación y cerrar el asistente de instalación del programa (flecha roja).



**1.4.11** En el escritorio se habrá generado un acceso directo, el cual ejecuta directamente el programa



Si no se encuentra el acceso directo, ir a la ruta establecida en el punto **1.4.7** para instalar el programa, en la cual se dispone el acceso a la aplicación (flecha roja).



### 1.5 PARTES INTEGRALES DEL PROGRAMA OBSim: Organ Bath Simulation

El programa OBSim: Organ Bath Simulation está compuesto de diversas funciones que ayudan a simular un experimento farmacológico con órgano aislado. La siguiente imagen expone las partes por las que se compone el programa; se verán detalladamente más adelante:

A screenshot of the 'Organ Bath Simulation' software interface. The window title is 'Organ Bath Simulation (c) J. Dempster, University of Strathclyde 2009-20 V3.6 05.01.21'. The interface is divided into a control panel on the left and a graph on the right.

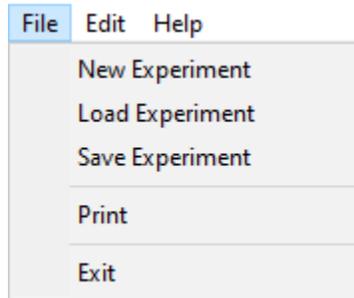
**Control Panel (Left):**

- 1.5.1: File menu
- 1.5.2: Edit menu
- 1.5.3: Help menu
- 1.5.4: Tissue Type dropdown (Guinea Pig Ileum)
- 1.5.5: New Experiment button
- 1.5.6: Stimulation section with 'On' and 'Off' radio buttons and 'Nerve (10V, 1ms)' / 'Muscle (20V, 10ms)' options.
- 1.5.7: Agonists, Antagonists, and Unknowns tabs.
- 1.5.8: Reservoir section with 'Flush Reservoir to Bath' and 'Clear Drugs from Res.' buttons, and a 'Salt solution' dropdown (Krebs-Henseleit (normal)).

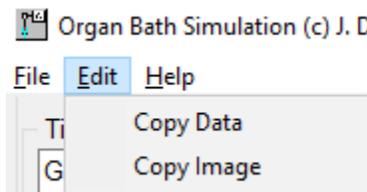
**Graph (Right):**

- 1.5.11: Chart title 'Experimental Setup (Guinea Pig Ileum)'. The 'Dilution Formula' tab is selected.
- 1.5.12: The graph shows force (F gms) on the y-axis (0 to 20) and time (s) on the x-axis (0 to 45). A blue curve shows a rise to a plateau, followed by a fall.
- 1.5.13: A vertical green line on the graph is labeled '12.203 gms'.
- 1.5.9: 'Record' button at the bottom left.
- 1.5.10: 'Stop' button at the bottom left.
- Start Time: 0 s
- Wash () buttons on either side of the Start Time field.
- Window Size: 50.0 s

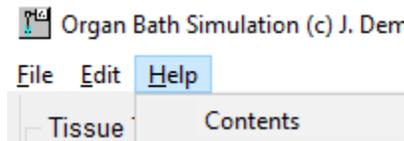
**1.5.1 Pestañas de operación:** La pestaña *File* desplegará un menú que permite crear un nuevo experimento (*New Experiment*), cargar un experimento (*Load Experiment*), guardar un experimento (*Save Experiment*), Imprimir (*Print*) y Salir del programa (*Exit*).



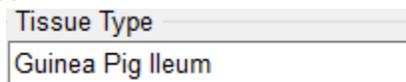
La pestaña *Edit* permitirá copiar la información que se ejecuta (*Copy Data*) y copiar la información que se tenga actualmente en el gráfico (*Copy Image*).



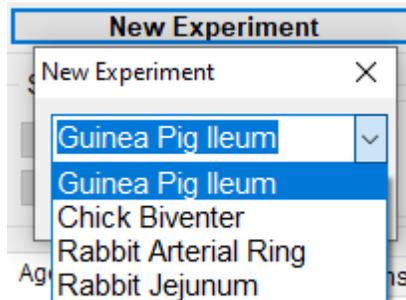
La pestaña *Help* desplegará la opción de ir a los contenidos referentes al programa (*Contents*). Estos se encontrarán en idioma inglés.



**1.5.2 Tipo de Tejido:** Se muestra el tipo de tejido seleccionado de entre los disponibles en el programa.



**1.5.3 Nuevo experimento:** Al dar clic en el botón *New Experiment*, se desplegará un menú el cual permite seleccionar el tipo de tejido aislado con el que se desee trabajar.



**1.5.4 Estimulación eléctrica:** El apartado permite seleccionar la estimulación que se le dará a las fibras nerviosas que inervan el tejido muscular dejando seleccionada la opción de *Nerve*, o *Muscle* para estimular directamente las fibras musculares dentro del tejido.

**1.5.5 Agonistas:** El apartado muestra todos los agonistas disponibles en el programa, junto con la concentración molar de la solución stock a trabajar y el volumen a añadir al *Baño de órgano*. Realizar los siguientes pasos para seleccionar un agonista:

**1.5.5.1** Seleccionar el apartado de Agonistas.

**1.5.5.2** Seleccionar el tipo de agonista a usar disponibles de la lista.

1.5.5.3 Seleccionar la concentración del agonista a utilizar disponibles de la lista.

Agonists Antagonists Unknowns

Histamine

Stock Soln. 1E-3 M

Volume 1E-1 M

Add to 1E-3 M

Reservoir 1E-4 M

Flush Res 1E-5 M

1E-6 M

1E-7 M

1E-8 M

1.5.5.4 Colocar el volumen deseado (entre 0 a 1 ml) de la solución stock en la caja de *Volumen*.

1.5.5.5 Hacer clic en *Add to Organ Bath* para añadir el volumen y concentración previamente seleccionados al baño de órgano.

1.5.6 **Antagonistas:** El apartado muestra todos los antagonistas disponibles en el programa, junto con la concentración molar de la solución stock a trabajar y el volumen a añadir al *Baño de órgano* o *Reservorio*. Realizar los siguientes pasos para seleccionar un antagonista:

1.5.6.1 Seleccionar el apartado de Agonistas.

Agonists Antagonists Unknowns

Mepyramine

Stock Soln. 1E-3 M

Volume 0.10 ml

Add to Organ Bath

1.5.6.2 Seleccionar el tipo de agonista a usar disponibles de la lista.

Agonists Antagonists Unknowns

Mepyramine

Mepyramine

Atropine

Tubocurarine

Naloxone

Yohimbine

Hyoscine

1.5.6.3 Seleccionar la concentración del antagonista a utilizar disponibles de la lista.

Agonists Antagonists Unknowns

Mepyramine

Stock Soln. 1E-3 M

Volume 1E-1 M  
1E-2 M  
1E-3 M  
1E-4 M  
1E-5 M  
1E-6 M  
1E-7 M  
1E-8 M

Add to

Reservoir

Flush Res

1.5.6.4 Colocar el volumen deseado (entre 0 a 1 ml) de la solución stock en la caja de *Volumen*.

1.5.6.5 Hacer clic en *Add to* para añadir el volumen y concentración previamente seleccionados al baño de órgano o reservorio.

1.5.6.6 Seleccionar *Organ Bath* de la lista de *Add To* para que el volumen y concentración del antagonista seleccionado sea aplicado directamente al *Baño de órgano*. Seleccionar *Reservoir* para añadir el antagonista al reservorio que contiene la solución de Krebs.

Agonists Antagonists Unknowns

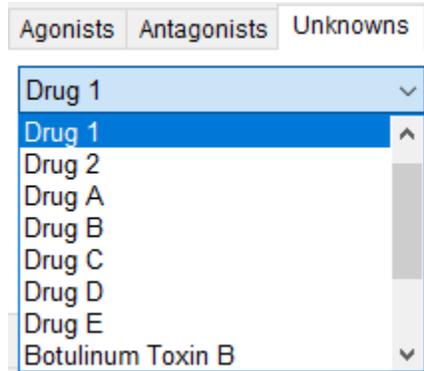
Mepyramine

Stock Soln. 1E-3 M

Volume 0.10 ml

Add to Organ Bath  
Organ Bath  
Reservoir

**1.5.7 Desconocidos:** El apartado muestra diversos fármacos que pueden actuar como agonistas, antagonistas o puede que no tengan actividad en los tejidos de los que dispone el programa. Para experimentar con ellos, se puede seguir la misma metodología de los puntos 1.5.6 a 1.5.6.6.



**1.5.8 Reservorio:** El apartado muestra las opciones *Flush Reservoir to Bath* y *Clear Drugs from Res.* La primera agrega el contenido del *Reservorio* el cual puede contener principalmente la solución de *Krebs-Henseleit (normal)* y algún antagonista o fármaco desconocido que se haya agregado al *Baño de órgano*. La segunda elimina el antagonista o fármaco desconocido que se le haya agregado al *Reservorio* para dejar libre la solución de Krebs.

**1.5.9 Registrar:** Al hacer clic en el botón *Record* se comenzará el experimento con las condiciones anteriormente seleccionadas y se iniciará el registro en el apartado de *Gráfico (Chart)*.

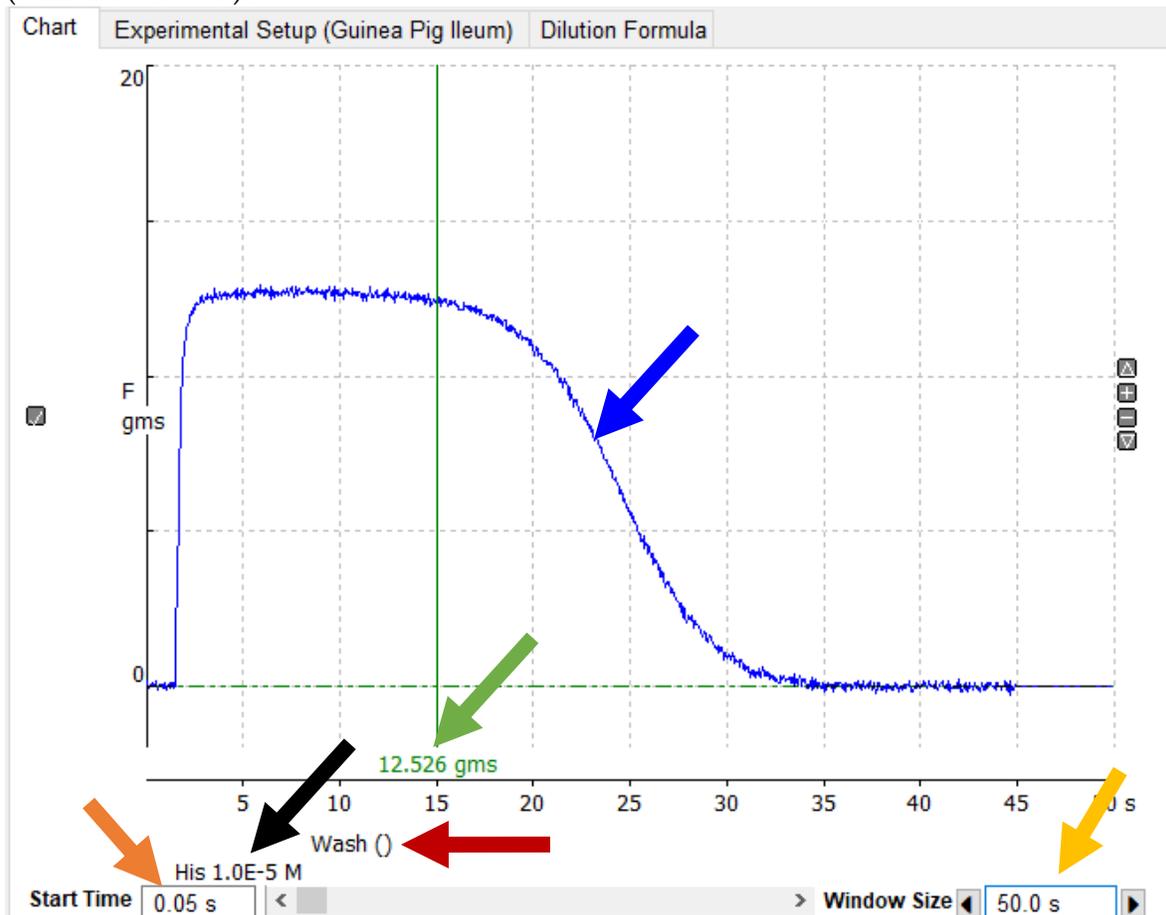
Record

**1.5.10 Detener:** Al hacer clic en el botón *Stop* se detendrá el experimento.

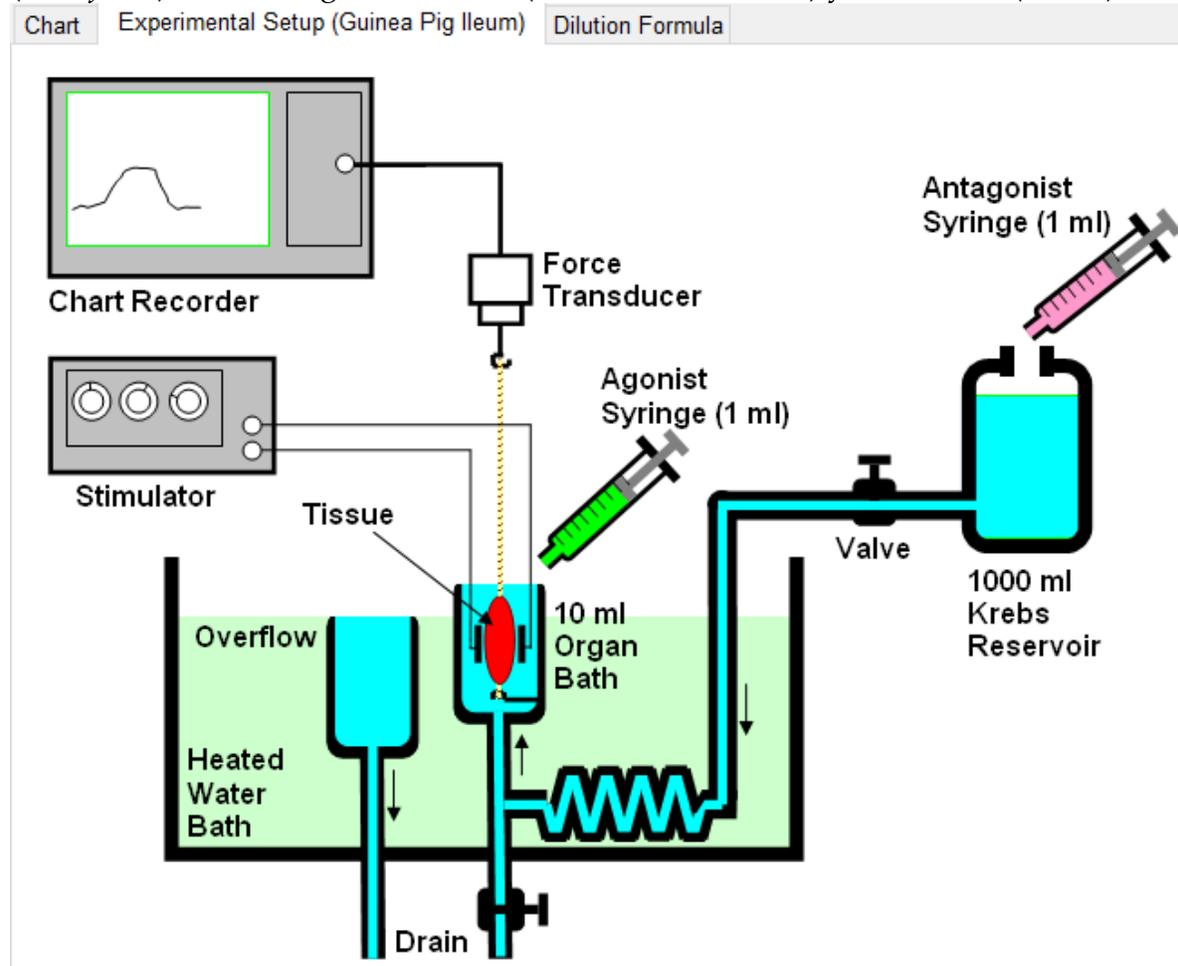
Stop

**1.5.11 Gráfico:** La pestaña *Chart* muestra el gráfico de la respuesta del órgano aislado correspondiente al tiempo en el eje de las abscisas y la fuerza (gms) en el eje de las ordenadas. Se dispone de más información la cual se explica a continuación:

**1.5.11.1** En el gráfico se muestra la respuesta obtenida (**flecha azul**), el registro el cual equivale a la Fuerza en gramos (**flecha verde**), la concentración de agonista utilizada en el tiempo correspondiente (**flecha negra**), cuando se realizó el lavado con la solución de Krebs o la concentración de antagonista o fármaco desconocido en la misma (**flecha roja**), el tiempo inicial en que se mostrará el gráfico (**flecha naranja**) y el tamaño de ventana equivalente al tiempo que se desea visualizar (**flecha amarilla**).



**1.5.12 Configuración experimental:** Dependiendo del tipo de tejido, se mostrará una representación del experimento real que incluye un registrador gráfico (*Chart Recorder*), fuerza del transductor (*Transductor Force*), estimulador (*Stimulator*), jeringa con antagonista (*Antagonist Syringe (1 ml)*), jeringa con agonista (*Agonist Syringe (1 ml)*), tejido (*Tissue*), válvula (*Valve*), reservorio de Krebs (*1000 ml Krebs Reservoir*), baño de órgano (*10 ml organ bath*), desbordamiento o desecho (*Overflow*), baño de agua calentada (*Heated Water Bath*) y el drenado (*Drain*).



**1.5.13 Fórmula de dilución:** Al momento de añadir un fármaco al baño de órgano, la concentración final del baño [CFB] en molaridad (M) se encuentra relacionada con la concentración de la solución stock (M), el volumen del stock añadida al baño (ml) y el volumen del baño (ml) dada la siguiente ecuación:

$$[CFB] = \frac{[stock] \times \text{Volumen de stock añadido}}{\text{Volumen del baño}}$$

El simulador permite la obtención de cualquier valor de la ecuación, siendo el volumen de la solución stock la incógnita más notable.

Para determinar este valor en el simulador, realizar los siguientes pasos:

1.5.13.1 Seleccionar la pestaña de *Dilution Formula* y en el apartado de *Result* seleccionar *Volume to Add* (volumen por añadir).

**Stock Soln. Conc. X Volume Added = Final Bath Conc. X Bath Volume**

**Result**

Volume to Add   X

**Calculate**

**Stock Soln. Conc. (M)**

1.5.13.2 Ingresar el volumen del baño de órgano (10 ml) o reservorio (1000 ml) según sea el caso, en la caja de *Bath Volume* (ml).

**Bath Volume (ml)**

1.5.13.3 Ingresar la concentración final del baño requerida en la caja de *Final Bath Conc.* (M).

**Final Bath Conc. (M)**

1.5.13.4 Ingresar la concentración de la solución stock en la caja *Stock Soln. Conc.* (M).

**Stock Soln. Conc. (M)**

1.5.13.5 Una vez que se tengan los datos anteriores, dar en el botón *Calculate* para calcular el resultado final; este será el volumen necesario por añadir en el baño de órgano o reservorio.

**Result**

Volume to Add

**Calculate**

## 1.6 EJEMPLO

Schaumann (1956), realizó un experimento con Atropina en diversas partes del intestino de cobayo, entre ellas el íleon. Él observó que la distensión del lumen también lleva a la contracción del músculo longitudinal por presencia de

acetilcolina. ¿Cuál será el efecto de la acetilcolina sobre el íleon de cobayo en el simulador de órgano aislado? ¿Cuál es la dosis efectiva 50 de la acetilcolina? ¿Qué le sucede al efecto de la acetilcolina en presencia de la atropina? ¿Cuál es el valor de  $pA_2$  de la atropina?

**1.6.1** Para formular el experimento y tener una idea de lo que Schaumann pudo observar, con ayuda del programa OBSim Simulator y una hoja de datos de Microsoft® Excel, después de haber instalado el programa como en los puntos 1.4 a 1.4.11 de este manual, seguir los pasos de los puntos 1.5.2 a 1.5.4 para colocar el experimento en nervio en íleon de cobayo.

**1.6.2** Utilizar valores de  $\frac{1}{4}$  de logaritmo,  $\frac{1}{2}$  de logaritmo y 1 logaritmo base 10 de forma ascendente para calcular las concentraciones de acetilcolina, quedando de la siguiente manera (Tabla 1):

*Tabla 1. Concentración molar deseada de acetilcolina a utilizar en íleon de cobayo.*

Concentración deseada de ACh(M)
1.00E-09
3.00E-09
6.00E-09
1.00E-08
3.00E-08
6.00E-08
1.00E-07
3.00E-07
6.00E-07
1.00E-06
3.00E-06
6.00E-06

**1.6.3** Con las concentraciones de la Tabla 1, calcular los volúmenes por agregar con la fórmula de dilución (punto 1.5.13) para lograr las concentraciones deseadas, recordar que el volumen máximo por añadir debe ser de 1.00 ml. En la siguiente imagen se ejemplifica el primer volumen por agregar con la fórmula de dilución, quedando de la siguiente manera:

**Stock Soln Conc. X Volume Added = Final Bath Conc. X Bath Volume**

Result

Volume to Add ▾

1 ml

Calculate

=

Final Bath Conc. (M)

1E-009 M

X

Bath Volume (ml)

10 ml

=

Stock Soln. Conc. (M)

1E-008 M

En la Tabla 2, el volumen por agregar (1 ml) de acetilcolina a partir de una solución stock con concentración de  $1E^{-08}$  M para tener una concentración deseada de  $1E^{-09}$  M, coincide con la calculada en la fórmula de dilución mostrada en la imagen previa. Los demás valores se han calculado siguiendo el mismo método, corroborar los datos de acuerdo con punto 1.6.3.

Tabla 2. Volúmenes por agregar de acetilcolina a partir de una concentración stock para lograr una concentración deseada.

Concentración deseada ACh(M)	Concentración Solución stock ACh (M)	Volumen por agregar ACh (ml)
1.00E-09	1E-8	1.00
3.00E-09	1E-7	0.30
6.00E-09	1E-7	0.60
1.00E-08	1E-7	1.00
3.00E-08	1E-6	0.30
6.00E-08	1E-6	0.60
1.00E-07	1E-6	1.00
3.00E-07	1E-5	0.30
6.00E-07	1E-5	0.60
1.00E-06	1E-5	1.00
3.00E-06	1E-4	0.30
6.00E-06	1E-4	0.60

**1.6.4** Una vez obtenidos los **volúmenes** necesarios para comenzar el experimento, dar clic en *Record*, lo cual iniciará el trazo de la respuesta en la pestaña de chart.

**1.6.5** Iniciado el trazo de la respuesta en el gráfico, añadir los valores calculados de volúmenes necesarios de acetilcolina de acuerdo con la Tabla 2.

Comenzando por el primer volumen, dar clic en *Add to Organ Bath* para añadir el primer valor de volumen de acetilcolina; concorde a la Tabla 2, este valor será de 1 ml. La concentración de acetilcolina utilizada se observará en la parte inferior del gráfico (punto 1.5.11.1).

**1.6.6** Dejar actuar por 20 segundos o el tiempo considerado para observar una respuesta y posteriormente dar clic en *Flush Reservoir to Bath* para eliminar la concentración añadida de acetilcolina en el punto 1.6.5.

**1.6.7** Proseguir con el siguiente volumen calculado en la Tabla 2. Añadir 0.30 ml de una concentración stock de  $1E^{-07}$  M para obtener una concentración deseada de  $3E^{-09}$  M de acetilcolina dando clic en *Add to Organ Bath*, esperar un tiempo considerable para observar la respuesta y eliminar la concentración añadida dando clic en *Flush Reservoir to Bath*, así sucesivamente hasta terminar con los valores de la Tabla 2.

**En resumen:**

- a) Calcular los valores de volumen por agregar de acetilcolina con respecto a una solución stock para lograr una concentración deseada.
- b) Colocar en la caja de agonista a *Acetylcholine*, en la caja de *Stock Soln*  $1E^{-8}$  M y en la caja de *Volume* 1.00 ml.
- c) Dar clic en *Record* para comenzar el experimento.
- d) Dar clic en *Add to Organ Bath* para añadir los volúmenes anteriormente calculados.
- e) Observar la respuesta que ejerza la concentración seleccionada y dejar que actúe aproximadamente 20 segundos, dependiendo del criterio para observar una respuesta.
- f) Dar clic en *Flush Reservoir to Bath* para eliminar la concentración de acetilcolina presente y poder proseguir con el siguiente valor; en este caso, colocar en la caja de *Stock Soln*.  $1E^{-07}$  y en la caja de *Volume* 0.30 ml, eliminar la concentración una vez se haya observado una respuesta y continuar con el siguiente volumen calculado hasta llegar a una gráfica como la siguiente:



1.6.9 Una vez que se tengan las respuestas registradas, se procederá a llenar la siguiente tabla (Tabla 3), quedando de la siguiente manera para uso de este ejemplo:

Tabla 3. Respuesta generada por acetilcolina en ileon de cobayo respecto a una concentración deseada.

Concentración deseada ACh(M)	Acetilcolina respuesta (g)
1.00E-09	0.24426
3.00E-09	0.93796
6.00E-09	1.6023
1.00E-08	2.5403
3.00E-08	5.0708
6.00E-08	8.2755
1.00E-07	9.7411
3.00E-07	11.793
6.00E-07	12.1784
1.00E-06	12.78
3.00E-06	13.004
6.00E-06	13.112

1.6.10 Con estos datos se puede graficar la respuesta frente a la concentración de la siguiente manera:

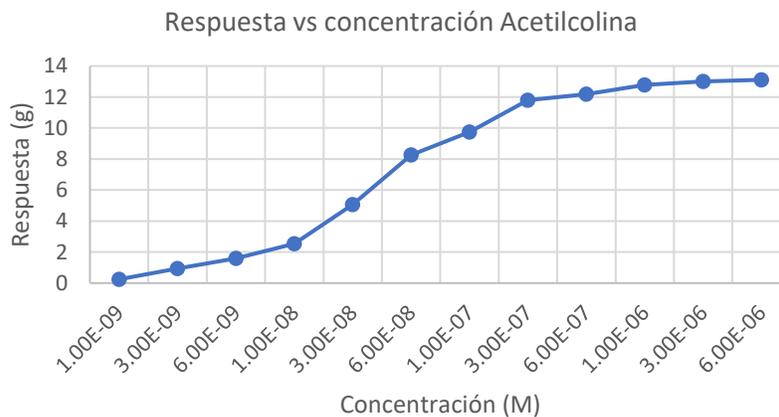


Gráfico 1. Respuesta generada por una concentración deseada de acetilcolina en ileon de cobayo.

1.6.11 Para obtener una línea de tendencia, la respuesta se pasa a porcentaje y la concentración se pasa a logaritmo base 10. Para calcular el porcentaje se toma como el 100% al valor más alto encontrado en la respuesta, quedando de la siguiente manera (Tabla 4):

Tabla 4. Logaritmo base 10 de concentración deseada de acetilcolina y efecto en porcentaje de la respuesta generada.

Concentración deseada ACh(M)	Log10(M)	Acetilcolina respuesta (g)	Efecto (%)
1.00E-09	-9	0.24426	1.862873703
3.00E-09	-8.522878745	0.93796	7.153447224
6.00E-09	-8.22184875	1.6023	12.22010372
1.00E-08	-8	2.5403	19.37385601
3.00E-08	-7.522878745	5.0708	38.67297132
6.00E-08	-7.22184875	8.2755	63.11394143
1.00E-07	-7	9.7411	74.29148871
3.00E-07	-6.522878745	11.793	89.94051251
6.00E-07	-6.22184875	12.1784	92.87980476
1.00E-06	-6	12.78	97.46796827
3.00E-06	-5.522878745	13.004	99.17632703
6.00E-06	-5.22184875	13.112	100

Graficando únicamente los valores de Log10 (M) y Efecto (%) de la Tabla 4, se obtiene la siguiente gráfica:

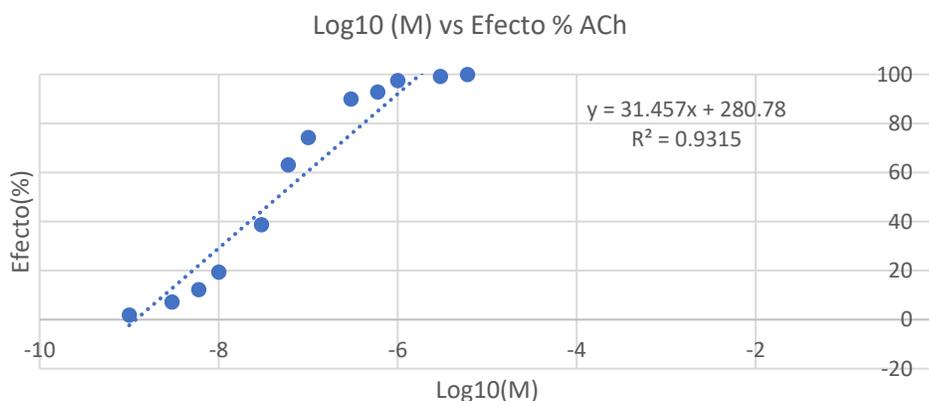


Gráfico 2. Log10 de concentración deseada de acetilcolina frente a efecto observado en porcentaje.

**1.6.12** Para obtener la *Dosis efectiva 50* (DE<sub>50</sub>), se debe interpolar con la ecuación de la recta el valor deseado para así conocer la concentración cuando se tiene un 50% de efecto. Para este ejemplo se calculará de la siguiente manera:

$$x = \frac{(50 - 280.78)}{31.457} = -7.3364$$

**1.6.13** Recordar que se está calculando con base a la línea de tendencia que se obtuvo por el porcentaje de respuesta y el logaritmo de la concentración, por lo que el valor de X estará dado en logaritmo. Para obtener el valor real de la concentración, se debe calcular el antilogaritmo del valor dado; en este caso:

$$10^{-7.3364} = 4.60931E^{-08}$$

Comprobado que la acetilcolina tiene un efecto en el íleon de cobayo, ahora se añade atropina al experimento.

Para este punto, añadir la concentración de 1 nM, 5 nM y 10 nM de atropina al reservorio. Únicamente se ejemplifica la primera concentración (1 nM), pero el procedimiento es el mismo para los dos siguientes.

**1.6.14** Siguiendo la misma metodología del punto 1.6.3 de este ejemplo, calcular el volumen por añadir de antagonista (Atr) al reservorio según la concentración deseada quedando de la siguiente manera; en la imagen se ejemplifica el primer volumen:

*Nota:* Observar que el valor dado en la caja de *Bath Volume (ml)* ahora es 1000 ml ya que se calcula para reservorio y no para baño de órgano (10 ml).

**Stock Soln Conc. X Volume Added = Final Bath Conc. X Bath Volume**

Result

Volume to Add v

1 ml

Calculate

=

Final Bath Conc. (M)

1E-009 M

X

Bath Volume (ml)

1000 ml

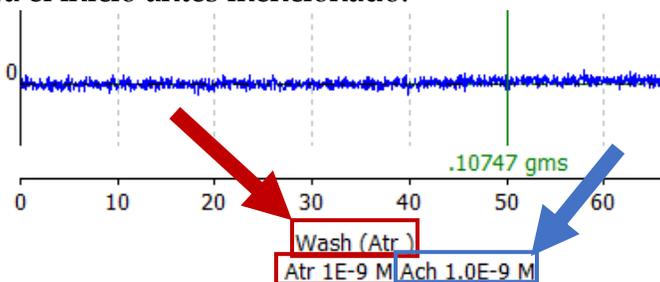
Stock Soln. Conc. (M)

1E-006 M

Tabla 5. Volúmenes por agregar de atropina a partir de una concentración stock para lograr una concentración deseada.

Concentración deseada Atr(M)	Concentración Solución stock Atr (M)	Volumen por agregar Atr (ml)
1.00E-09	1E-6	1.00
5.00E-09	1E-5	0.50
10.00E-08	1E-5	1.00

**1.6.15** La Tabla 5 muestra los valores calculados de los volúmenes por añadir al *Reservorio* para obtener la concentración deseada de atropina. Se trabaja con las mismas concentraciones de acetilcolina (1.00E-9, 3.00E-9, ... 6.00E-6), tener en cuenta que la atropina se encuentra en el medio de lavado, por lo que se comienza el experimento como en el punto 1.6.4 de este ejemplo y antes de añadir el agonista (acetilcolina) realizar un lavado con el antagonista (atropina) encontrado en el reservorio. Se ilustra el inicio antes mencionado:



Observar que se tiene un lavado con el antagonista (flecha y recuadro rojo) antes de administrar el agonista (flecha y recuadro azul). Continuar como en los puntos 1.6.5 a 1.6.7 de este ejemplo teniendo en cuenta que se trabaja con las concentraciones calculadas de atropina en el reservorio (Tabla 5).

El gráfico 3 ilustra únicamente los resultados de respuesta de acetilcolina en presencia de la primera concentración de atropina (Atr 1 nM) comparado con el Gráfico 1 del punto 1.6.10 de este ejemplo.

Realizar la misma metodología con los valores de atropina restantes de la Tabla 5 (Atr 5nM y Atr 10nM).

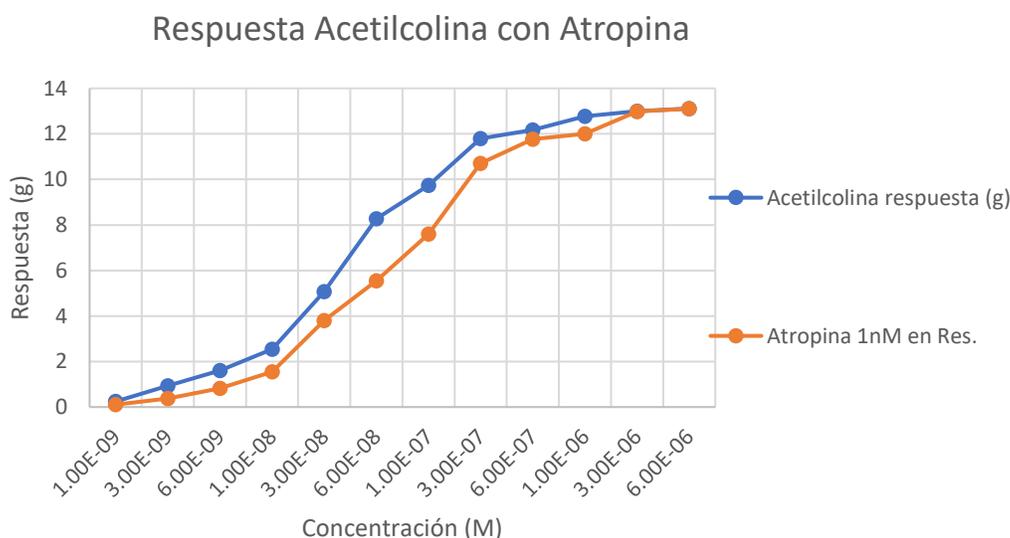


Gráfico 3. Respuesta de acetilcolina en presencia de atropina 1nM.

**1.6.16** Al igual que con la acetilcolina, para obtener una línea de tendencia se grafican las concentraciones del agonista en logaritmo base 10 y el porcentaje de la respuesta observada en el simulador como en el punto **1.6.11** de este ejemplo. Posteriormente, calcular la DE<sub>50</sub> como en el punto **1.6.12** de este ejemplo para las tres concentraciones definidas de atropina (Tabla 5).

**1.6.17** Calcular las DE<sub>50</sub> de agonista solo (A), y la DE<sub>50</sub> del agonista en presencia de antagonista (A'), así como la *Razón de dosis* (punto **1.6.18**).

Una vez obtenidos los datos anteriores, se pueden organizar como en la Tabla 6, la cual únicamente ejemplifica la DE<sub>50</sub> del agonista en presencia de antagonista (A'), por lo que se debe calcular la DE<sub>50</sub> del agonista solo.

Tabla 6. Concentración y respuesta de acetilcolina en presencia de atropina 1nM considerando el efecto en porcentaje y la dosis efectiva 50 en molaridad.

Concentración ACh(M)	Respuesta ACh con Atr 1nM en Res.	Efecto (%)	DE <sub>50</sub> (M) A'
1.00E-09	0.10747	0.819630872	7.65653E-08
3.00E-09	0.38105	2.906116534	
6.00E-09	0.83048	6.333740085	
1.00E-08	1.5535	11.84792556	
3.00E-08	3.8007	28.98642465	
6.00E-08	5.5496	42.32458816	
1.00E-07	7.6014	57.9728493	
3.00E-07	10.708	81.66564979	
6.00E-07	11.773	89.78798048	
1.00E-06	12.008	91.58023185	
3.00E-06	12.985	99.0314216	
6.00E-06	13.111	99.9923734	

**1.6.18** Con los datos de las DE<sub>50</sub> se obtiene la razón de dosis de la siguiente manera:

$$\frac{A'}{A} = \frac{7.65653E - 08}{4.6093E - 08} = 1.661100366$$

El valor de A' es la DE<sub>50</sub> de la concentración del agonista (ACh) en presencia de antagonista (Atr) (Tabla 6) y el valor de A es la DE<sub>50</sub> de la concentración de agonista (ACh) solo, es decir, sin ningún antagonista presente. El valor de A' debe obtenerse tres veces debido a las tres concentraciones diferentes de antagonista con las que se trabaja (Atr 1nM, 5nM y 10nM).

**1.6.19** Ahora se tienen los valores suficientes para poder calcular el valor de  $pA_2$ . Se muestra la Tabla 7 con las dosis de atropina añadidas, razón de dosis, y valores necesarios para encontrar el valor de  $pA_2$ , y el Gráfico 4 correspondiente a la representación de Schild, la cual provee una ecuación de la recta obteniendo la ordenada al origen que concierne al valor  $pA_2$  buscado:

Tabla 7. Dosis de antagonista, razón de dosis, logaritmo negativo base 10 de la dosis del antagonista y logaritmo base 10 de la razón de dosis junto con el valor  $pA_2$ .

Dosis de Antagonista Atr M (B)	A'/A	(-) log B	log (A'/A -1)	$pA_2$
1.00E-09	1.661100366	9	0.179732603	7.4088
5.00E-09	3.598649751	8.301029996	0.414747749	
1.00E-08	5.588919537	8	0.661710443	

Representación de Schild para el cálculo de  $pA_2$

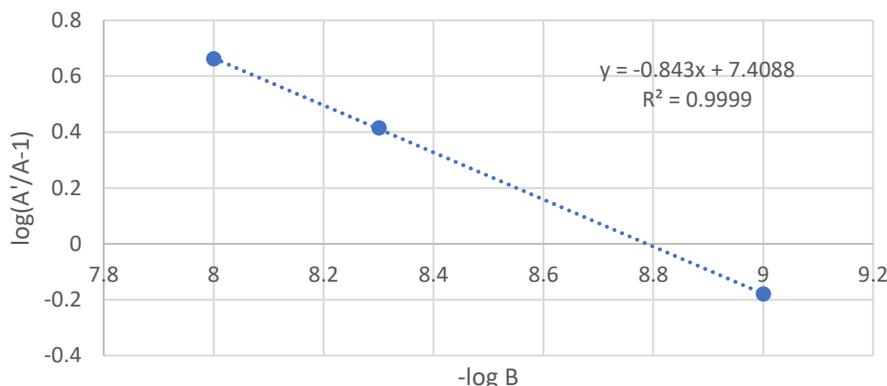


Gráfico 4. Representación de Schild para el cálculo de  $pA_2$ .

Tomar en cuenta que se están graficando los valores de  $\log(A'/A-1)$  logaritmo base 10 de Razón de dosis y  $-\log B$  logaritmo negativo base 10 de concentración de dosis de antagonista, para obtener una ecuación de la recta. La ordenada al origen será el valor de  $pA_2$  buscado.

## 1.7 EJERCICIOS

- 1) Hill y colaboradores (1977) describieron la unión específica de mepiramina a receptores histamínicos en el músculo mientérico del plexo longitudinal de intestino de cobayo. Descubrieron que existe una unión específica a estos receptores.
  - a) ¿Cómo elaboraría su propio experimento para determinar que hay una relación entre la mepiramina y los receptores histamínicos? Para esta pregunta considere las concentraciones de agonista de la Tabla 1 (1.00E-9, 3.00E-9, ... 6.00E-6), y de antagonista de la Tabla 5 (1.00E-09, 5.00E-09, 10.00E-08) del ejemplo del punto 1.6.

- b) ¿Se presenta algún tipo de antagonismo entre la mepiramina y la histamina? ¿De qué tipo?
- c) ¿Cuál es la  $DE_{50}$  de la histamina?
- d) ¿Cuáles son los valores de  $DE_{50}$  de la mepiramina y las razones de dosis?
- e) ¿Cuál es el valor de  $pA_2$  de la mepiramina? Explica el significado de este valor.
- 2) Ward & Takemori (1976) midieron la tolerancia que ejercía la morfina en el íleon de cobayo estimulándolo para lograr una visualización de los resultados. Consideraron a la naloxona como antagonista.
- a) ¿Cómo elaboraría su propio experimento para corroborar que hay una relación entre la morfina y los receptores narcóticos? Para esta pregunta considere las concentraciones de agonista de la Tabla 1 (1.00E-9, 3.00E-9, ... 6.00E-6), y de antagonista de la Tabla 5 (1.00E-09, 5.00E-09, 10.00E-08) del ejemplo del punto 1.6.
- b) ¿Qué tipo de antagonismo se presenta entre la morfina y la naloxona?
- c) ¿Cuál es la  $DE_{50}$  de la histamina?
- d) ¿Cuáles son los valores de  $DE_{50}$  de la morfina y las razones de dosis?
- e) ¿Cuál es el valor de  $pA_2$  de la naloxona? Explica el significado de este valor.
- 3) A un estudiante de QFB de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, le pidieron realizar un experimento con toxina botulínica B para corroborar si se unía a diferentes receptores encontrados en el íleon de cobayo. Se pidió que se utilizara como agonista y antagonista en diversos casos. Para el primer caso utilice cualquiera de los 5 antagonistas encontrados en el programa OBSim. Para el segundo caso utilice cualquiera de los 7 agonistas encontrados en el programa OBSim.
- a) De acuerdo con el antagonista que haya elegido ¿Cómo elaboraría su propio experimento para utilizar a la toxina botulínica B como agonista? Para esta pregunta considere las concentraciones de agonista de la Tabla 1 (1.00E-9, 3.00E-9, ... 6.00E-6), y de antagonista de la Tabla 5 (1.00E-09, 5.00E-09, 10.00E-08) del ejemplo del punto 1.6.
- b) ¿Se presenta algún tipo de antagonismo entre la toxina botulínica B y el antagonista seleccionado? ¿De qué tipo?
- c) ¿Cuál es la  $DE_{50}$  de la toxina botulínica B?
- d) ¿Cuáles son los valores de  $DE_{50}$  de la toxina botulínica B y las razones de dosis?
- e) ¿Cuál es el valor de  $pA_2$  del antagonista seleccionado? Explica el significado de este valor.

- f) De acuerdo con el agonista que haya elegido ¿Cómo elaboraría su propio experimento para utilizar a la toxina botulínica B como antagonista? Para esta pregunta considere las concentraciones de agonista de la Tabla 1 (1.00E-9, 3.00E-9, ... 6.00E-6), y de antagonista de la Tabla 5 (1.00E-09, 5.00E-09, 10.00E-08) del ejemplo del punto 1.6.
- g) ¿Se presenta algún tipo de antagonismo entre la toxina botulínica B y el agonista seleccionado? ¿De qué tipo?
- h) ¿Cuál es la  $DE_{50}$  del agonista seleccionado?
- i) ¿Cuáles son los valores de  $DE_{50}$  del agonista seleccionado y las razones de dosis?
- j) ¿Cuál es el valor de  $pA_2$  de la toxina botulínica B? Explica el significado de este valor.

## Capítulo 2. DOCKING MOLECULAR ENTRE AINEs Y COXs CON AUTODOCK VINA EN WINDOWS 10.

Al hablar del desarrollo de nuevos fármacos, generalmente se siguen utilizando estudios de seguridad y eficacia basados en la experimentación animal. Desafortunadamente, este tipo de experimentación conlleva problemas desde costos, problemas éticos y morales, tiempo y la seguridad y eficacia en términos prolongados. Según la FDA (Food and Drug Administration) más del 90 por ciento de moléculas nuevas con presunta actividad farmacológica llegan a ser rechazadas, ya que mostraron buena actividad en animales, pero cuando son aplicadas en humanos pueden llegar a mostrar diferentes efectos. El alto índice de enfermedades, resistencia microbiana, aparición de nuevos virus, entre otras, hacen que cada día se propongan nuevos fármacos, por lo que las problemáticas de los métodos tradicionales de experimentación animal hacen que estos sean más complicados de llevar a cabo. (Burke et al., 2007; Doke & Dhawale, 2015; Lipinski et al., 2001). Así ha ido creciendo el interés de desarrollar aproximaciones farmacológicas que reduzcan, refinen o reemplacen estos métodos para salvar tiempo y dinero en el proceso del desarrollo farmacéutico (Balls, 1994; Sliwoski et al., 2014).

En farmacología, el docking es una alternativa *in silico* a las problemáticas con los métodos de experimentación animal, ya que permite predecir la afinidad entre ligandos y receptores en el sitio de acción de estos (Ekins et al., 2007). El docking es un método que estima la orientación preferida por un ligando entre varias orientaciones al momento de establecer un complejo con un receptor y buscar la conformación más estable (Figura 3), convirtiéndose así en uno de los métodos más frecuentemente utilizados en el desarrollo farmacéutico en etapas tempranas, debido a su habilidad de predecir dichas conformaciones y afinidades (Gohlke et al., 2000; Leach et al., 2006).

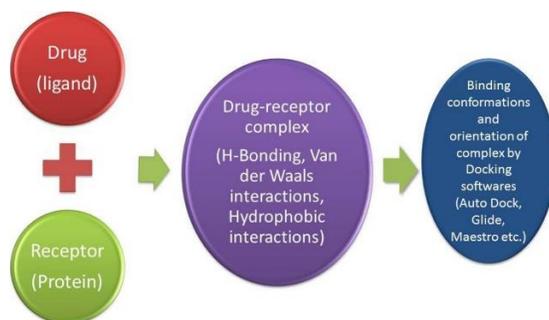


Figura 3. Resumen abstracto de la técnica de Docking. Extraído de (Gupta et al., 2018).

Diversas instituciones tanto académicas como gubernamentales promueven el desarrollo y uso del docking durante el proceso de desarrollo de fármacos. Se puede

ver su aplicación por los artículos publicados acerca del mismo (Figura 4). Así diversos fármacos pueden ser evaluados en ámbitos como seguridad y eficacia a costos menores en breves periodos de tiempo (Chen & Zhi, 2001; Festing, 1994).

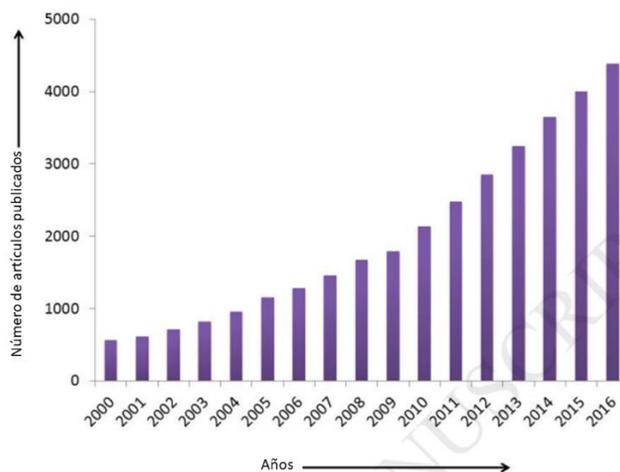


Figura 4. Número de artículos publicados del año 2000 a 2017. Información extraída de Pubmed. Modificado de (Gupta et al., 2018)

Sin embargo, se deben tomar en cuenta diversos factores con respecto al docking como la delimitación exacta del sitio de acción del receptor, la posición u orientación del ligando y sobre todo pensar que únicamente se está estudiando la afinidad ligando-receptor, por lo que no es posible comprobar si funcionará como agonista, antagonista o si el tiempo que pueda durar esa interacción promueve alguna de estas reacciones (Abagyan & Totrov, 2001; Gupta et al., 2018; Klebe, 2006).

## 2.1 CICLOOXIGENASAS (COX)

Las prostaglandina-endoperóxido sintetasas (PGHSs), también conocidas como ciclooxigenasas (COXs), catalizan la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas  $H_2$ , el precursor de prostaglandinas proinflamatorias y tromboxanos (Figura 5). Se han identificado dos isoformas de las COX derivadas COX-1 y COX-2. Estas intervienen en diversos eventos fisiológicos como regulación de funciones renales y mantenimiento de la mucosa estomacal (COX-1) al igual que desencadenan efectos como fiebre, inflamación y dolor (COX-2) (Chen, 2010; Kurumbail et al., 2001; Sidhu et al., 2010).

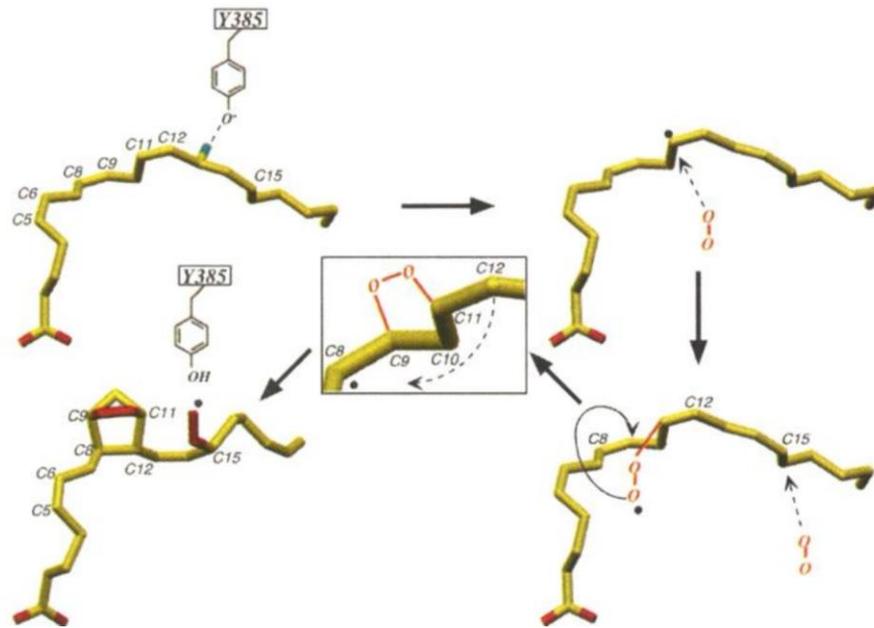


Figura 5. La abstracción de un hidrogeno al ácido araquidónico (AA) por la Tyr-385 de la ciclooxigenasa forma un radical, provocando la migración de este al C-11 del AA, lo que conlleva a la reacción con la ciclooxigenasa regenerando el radical y la formación de prostaglandinas (Rouzer & Marnett, 2009). Imagen recuperada de (Malkowski et al., 2000).

La COX-1 es expresada en la mayoría de los tejidos ya que es requerida para la producción de prostaglandinas involucradas en diferentes funciones de mantenimiento a través del cuerpo. La COX-2 es una enzima inducible, encontrada principalmente en cerebro y riñones, la cual es expresada en respuesta de citocinas, mitógenos y endotoxinas (Luong et al., 1996; Picot et al., 1994).

Estructuralmente ambas enzimas son muy parecidas, sin embargo, el sitio activo de la COX-2 es más largo y ligeramente diferente de la COX-1. Principalmente, se debe a la diferencia en tres aminoácidos: Ile523 por Val523, Ile423 por Val434 y His513 por Arg513 en COX-1 y COX-2 respectivamente.

Veinticuatro residuos de aminoácidos conforman el sitio activo de las COXs los cuales incluyen Leu117, Arg120, Phe205, Phe209, Val344, Ile345, Tyr348, Val349, Leu352, Ser353, Tyr355, Leu359, Phe381, Leu384, Tyr385, Trp387, Phe518, Ile/Val523 (COX-1 y COX-2 respectivamente), Gly526, Ala527, Ser530, Leu531, Gly533 y Leu534 (DeWitt & Smith, 1988; Lecomte et al., 1994; Loll et al., 1995; Luong et al., 1996; Picot et al., 1994).

## 2.2 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs)

Los sitios activos de la COX-1 y COX-2 pueden ser inhibidos por la interacción de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los cuales compiten con el ácido araquidónico (Figura 6). La composición de los aminoácidos en el sitio de acción influye en la acción catalítica de las COX, por ejemplo, la Ser530 es el residuo por el

cual el ácido acetil salicílico (aspirina) realiza su acetilación inhibiendo su acción (DeWitt & Smith, 1988; Lecomte et al., 1994; Loll et al., 1995) y la Arg120 se une a los carboxilatos de ácidos grasos e igualmente a varios AINEs (DeWitt & Smith, 1988; Kalgutkar et al., 2000; Lecomte et al., 1994; Loll et al., 1995; Rowlinson et al., 1999; Rowlinson et al., 2003; Smith & Dewitt, 1996; Smith et al., 1996).

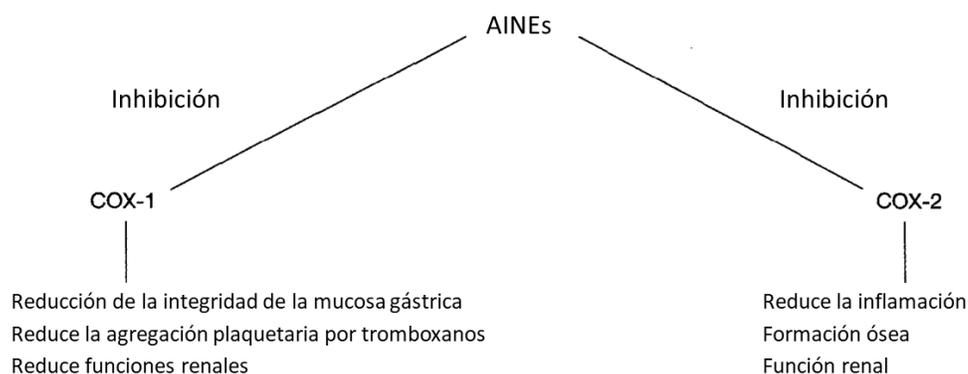


Figura 6. Mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Modificado de (Green, 2001).

Principalmente, existen dos puntos a tomar en cuenta al momento de hablar de AINEs. El primero, existen dos clases de AINEs: clásicos, que pueden inhibir COX-1 y COX-2 por igual (<1995) (Laneuville et al., 1994) e inhibidores selectivos de COX-2 (DeWitt, 1999; Rowlinson et al., 1999).

El segundo, mientras que todos los AINEs por igual compiten con el ácido araquidónico por el sitio activo de las COX, cada AINE presenta un modo cinético diferente al momento de realizar su inhibición: (a) unión reversible (ibuprofeno); (b) unión lentamente reversible derivada por alta afinidad (flurbiprofeno); o (c) unión reversible seguida de una modificación covalente en algún residuo de aminoácido (casi siempre acetilación en Ser530) (aspirina) (DeWitt, 1999; Rowlinson et al., 1999; Smith & Dewitt, 1996; Smith et al., 2000; Smith et al., 1996).

### 2.3 PROGRAMAS POR UTILIZAR Y SU INSTALACIÓN

Para realizar el docking molecular se utilizarán diversos programas, enumerados en los siguientes puntos, los cuales son complementarios entre sí.

Los requisitos mínimos que requiere el sistema son:

Sistema Operativo: Windows 10 o posterior

Procesador: Intel Core i5 5th gen/AMD Ryzen 3, o posterior

Memoria: 4 Gb RAM, o superior

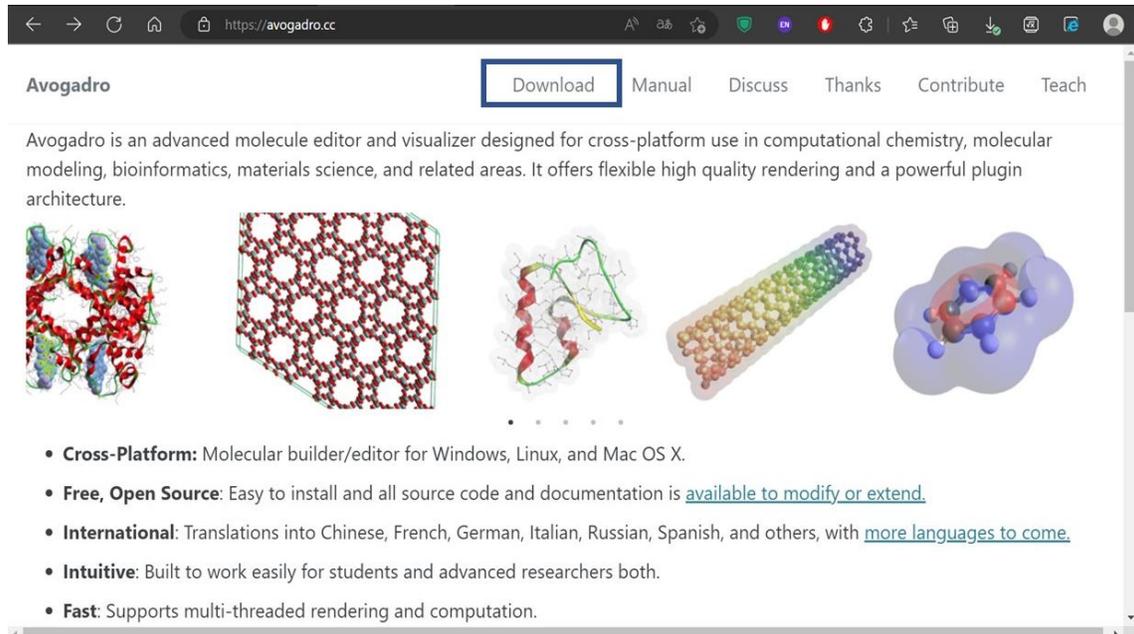
Gráficos: Tarjeta integrada gráfica o superior

Almacenamiento: 4 Gb o superior

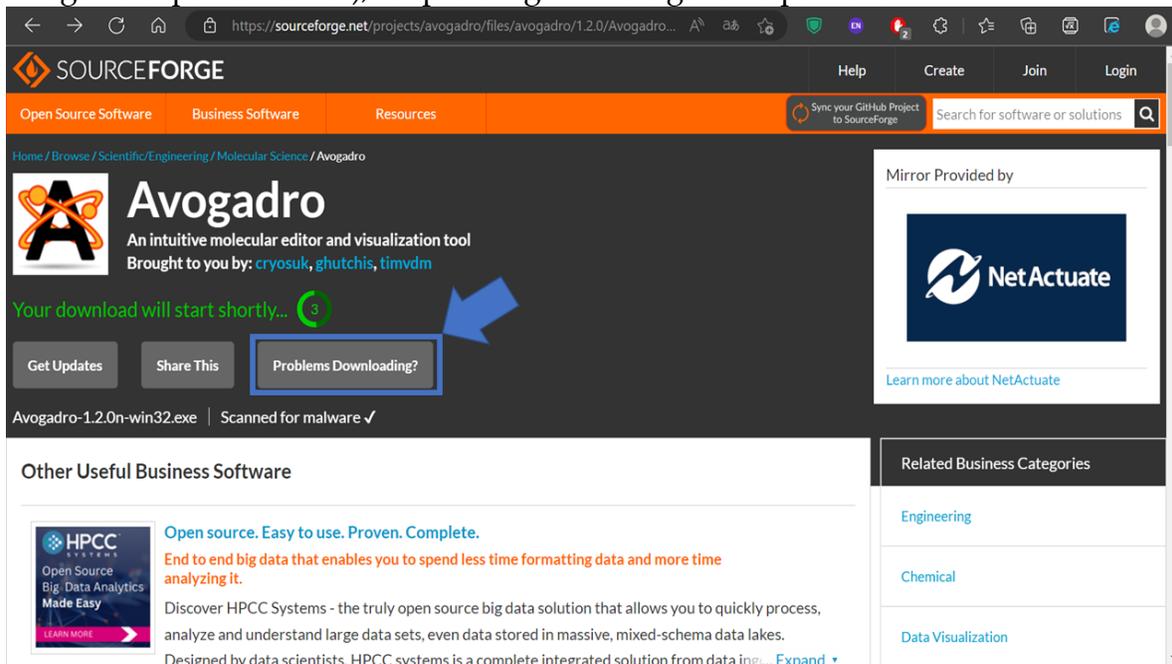
### 2.3.1 Instalación del programa Avogadro (Hanwell et al., 2012)

2.3.1.1 Acceder a la siguiente liga de internet dando clic en el enlace:  
<https://avogadro.cc/>

Lo que conducirá a la siguiente pantalla:

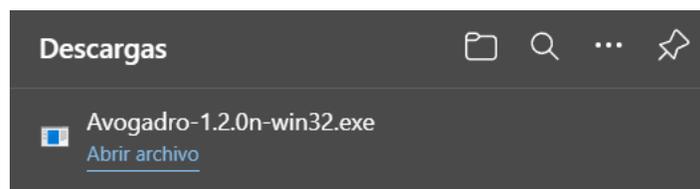


2.3.1.2 A continuación, dar clic en el apartado de “Download” (recuadro azul de la imagen del punto 2.3.1.1), lo que dirigirá a la siguiente pantalla:

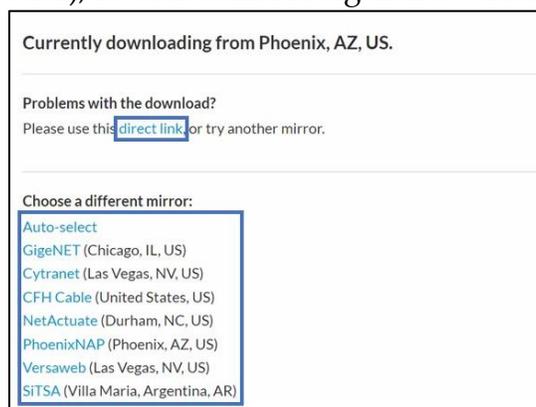


Automáticamente comenzará la descarga del archivo instalable “Avogadro-1.2.0n-win32.exe” (no importa si se trabaja en un sistema operativo de 32 o 64 bits, correrá

de la misma manera), visualizar en el sitio de descargas del explorador utilizado para internet:

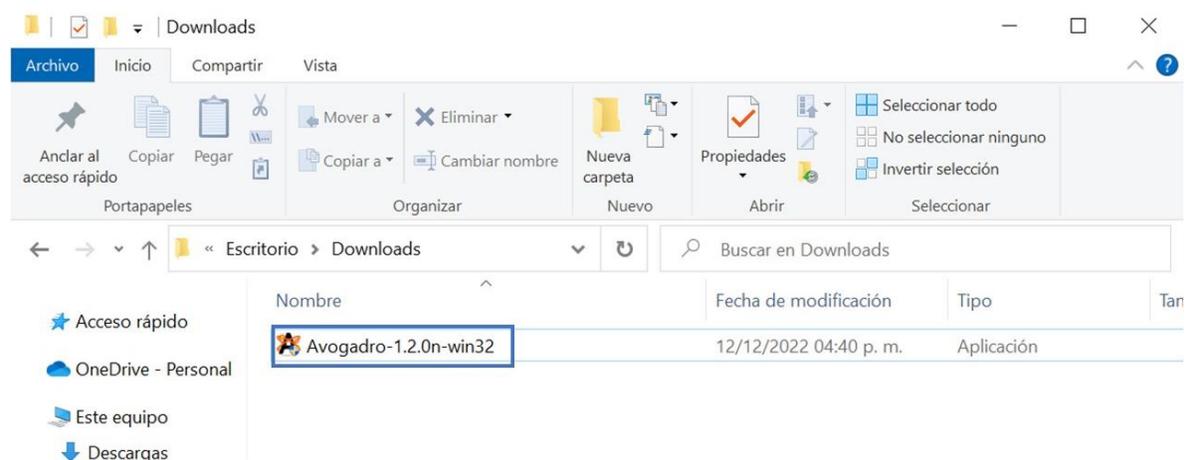


**2.3.1.3** Si no se descarga por sí solo el archivo instalable, en la ventana del punto **2.3.1.2**, dar clic en el apartado “Problems Downloading?” (flecha y recuadro azul de la imagen del punto **2.3.1.2**), lo cual abrirá la siguiente ventana:

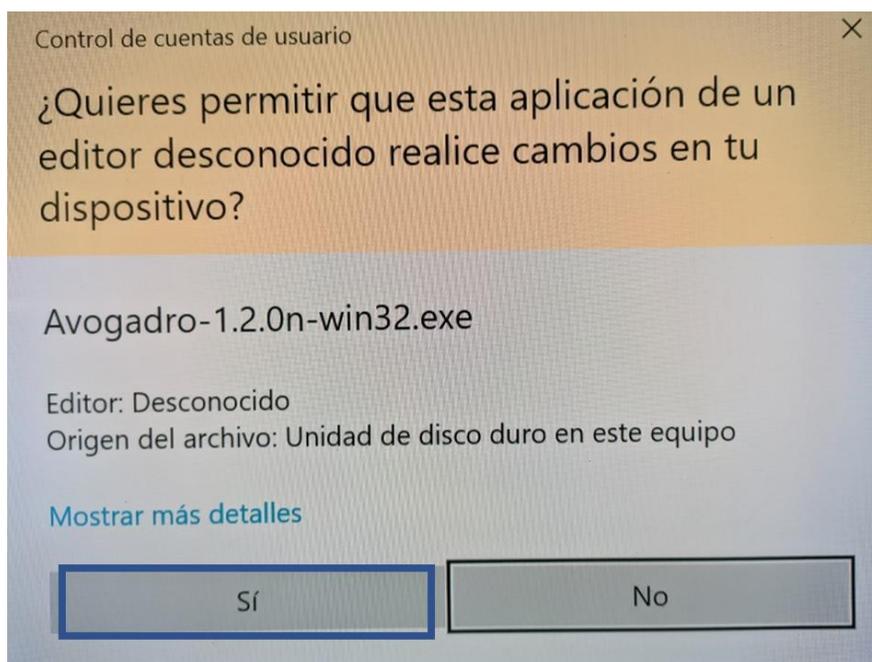


Dar clic en cualquiera de las opciones en los recuadros azules y eso debería descargar el archivo instalable del paso **2.3.1.2**.

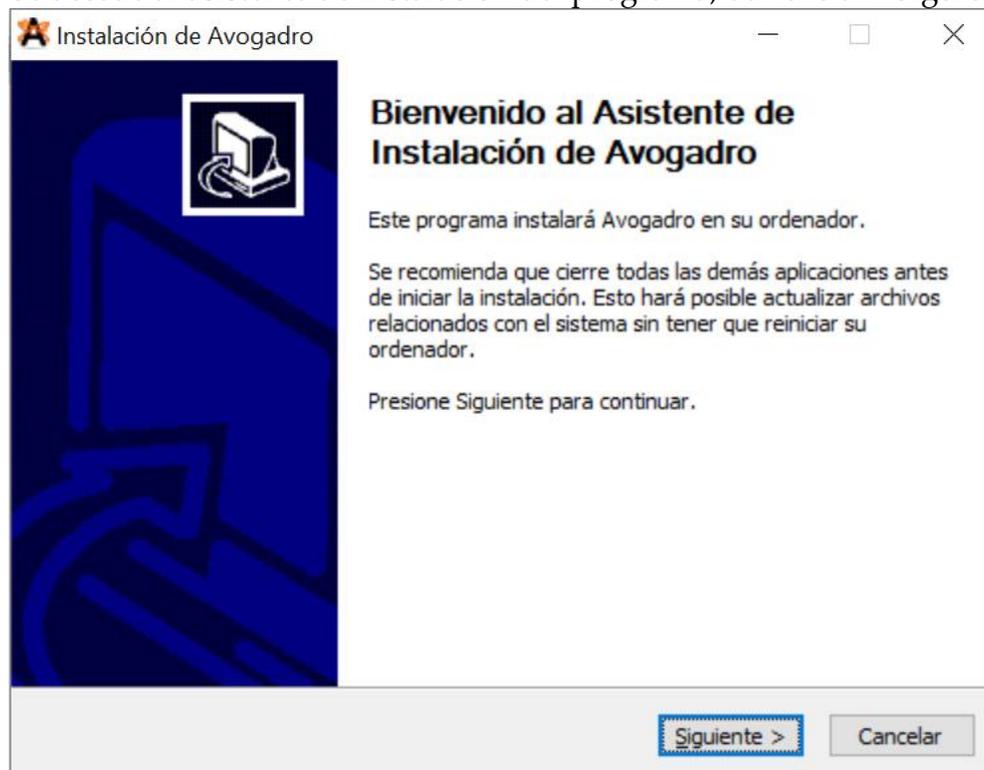
**2.3.1.4** En la carpeta destinada a descargas, encontrar el archivo instalable, dar doble clic sobre el ejecutable “Avogadro-1.2.0n-win32.exe” (recuadro azul):



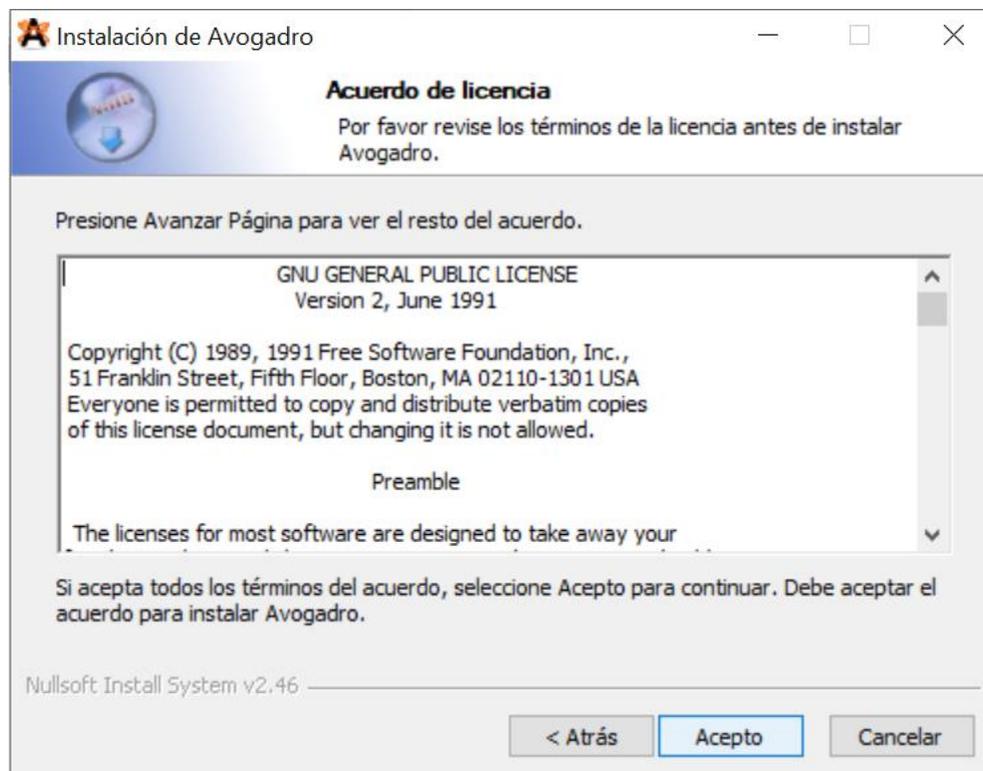
2.3.1.5 Pedirá permisos para instalar esta aplicación, dar en la opción “Sí” (recuadro azul):



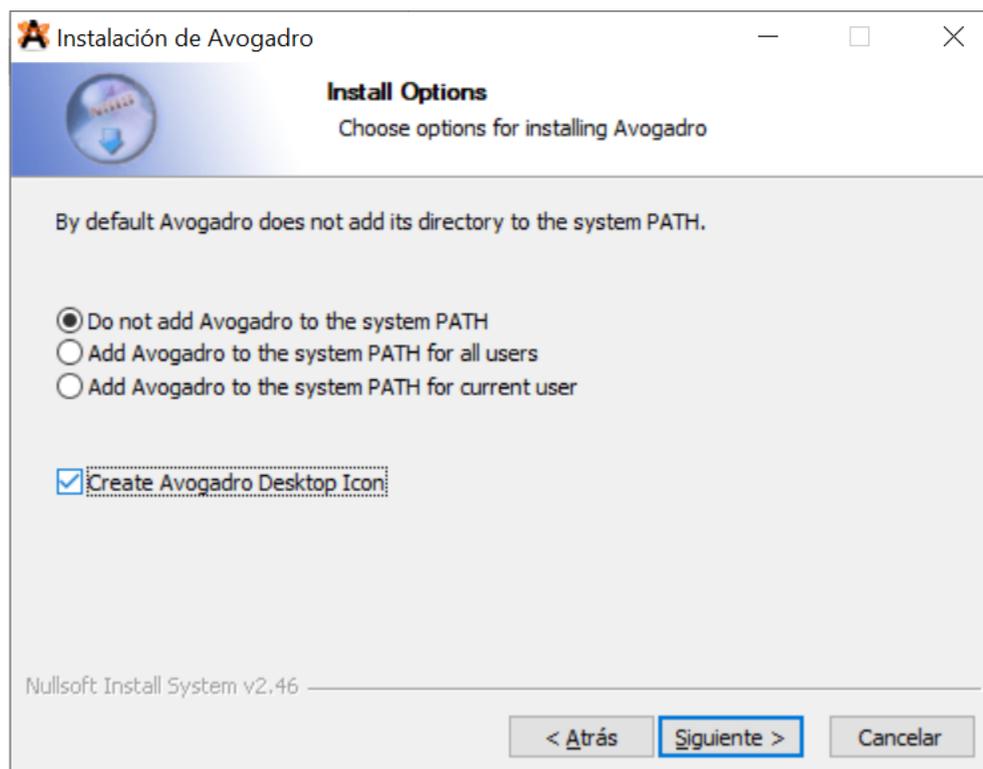
2.3.1.6 Se accede al asistente de instalación del programa, dar clic en “Siguiete >”:



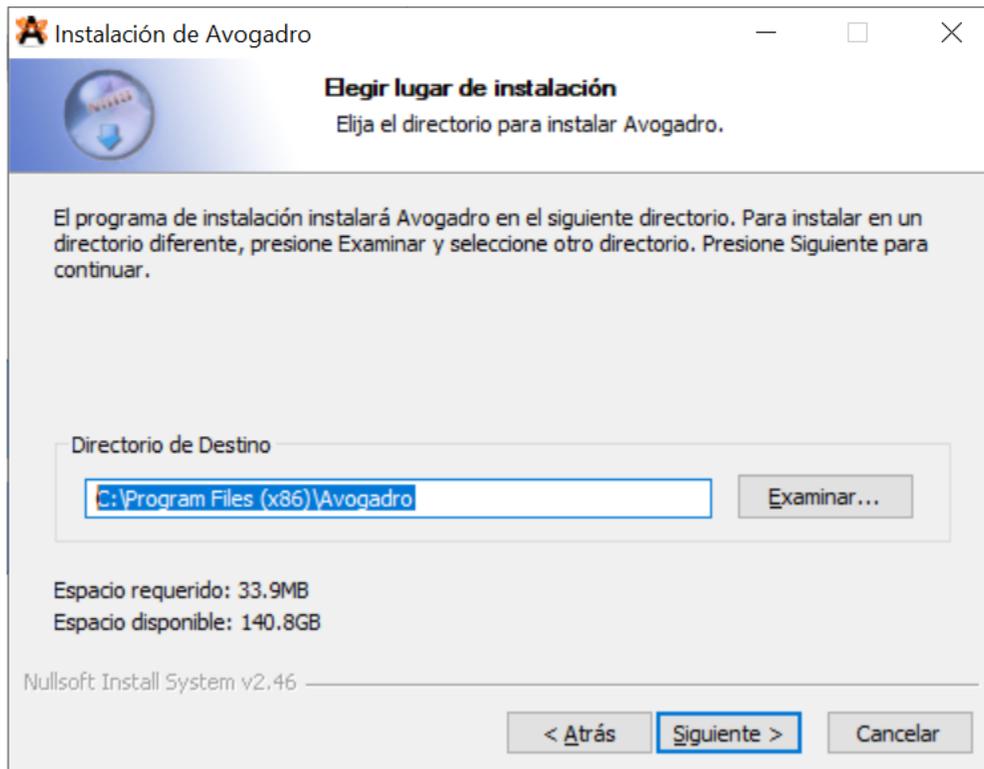
Luego, en “Acepto”:



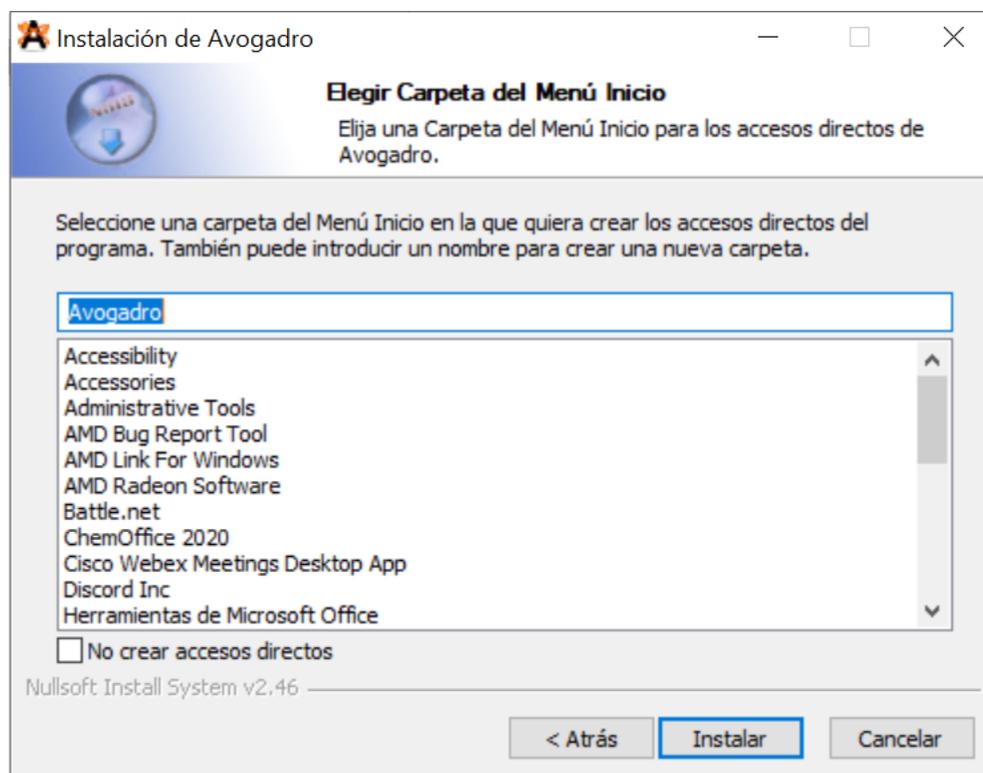
Dejar por defecto la opción “Do not add Avogadro to the system PATH” y marcar la casilla “Create Avogadro Desktop Icon” (recuadro y palomilla azul) y dar clic en “Siguiete >”:



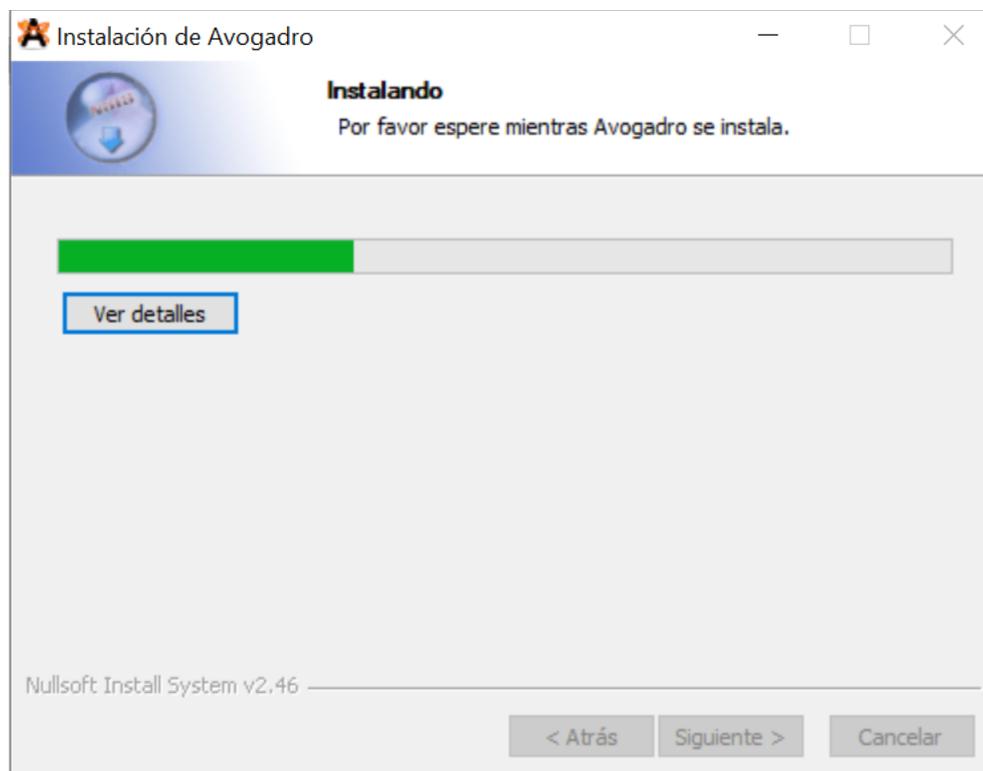
Elegir el directorio de destino donde se instalará el programa, por defecto el programa se instala en la dirección preestablecida del disco duro principal (regularmente C:) “C:\Program Files (x86) \Avogadro”. Si se requiere instalarlo en otra dirección escribir la ruta deseada en el recuadro azul y posteriormente dar clic en “Siguiente >”:



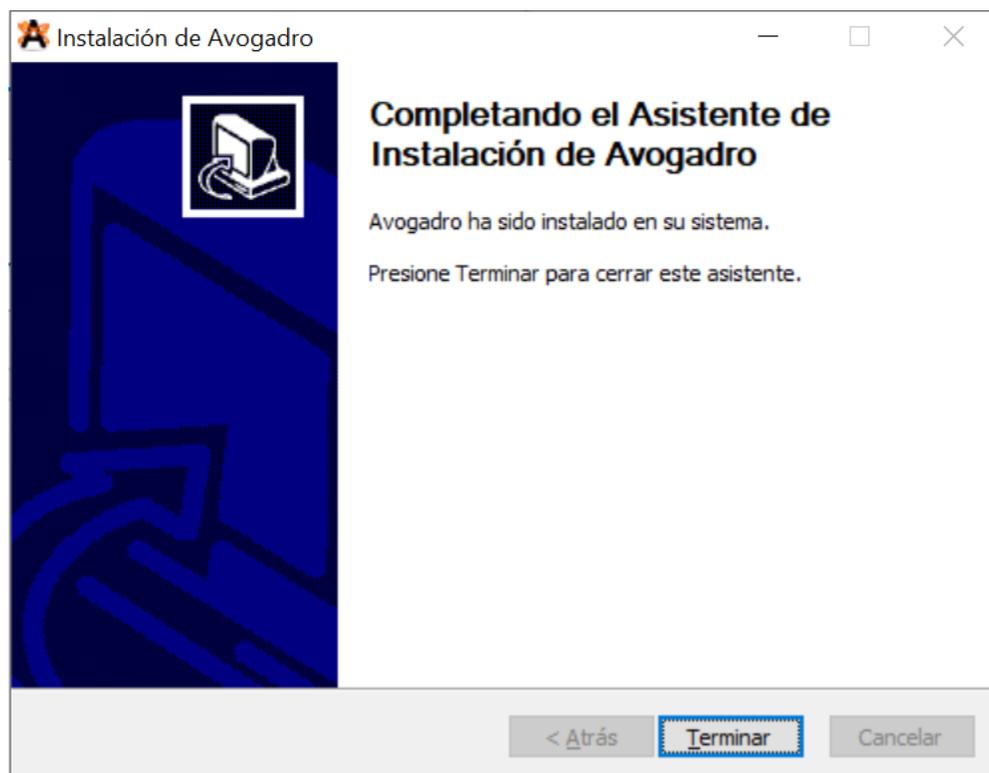
Deberá elegir una carpeta del menú de inicio por lo que se puede dejar por defecto y dar clic en “Instalar”:



Empezará el proceso de instalación según las órdenes dadas anteriormente:



Una vez terminado el proceso, dar clic en “Terminar” para cerrar el asistente de instalación:



En el presente manual se verán funciones básicas del programa, por lo que acceder a la siguiente liga proporcionará un conocimiento más amplio del programa:

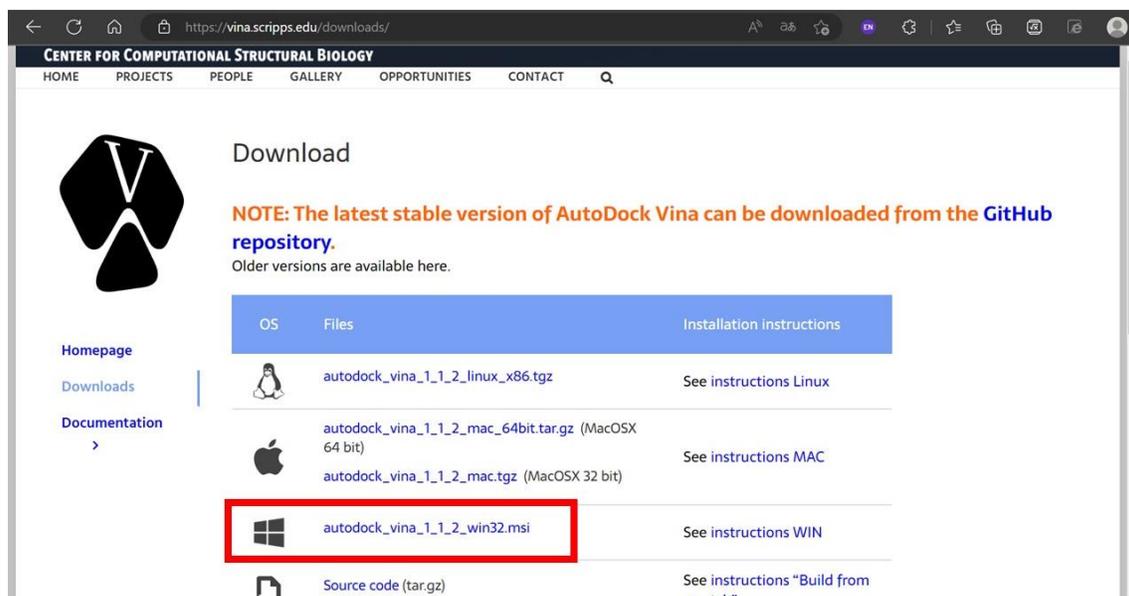
<https://avogadro.cc/docs/>

### **2.3.2 Instalación del programa AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010)**

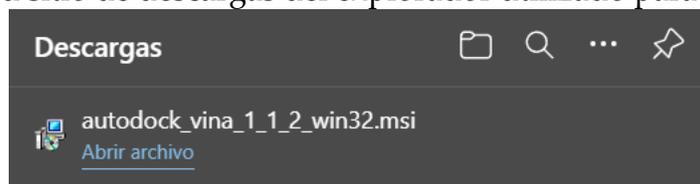
**2.3.2.1** Acceder a la siguiente liga de internet dando clic en el enlace:

<https://vina.scripps.edu/downloads/>

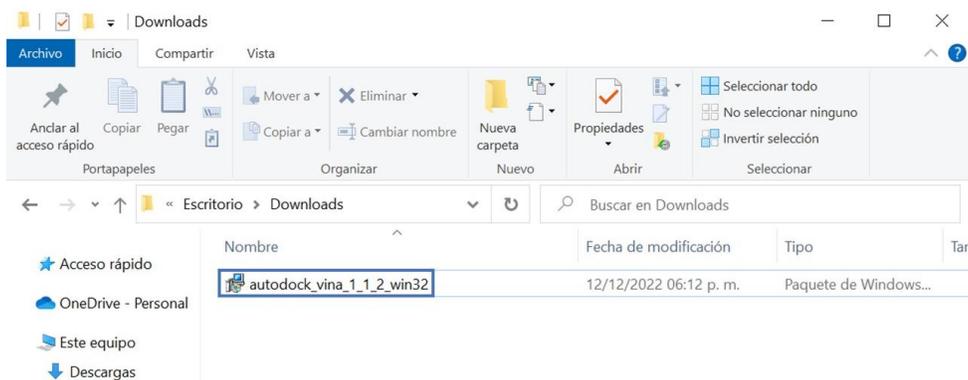
Lo que conducirá a la siguiente pantalla:



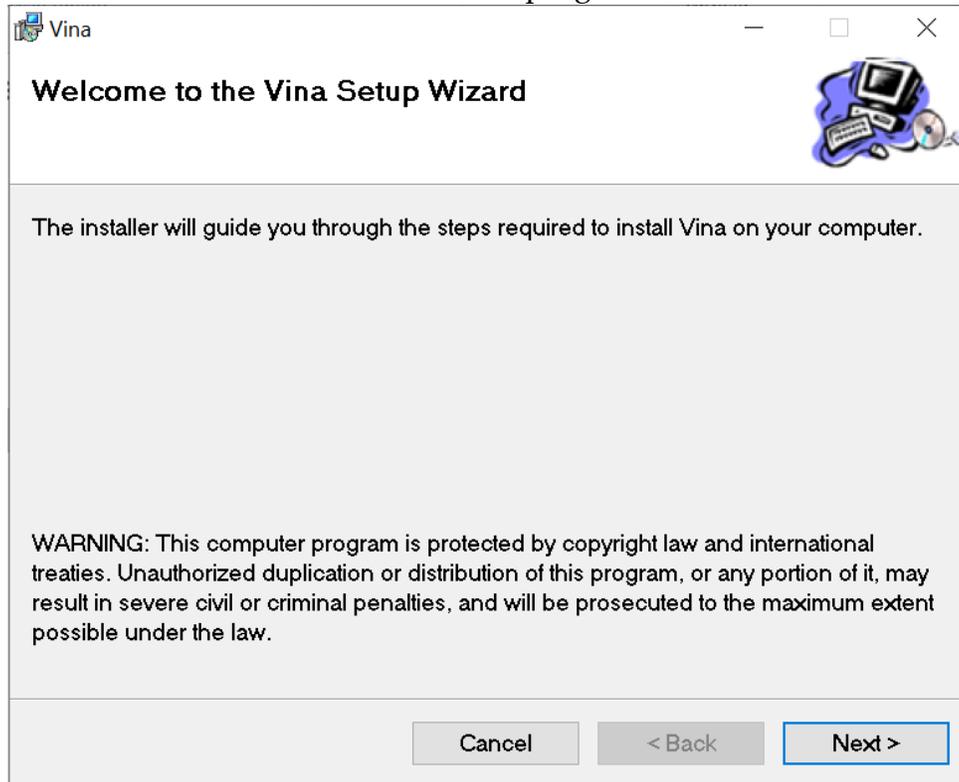
2.3.2.2 A continuación, dar clic en el apartado de “autodock\_vina\_1\_1\_2\_win32.msi” (recuadro rojo de la imagen del punto 2.3.2.1). Automáticamente comenzará la descarga del archivo instalable “autodock\_vina\_1\_1\_2\_win32.msi” (si se trabaja en un sistema operativo de 64 bits correrá de la misma manera). Una vez descargado se visualiza en su sitio de descargas del explorador utilizado para internet:



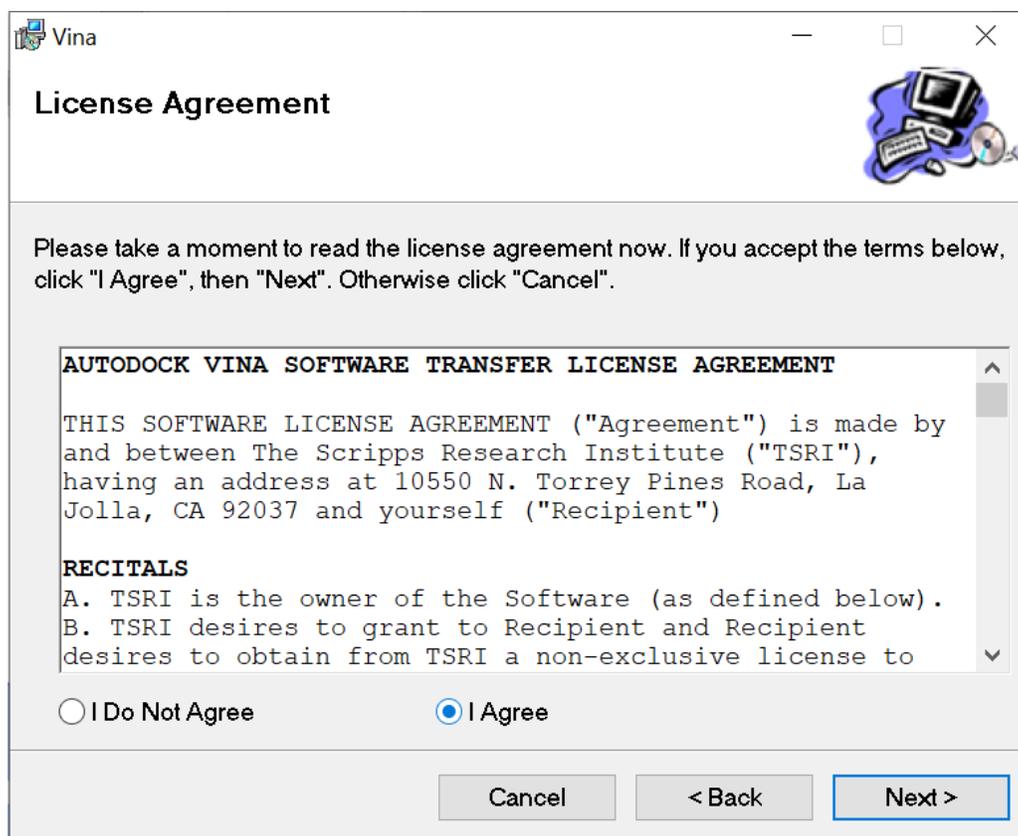
2.3.2.3 En la carpeta de descargas, encontrar el archivo instalable, dar doble clic sobre el ejecutable “autodock\_vina\_1\_1\_2\_win32.msi” (recuadro azul):



2.3.2.4 Accede al asistente de instalación del programa, dar clic en “Next >”:



Luego dar clic en “I Agree” (circulo azul) y después en “Next >”:

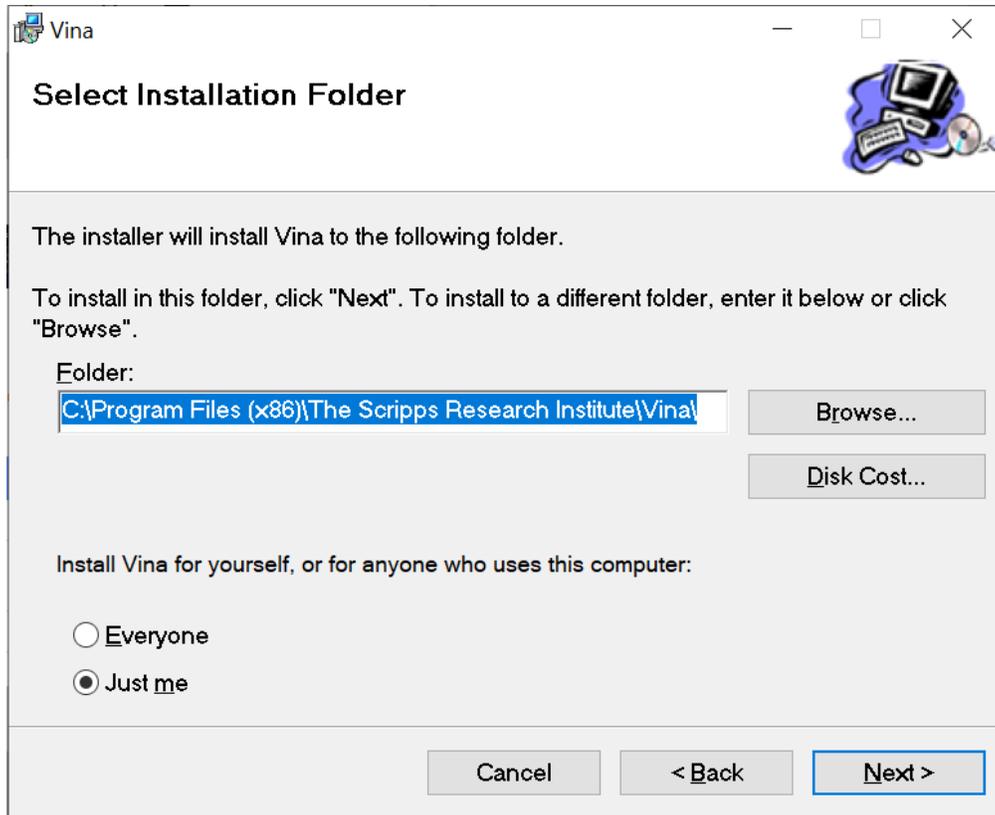


El siguiente paso es muy importante, ya que pide especificar, en "Folder:" (ruta coloreada de azul), una ruta de instalación del programa.

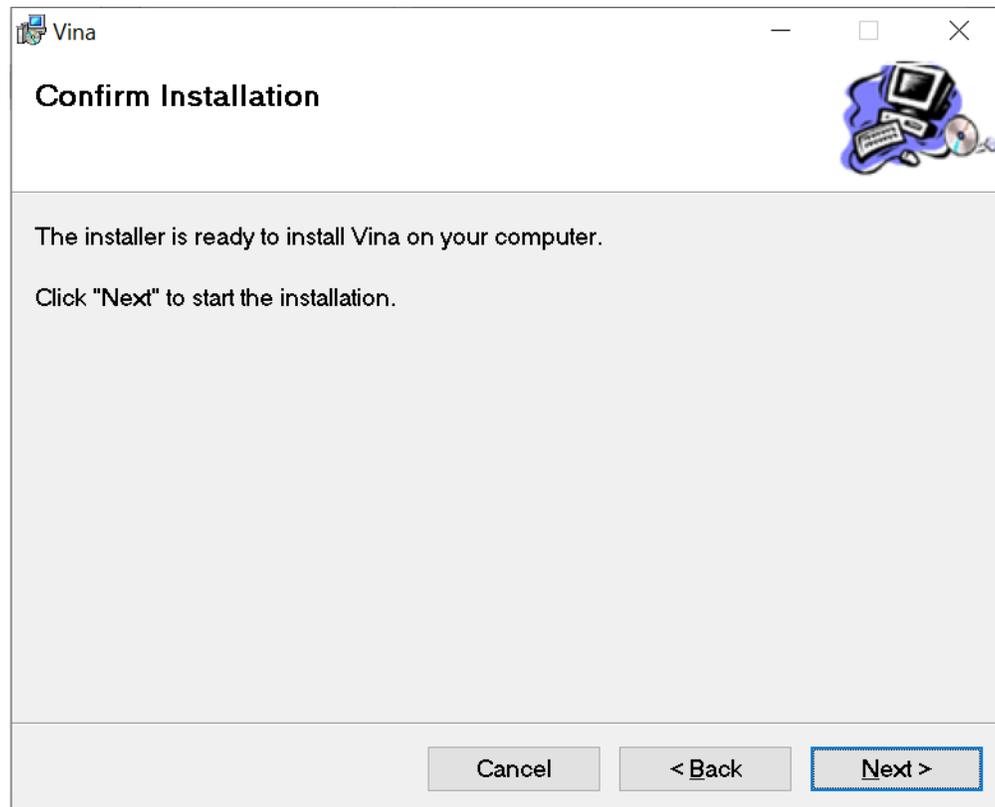
AutoDock Vina se compone por tres archivos, es importante asignar una ruta de acceso la cual se recuerde fácilmente. En este ejemplo se conservará la ruta de instalación como viene por defecto "C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\", posteriormente, acceder a la misma ruta para visualizar los archivos que se instalaron.

En la otra opción, seleccionar "Everyone" para instalar los archivos en todos los usuarios del equipo de cómputo o seleccionar "Just me" para el usuario actualmente en uso.

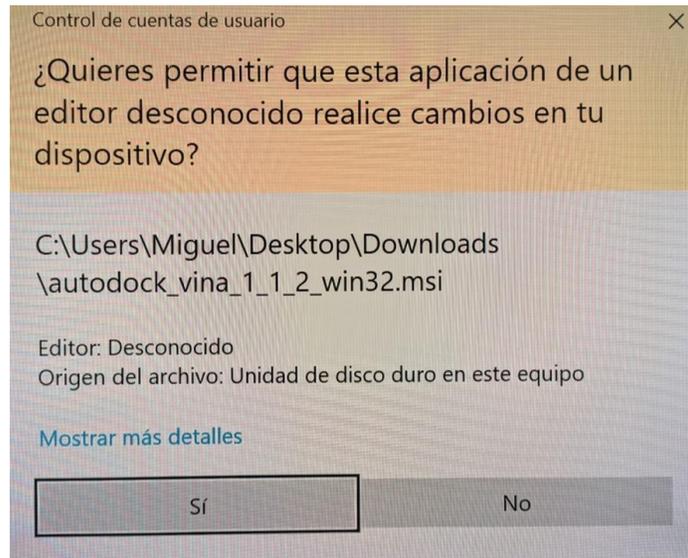
Recordando la importancia de tener clara la ruta donde se especificará la instalación, dar clic en "Next >":



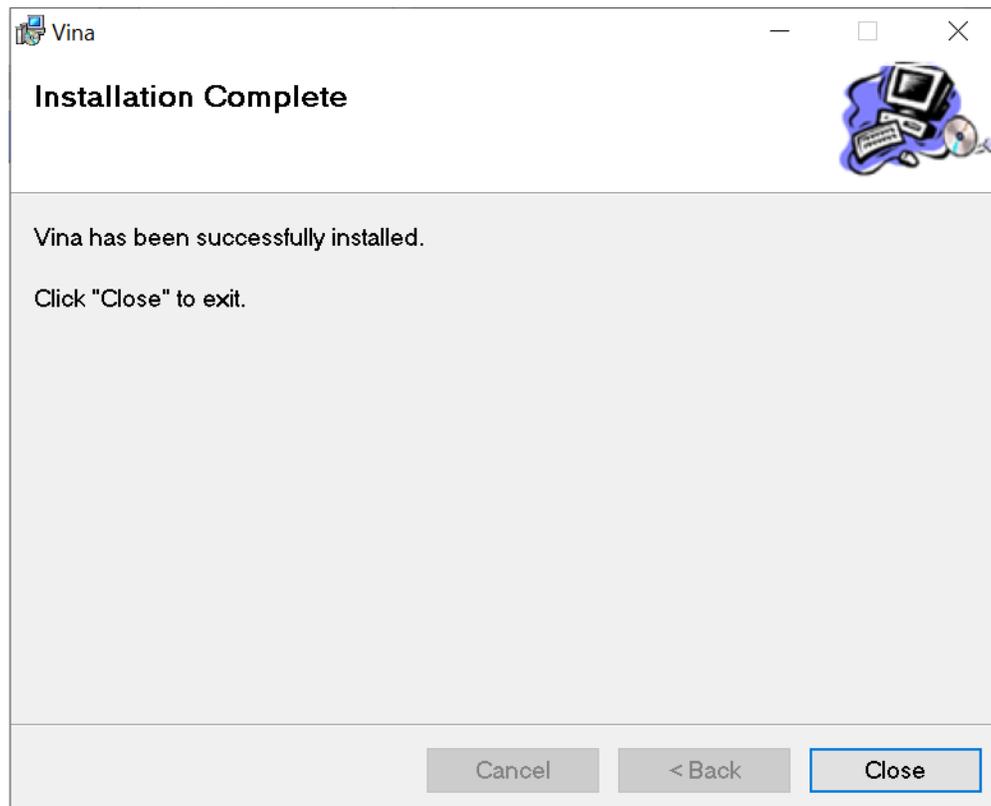
Luego dar clic en “Next >” para comenzar la instalación:



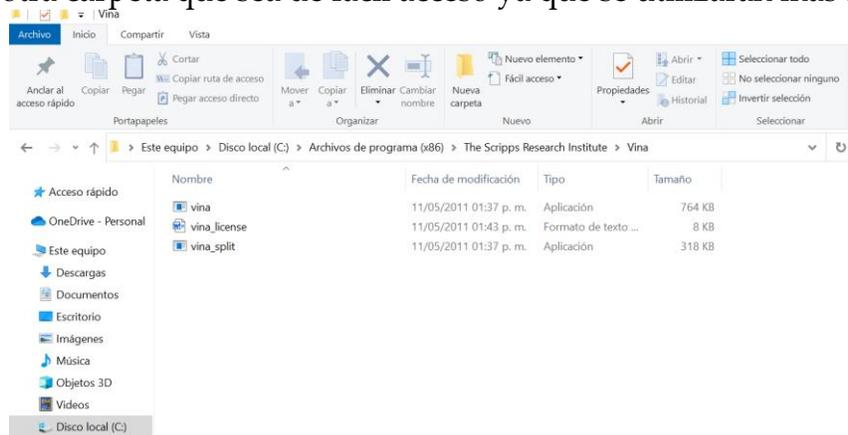
Pedirá permisos para instalar esta aplicación, dar clic en la opción “Sí” (recuadro negro)



Una vez terminado el proceso saltará la pantalla de término del asistente de instalación. Ahora dar clic en “Close” para cerrar el asistente de instalación:



**2.3.2.5** Siguiendo la ruta de instalación del punto **2.3.2.4** donde quedó instalado (C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\), encontrar los tres archivos mencionados anteriormente, “vina.exe”, “vina\_license.txt” y “vina\_split.exe”, conviene tener esta carpeta con algún acceso directo o copiar estos archivos a otra carpeta que sea de fácil acceso ya que se utilizarán más adelante:



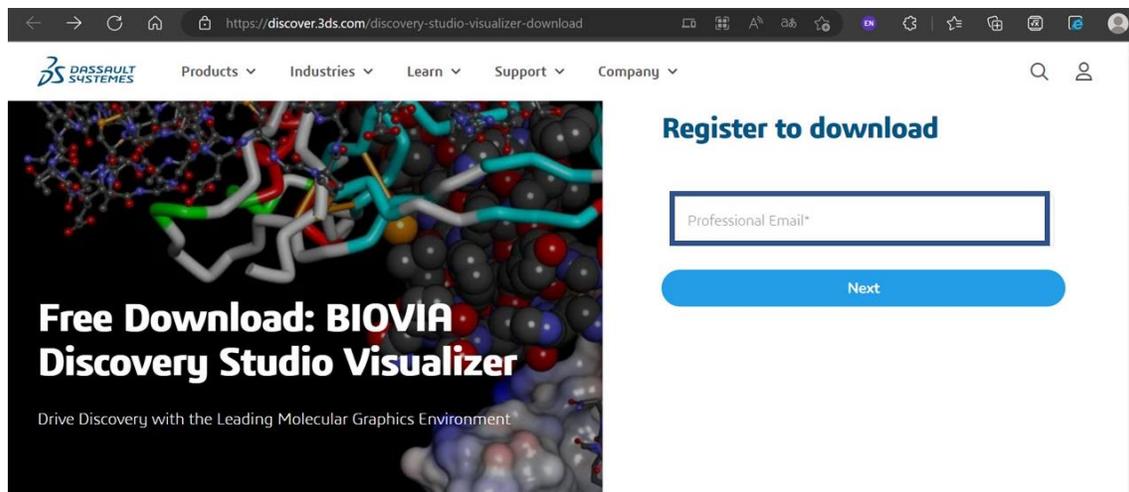
En el presente manual se verán funciones básicas del programa, por lo que acceder a la siguiente liga proporcionará un conocimiento más amplio del programa:

<https://vina.scripps.edu/manual/>

## 2.3.3 Instalación del programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer

**2.3.3.1** Acceder a la siguiente liga de internet dando clic en el enlace: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>

Lo que conducirá a la siguiente pantalla:



El programa pedirá un correo electrónico para descargar el programa (recuadro azul), debería utilizar el correo institucional, pero utilizar de otro dominio no afecta en el registro, posteriormente, dar clic en “Next” (botón azul).

**2.3.3.2** Después, llenar un formulario con la siguiente información; nombre, apellido, compañía (puede ser UAM), país, ciudad y un número de teléfono de 10 dígitos (sólo se utiliza como registro). Verificar que se marca la casilla de “I acknowledge and agree...” y luego dar clic en Submit (botón azul)

**Register to download**

Click here if you are not qfb\*\*\*\*\*@gmail.com

STEP 2 OF 2

First Name\*

Last Name\*

Company\*

Mexico

City\*

+52 022 123 4567

I acknowledge and agree that my personal data will be processed according to 3DS's Privacy Policy and I am informed that for business purposes 3DS may share them with trusted stakeholders (including Dassault Systèmes and SolidWorks business partners and events sponsors as detailed in the registration forms).

Submit

**2.3.3.3** Para descargar el cliente, dar clic en “Download” (recuadro y botón azul) debajo del texto “DS Visualizer Client (Windows 64 bit)”.

← ↻ 🏠 🔒 https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download-thank-you 🔍 🌐 🔄 📄 📧

**Thank you for your interest!**

You can download the most recent version by clicking the link below.

If you experience any issues downloading the files please try switching to another web browser program.

Please note that DS Visualizer is a free resource that is not supported by the BIOVIA Support Team. Instead, DS Visualizer is supported solely by the Discovery Studio user forum on the BIOVIA Community.

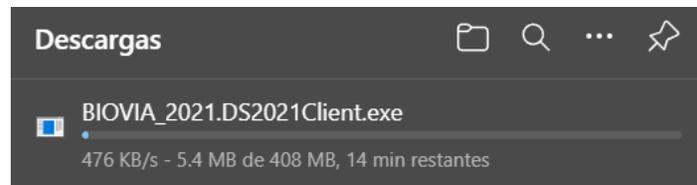
[Link to End User License Agreement \(EULA\)](#)

Should you have any questions about purchasing Discovery Studio, please contact a BIOVIA representative at [BIOVIA\\_Marketing@3ds.com](mailto:BIOVIA_Marketing@3ds.com).

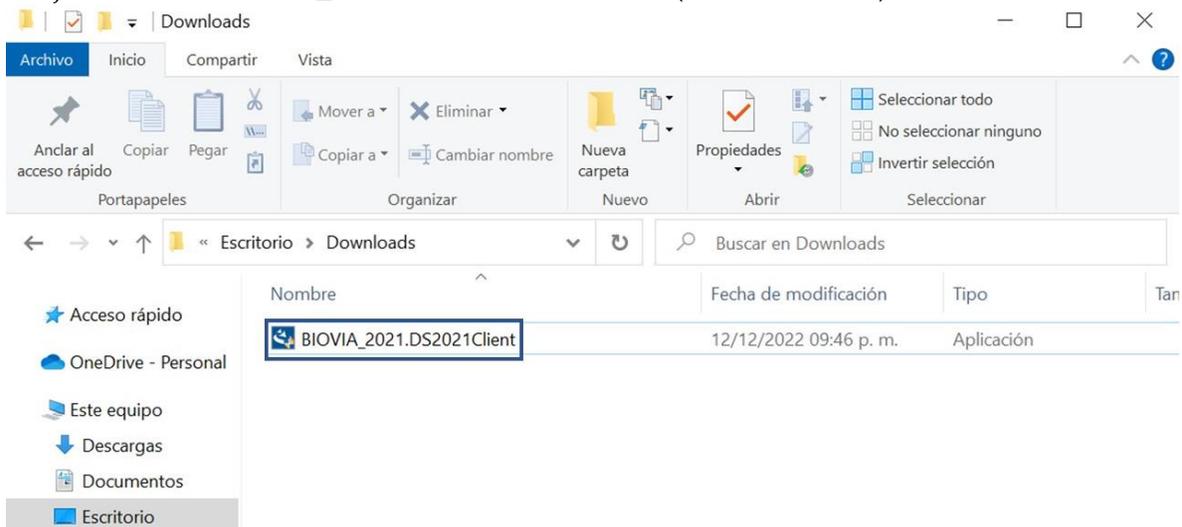
DS Visualizer Client (Windows 64 bit) [Download](#)

DS Visualizer Client (Linux 64 bit) [Download](#)

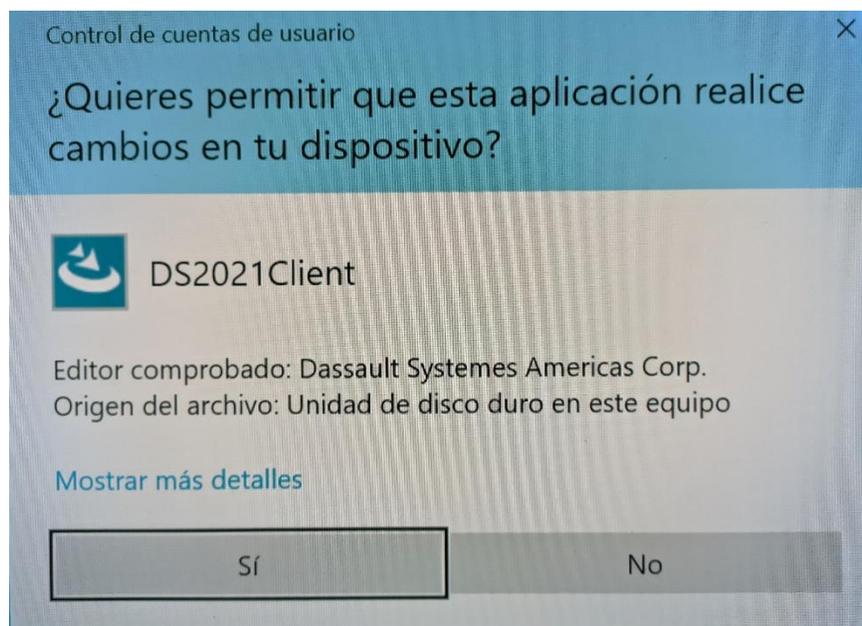
Automáticamente comenzará la descarga del archivo instalable “BIOVIA\_2021.DS2021Client.exe”, visualizar el archivo descargado en el sitio de descargas del explorador utilizado para internet:



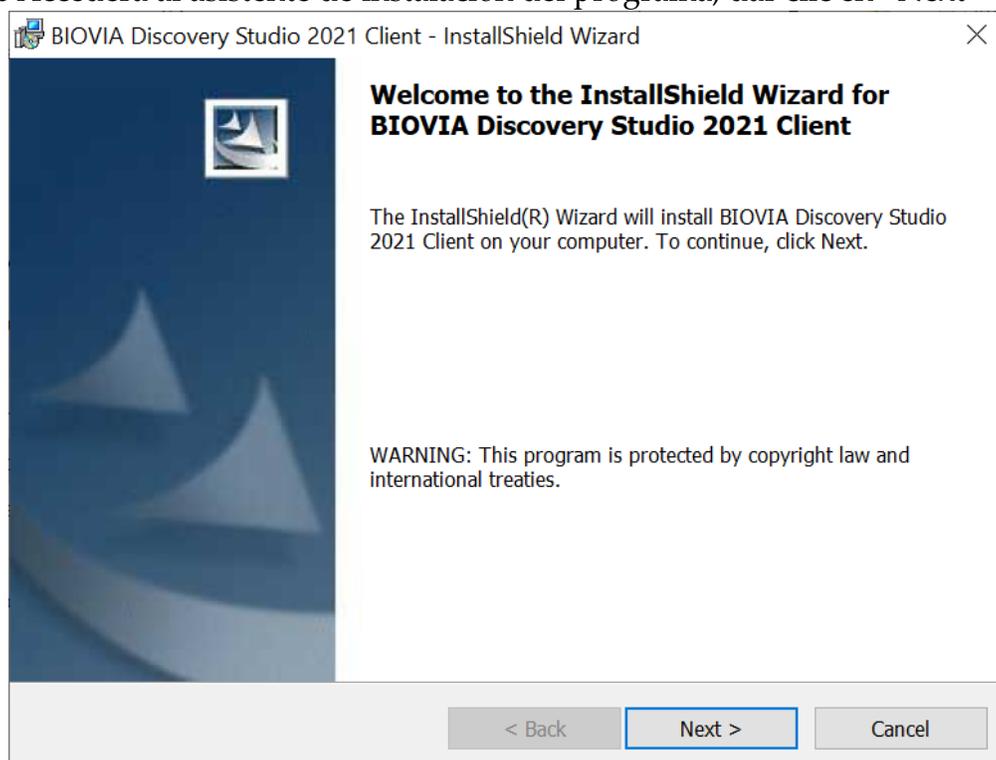
**2.3.3.4** En la carpeta de descargas, encontrar el archivo instalable, dar doble clic sobre el ejecutable “BIOVIA\_2021.DS2021Client.exe” (recuadro azul):



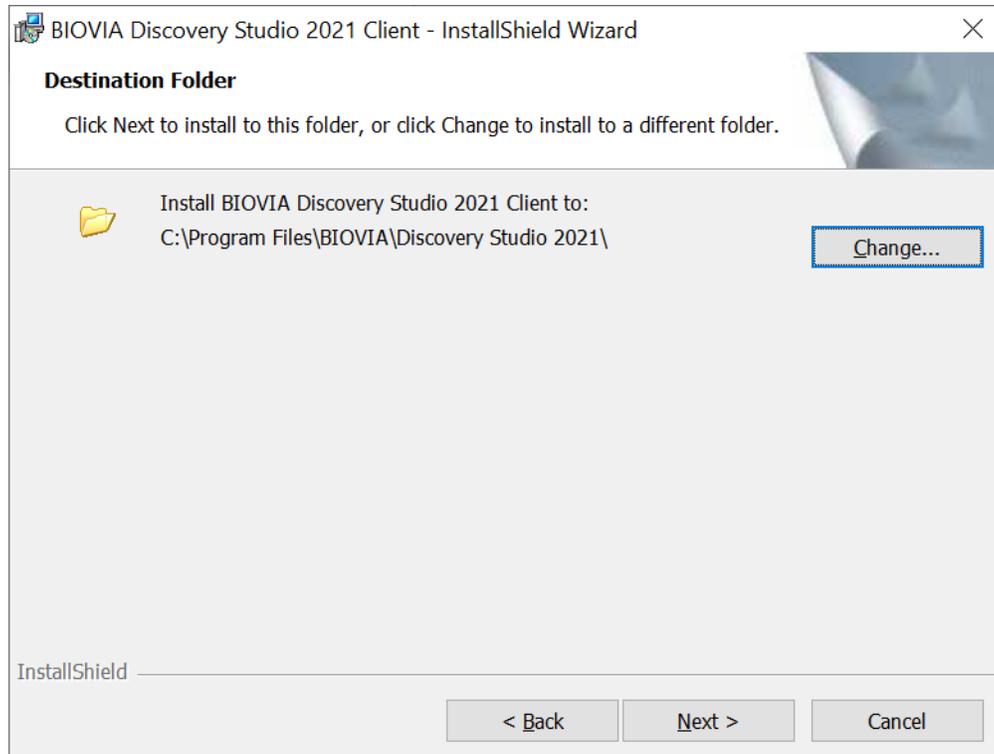
**2.3.3.5** Pedirá permisos para instalar esta aplicación, dar clic en “Sí” (recuadro negro):



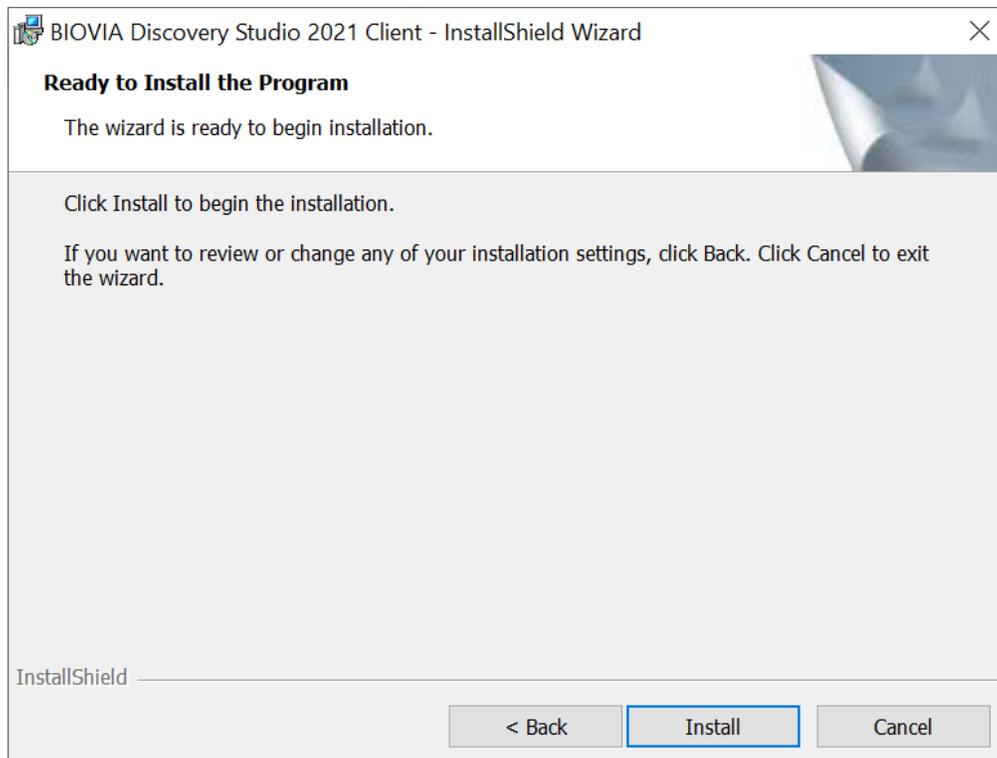
2.3.3.6 Accederá al asistente de instalación del programa, dar clic en “Next >”:



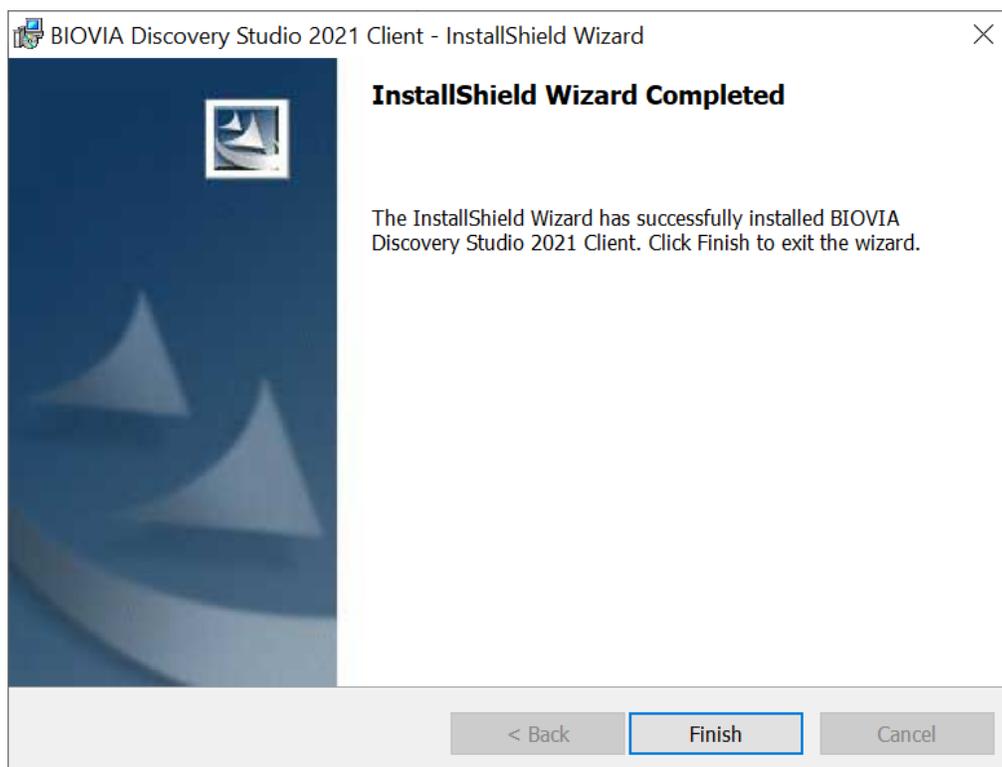
Luego elegir el directorio de destino donde se requiere instalar el programa, por defecto el programa se instala en la dirección preestablecida del disco duro principal (regularmente C:) “C:\Program Files\BIOVIA\Discovery Studio 2021\”. Si se requiere instalar en otra dirección, dar clic en “Change” (recuadro azul) y posteriormente dar clic en “Next >”:



Luego, dar clic en "Install" y comenzará a instalar el programa con las indicaciones antes dadas:



Terminado el proceso, aparece la pantalla de terminó del asistente de instalación, dar clic en "Finish" para cerrar el asistente de instalación:



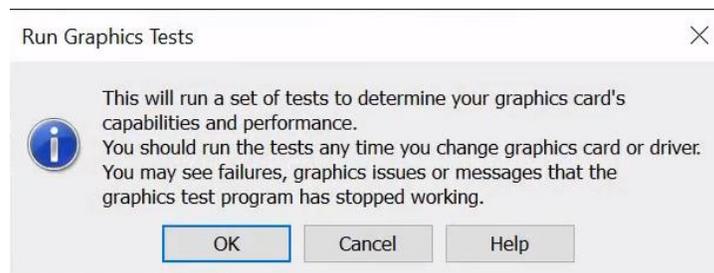
2.3.3.7 Para ejecutar el programa, ir al escritorio, ubicar el icono siguiente y dar doble clic para ejecutarlo:



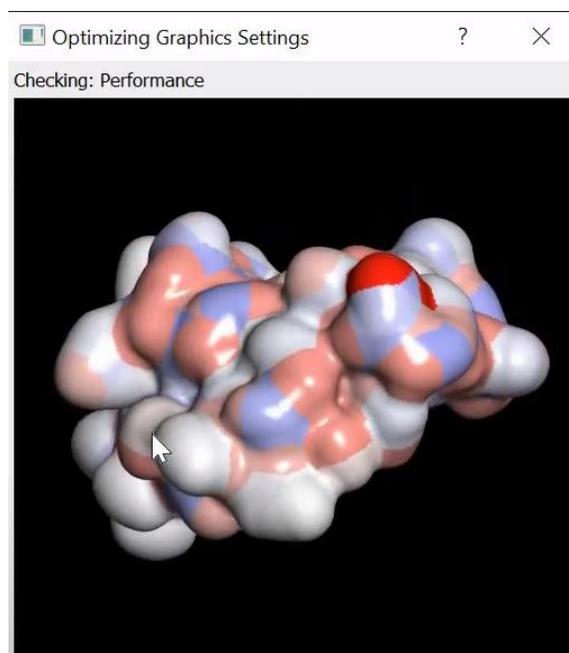
**2.3.3.8** Cuando se ejecuta por primera vez, saldrá una ventana permitiendo elegir las opciones correspondientes. Desmarcar la casilla “Import settings from Discovery Studio 2019” dejando las otras dos casillas marcadas con palomilla y dar clic en “OK”:



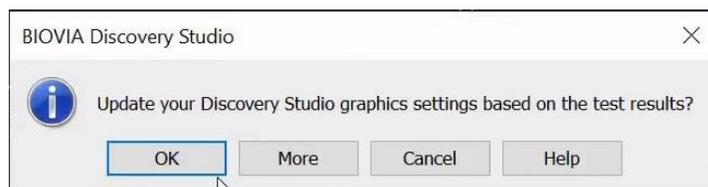
Posteriormente, aparece un mensaje advirtiéndolo que se correrá una prueba para determinar el rendimiento de su equipo según su capacidad gráfica, dar clic en “OK” para continuar:



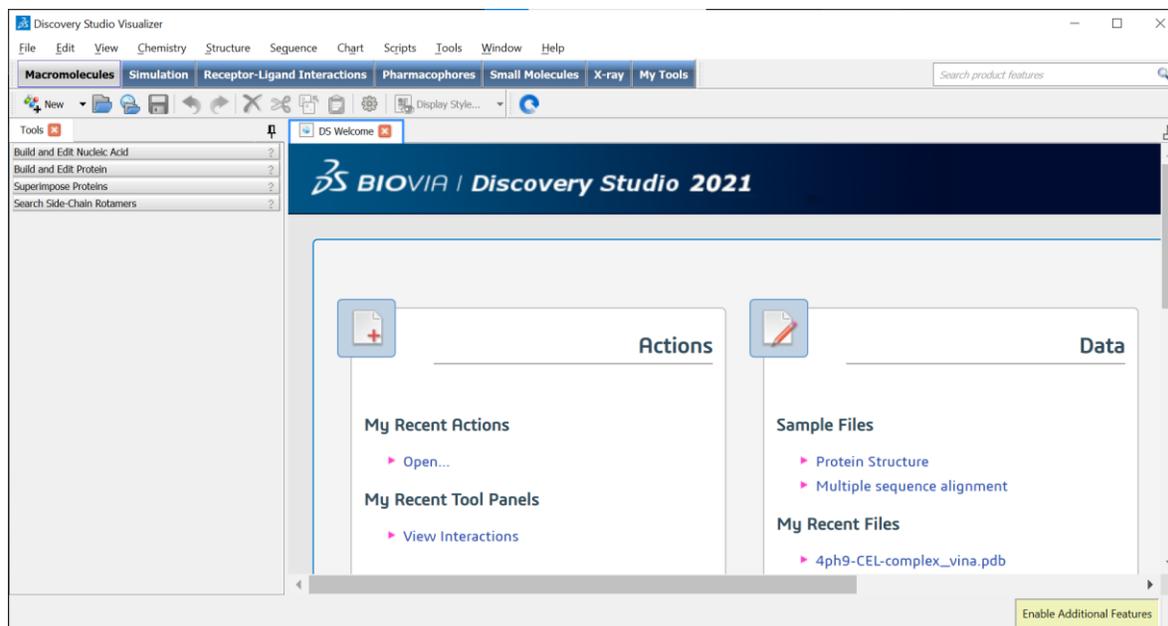
Comenzará a correr diversas pruebas y dependiendo del rendimiento de la tarjeta gráfica, el equipo de cómputo puede desplegar avisos internos del equipo de cómputo, mencionando que la tarjeta gráfica dejó de funcionar; sin embargo, debe dejar que termine el proceso, puesto que no afecta el equipo de algún modo.



Terminado el procedimiento, preguntará si se desea actualizar la preferencia gráfica, dar clic en "OK":



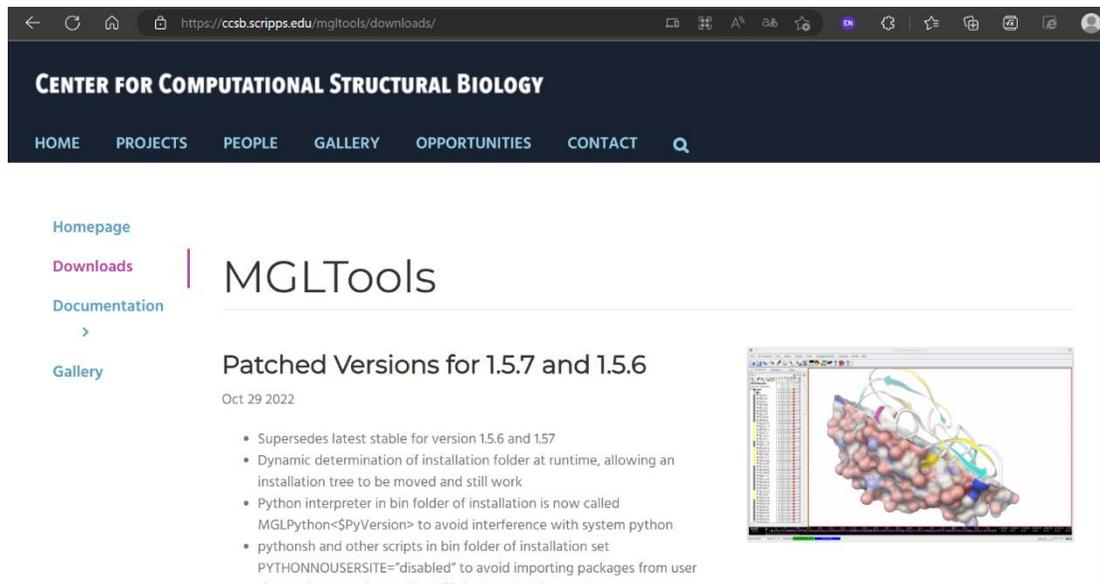
El programa debería abrir normalmente y se encuentra listo para utilizarse.



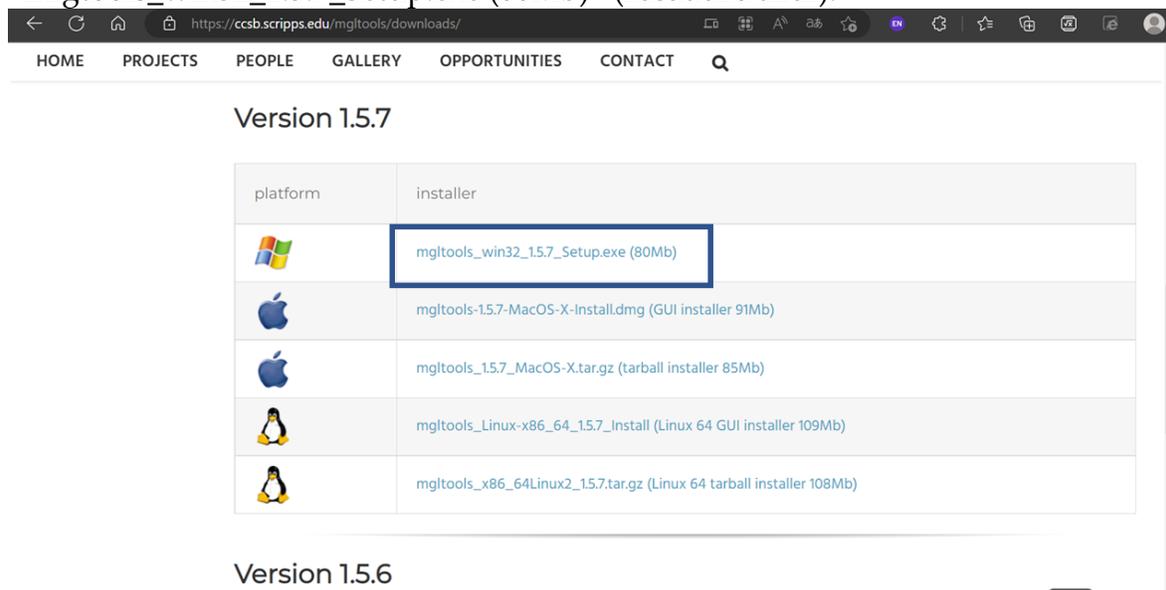
## 2.3.4 Instalación del programa MGLTools (AutoDock Tools)

2.3.4.1 Acceder a la siguiente liga de internet dando clic en el enlace:  
<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/downloads/>

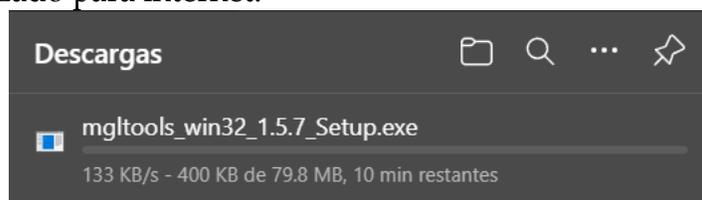
Lo que conducirá a la siguiente pantalla:



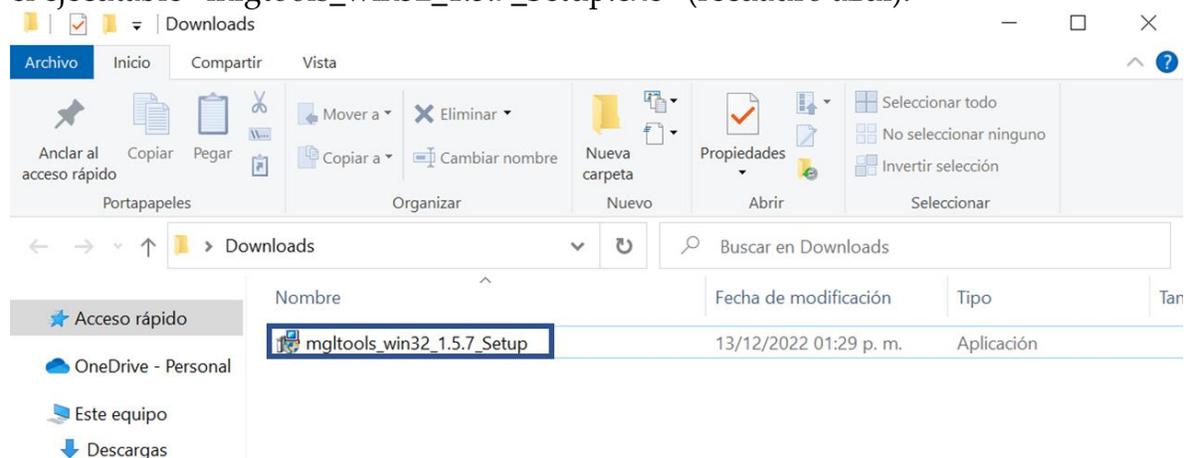
2.3.4.2 Desplace la ventana hacía abajo hasta encontrar la versión 1.5.7 del instalador para el sistema operativo Windows y dar clic en la liga "mgltools\_win32\_1.5.7\_Setup.exe (80Mb)" (recuadro azul):



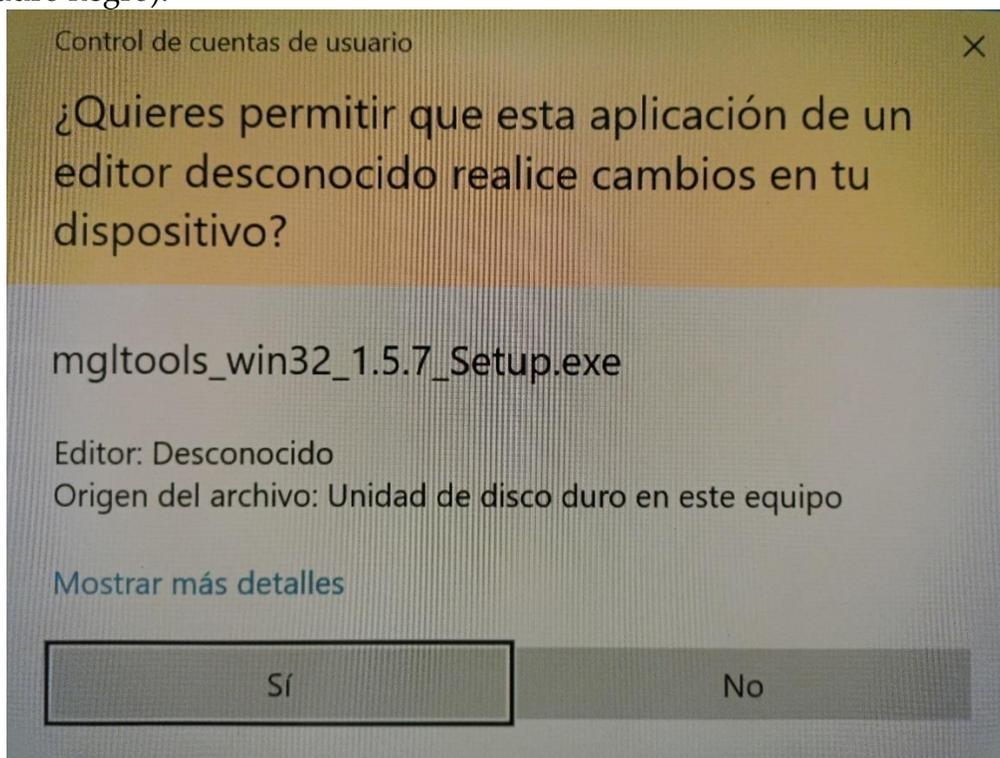
2.3.4.3 Automáticamente comenzará la descarga del archivo instalable “mgltools\_win32\_1.5.7\_Setup.exe” y se podrá visualizar en el sitio de descargas del explorador utilizado para internet:



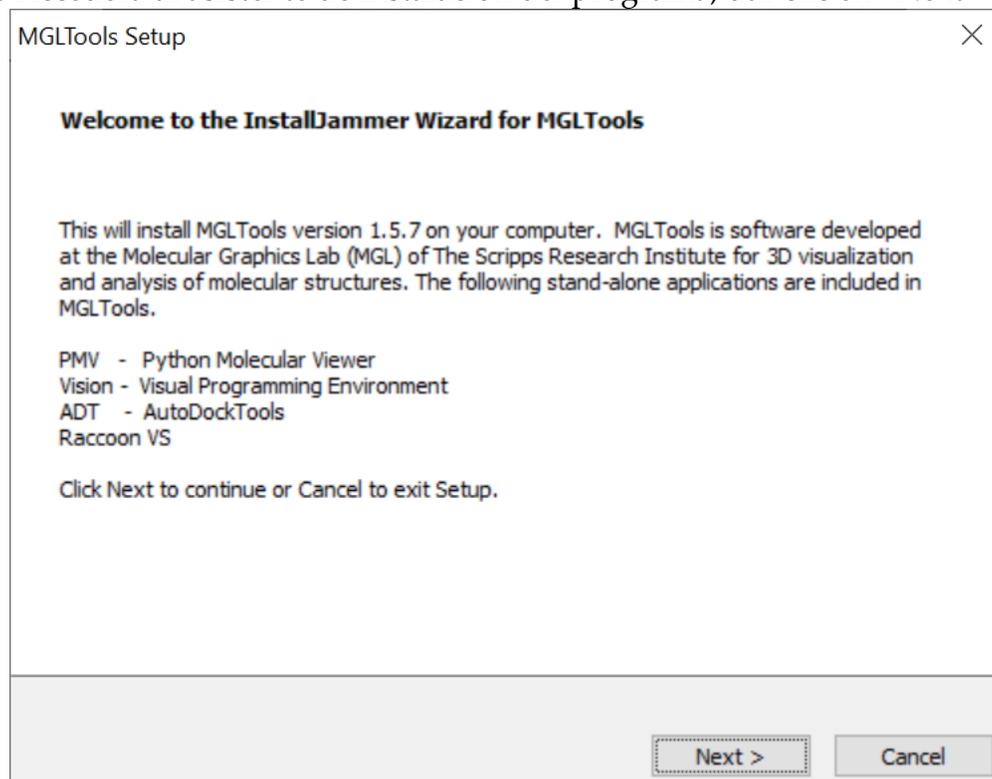
2.3.4.4 En la carpeta de descargas, encontrar el archivo instalable, dar doble clic sobre el ejecutable “mgltools\_win32\_1.5.7\_Setup.exe” (recuadro azul):



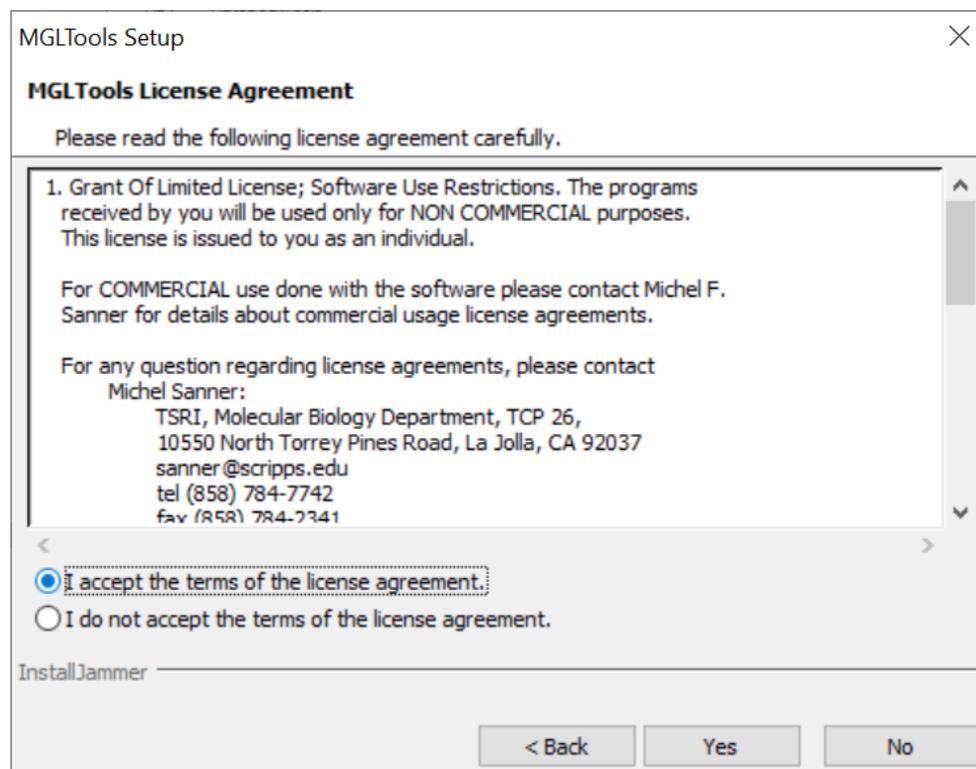
2.3.4.5 Pedirá permisos para instalar esta aplicación, dar clic en la opción “Sí” (recuadro negro):



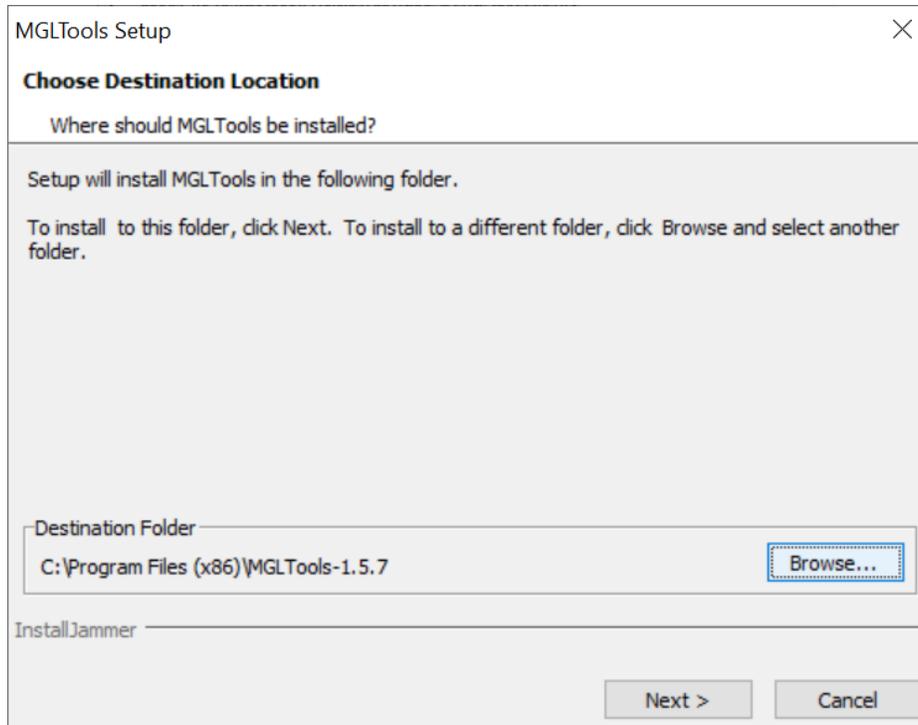
2.3.4.6 Accederá al asistente de instalación del programa, dar clic en “Next >”:



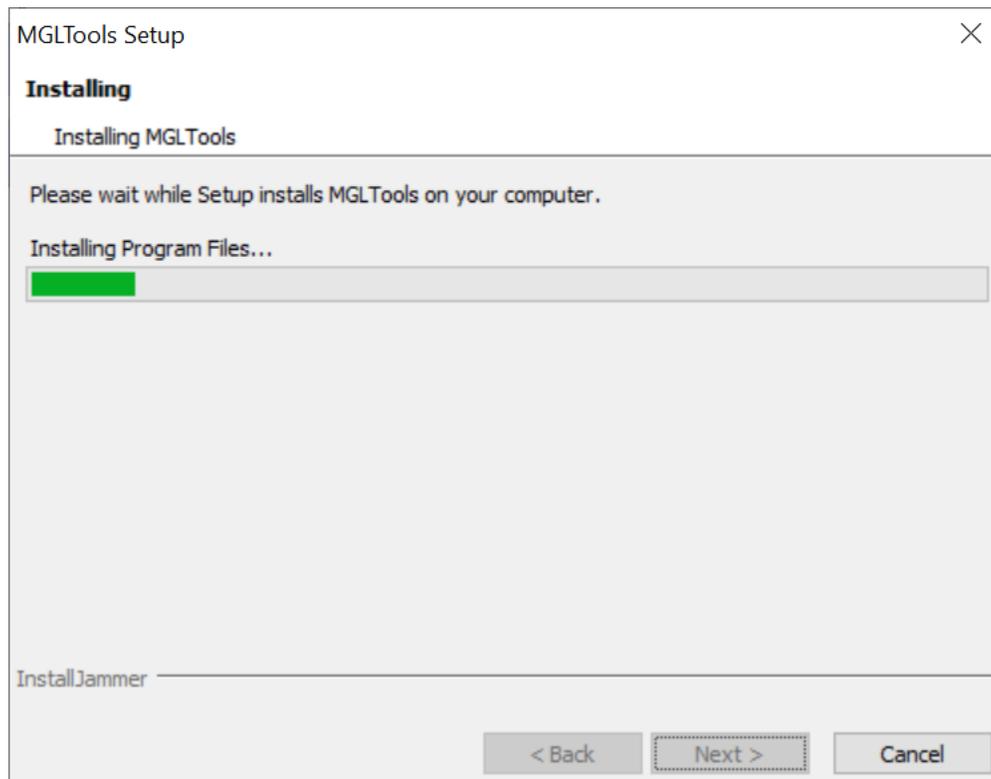
A continuación, marcar la opción "I accept the terms of the license agreement" (círculo azul) y dar clic en "Yes" para continuar:



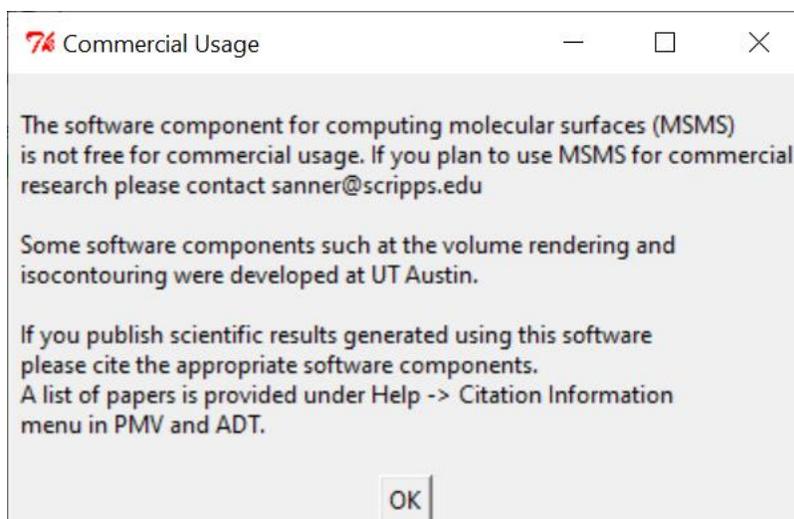
Luego elegir el directorio de destino donde se requiere instalar el programa, por defecto el programa se instala en la dirección preestablecida del disco duro principal (regularmente C:) "C:\Program Files (x86) \MGLTools-1.5.7". Si se requiere instalar en otra dirección, dar clic en "Browse..." (recuadro azul) y posteriormente dar clic en "Next >":



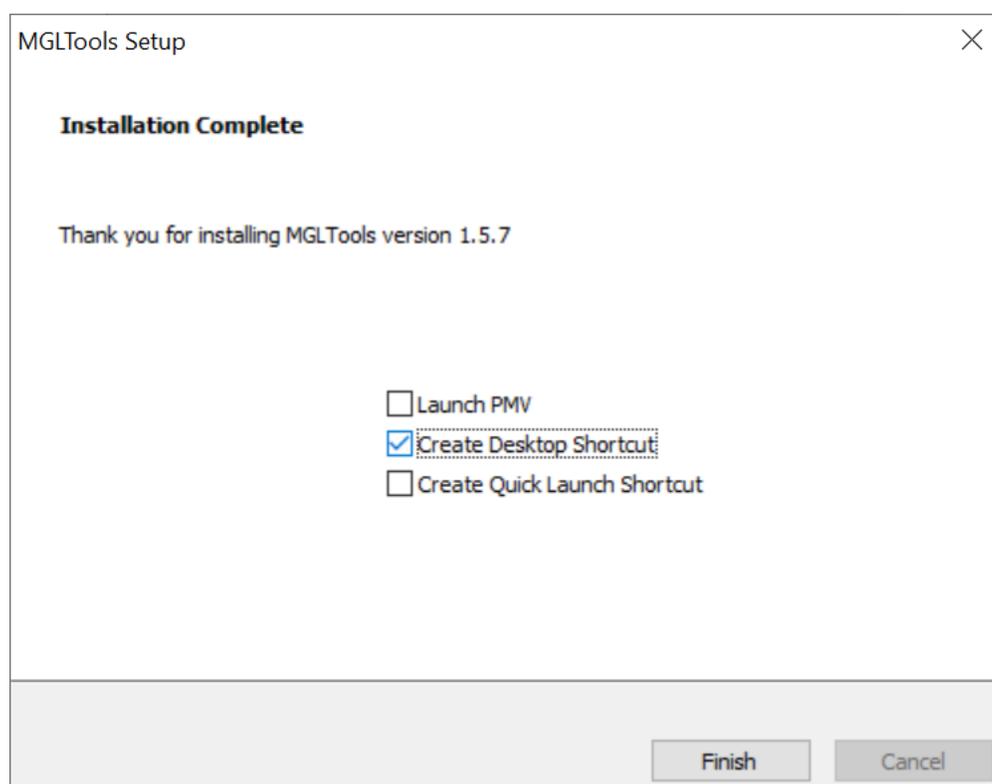
Comenzará a instalar el programa con las indicaciones antes dadas:



Una vez terminado el proceso, aparecerá la pantalla de "Commercial Usage" del asistente de instalación, dar clic en "OK" para continuar:



Una vez concluida la instalación, desactivar las casillas de “Launch PMV” y “Create a Quick Launch Shortcut” únicamente dejar marcada la casilla de “Create Desktop Shortcut” (palomilla azul)”. Concluido, dar clic en “Finish” para cerrar el asistente de instalación del programa:

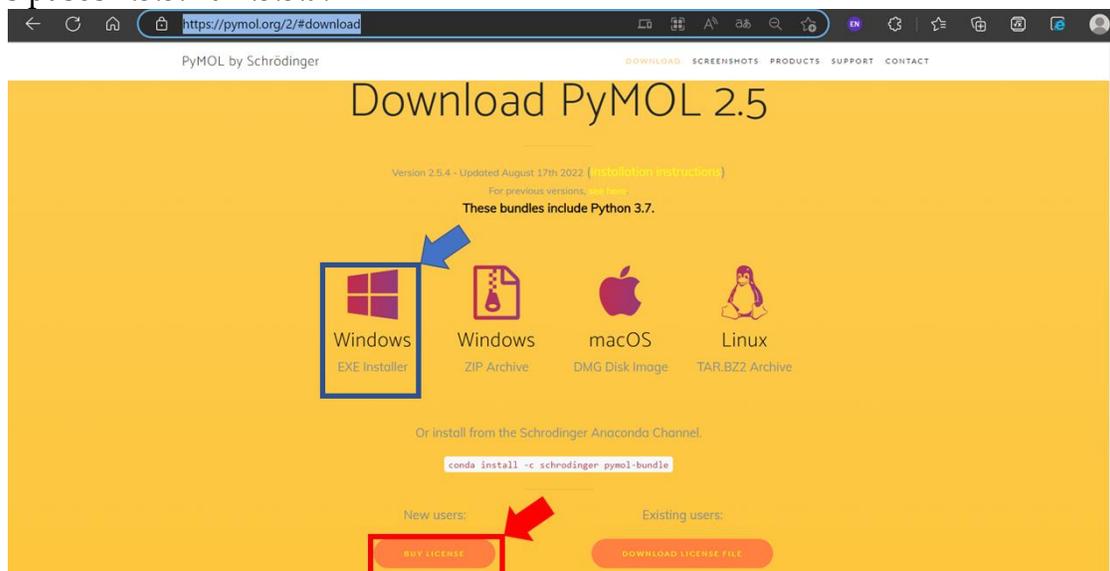


En el presente manual se verán funciones básicas del programa, por lo que acceder a la siguiente liga proporcionará un conocimiento más amplio del programa:

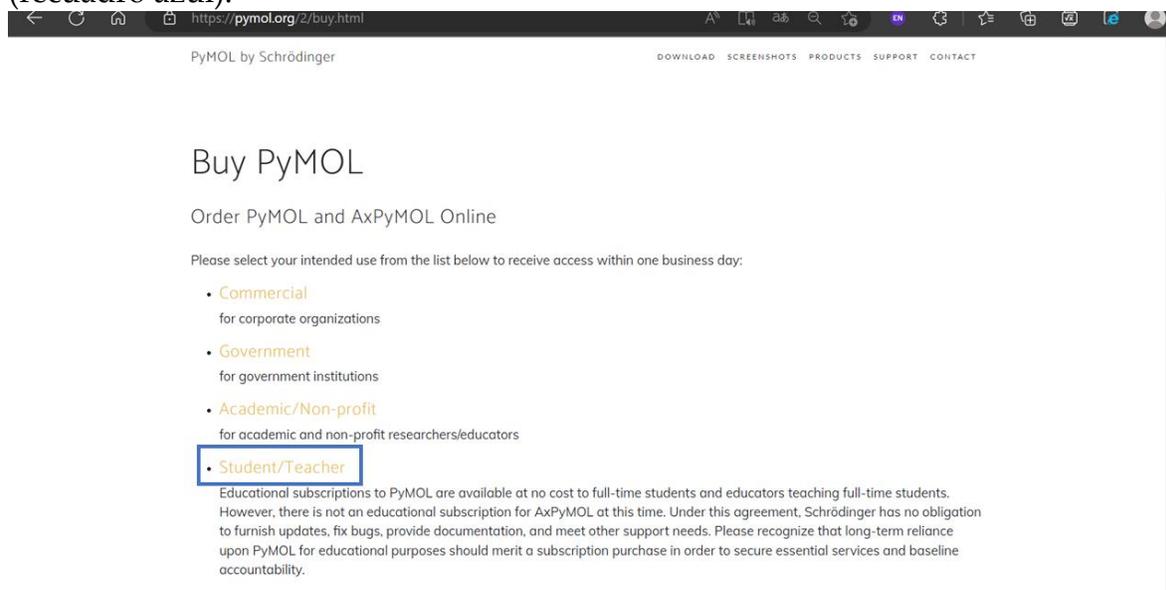
<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/documentation/>

## 2.3.5 Instalación del programa PyMOL

**2.3.5.1** Acceder a la siguiente liga de internet dando clic en el enlace: <https://pymol.org/2/#download>; PyMOL es un programa de uso gratuito por 30 días, para esta práctica es suficiente con utilizar esta versión, para obtenerla, dar clic en el icono de sistema de Windows (flecha y recuadro azul), lo que descargará automáticamente el instalador del punto **2.3.5.10**. Si se desea adquirir una licencia de uso educacional, dar clic en “BUY LICENSE” (flecha y recuadro rojo) y seguir con los pasos **2.3.5.2** a **2.3.5.9**:

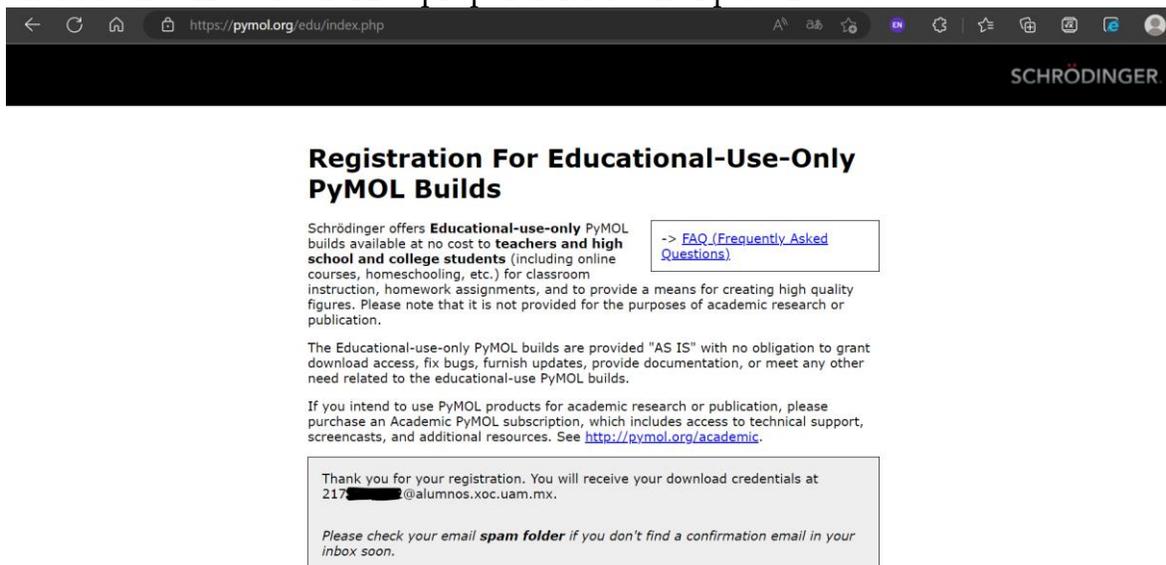


**2.3.5.2** Lo conducirá a la siguiente pantalla, dar clic en la opción “Student/Teacher” (recuadro azul):





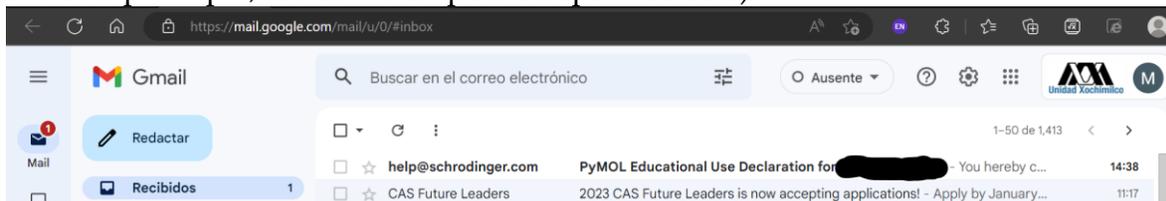
2.3.5.5 Se notificará que un correo con las credenciales correspondientes ha sido enviado al correo electrónico proporcionado en el paso 2.3.5.3:



The screenshot shows the PyMOL website's registration page for educational use. The page title is "Registration For Educational-Use-Only PyMOL Builds". The content includes:

- A heading: **Registration For Educational-Use-Only PyMOL Builds**
- A paragraph: "Schrödinger offers **Educational-use-only** PyMOL builds available at no cost to **teachers and high school and college students** (including online courses, homeschooling, etc.) for classroom instruction, homework assignments, and to provide a means for creating high quality figures. Please note that it is not provided for the purposes of academic research or publication." A link to the FAQ is provided.
- A paragraph: "The Educational-use-only PyMOL builds are provided "AS IS" with no obligation to grant download access, fix bugs, furnish updates, provide documentation, or meet any other need related to the educational-use PyMOL builds."
- A paragraph: "If you intend to use PyMOL products for academic research or publication, please purchase an Academic PyMOL subscription, which includes access to technical support, screencasts, and additional resources. See <http://pymol.org/academic>."
- A confirmation message: "Thank you for your registration. You will receive your download credentials at 217-██████████@alumnos.xoc.uam.mx." A note below it says: "Please check your email **spam folder** if you don't find a confirmation email in your inbox soon."

2.3.5.6 En la bandeja de entrada del correo electrónico debería recibir el siguiente mensaje del remitente "help@schrodinger.com" (si no se visualiza en la bandeja de entrada principal, revisar la carpeta de spam de éste):



The screenshot shows a Gmail inbox. The email from help@schrodinger.com is visible with the subject "PyMOL Educational Use Declaration for ██████████ - You hereby c...". The time is 14:38. Other emails from CAS Future Leaders are also visible.

2.3.5.7 El correo con las credenciales no debería tardar más de 5 minutos en verse reflejado en la bandeja de entrada; sin embargo, si llegará a tardar más tiempo, revisar la carpeta de spam, realizar nuevamente el procedimiento o intentar más tarde.

Una vez abierto el correo, observar los datos colocados en el punto 2.3.5.4, deslizar el mensaje hasta abajo y encontrar 3 nuevas líneas las cuales dicen "DOWNLOAD URL", "USERNAME" y "PASSWORD" (las credenciales "USERNAME" y "PASSWORD", son personales por lo que son intransferibles), dar clic en "DOWNLOAD ULR":

## 7. COMMENTS:

Thank you for your interest in PyMOL.

DOWNLOAD URL: <https://pymol.org/ep>

USERNAME: [REDACTED]

PASSWORD: [REDACTED]

← Responder

↶ Responder a todos

→ Reenviar

2.3.5.8 Abrirá una nueva pestaña en el navegador que solicitará “Nombre de usuario” y “Contraseña”, estos datos son los del correo electrónico “USERNAME” y “CONTRASEÑA” respectivamente del punto 2.3.5.7, colocar los datos en las entradas correspondientes y dar clic en “Iniciar sesión” (botón azul):

**Iniciar sesión para acceder a este sitio**

Autorización exigida por <https://pymol.org>

Nombre de usuario

Contraseña

Iniciar sesión
Cancelar

2.3.5.9 Conducirá al sitio de descarga de la licencia y el instalador. Primero, descargar la licencia dando clic en “pymol-edu-license.lic” (flecha y recuadro azul):

**Download Educational-Use-Only PyMOL**

DO NOT SHARE THESE FILES OUTSIDE OF EDUCATIONAL ENVIRONMENTS  
-- they are for students and teachers only.

To the extent that you redistribute these files or the download credentials internally, please be sure that access is appropriately limited. Although primarily intended for classroom use, students, and teachers may download and use these builds on personal computers for educational tasks such as homework assignments.

**PyMOL Executable Builds for Educational Use Only**

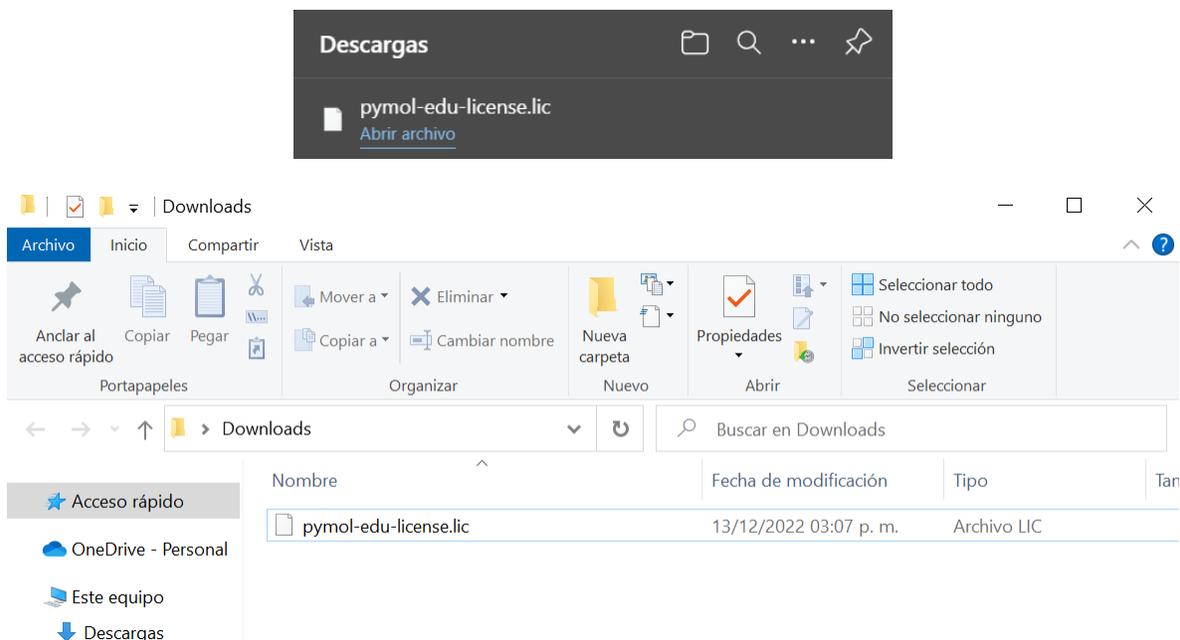
The Educational-use-only PyMOL builds are provided "AS IS" with no obligation to grant download access, fix bugs, furnish updates, provide documentation, or meet any other need related to the educational-use PyMOL builds. Purchased [PyMOL Academic Subscriptions](#) with up to three years of maintenance are available to meet your longer-term educational use needs.

**PyMOL 2.0 (September 2017)**

License Files: [pymol-edu-license.lic](#) ←

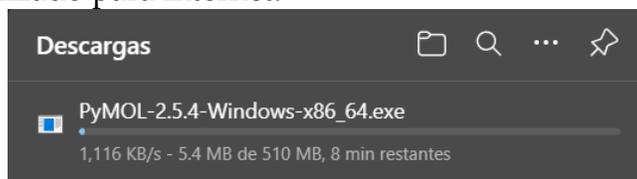
Installers: [PyMOL Download Page](#) ←

Descargar el archivo “pymol-edu-license.lic”, encontrar el archivo en el sitio de descargas del explorador utilizado para internet y la carpeta de descargas. Es importante tener localizado este archivo ya que se pedirá más adelante cuando se ejecute el programa:

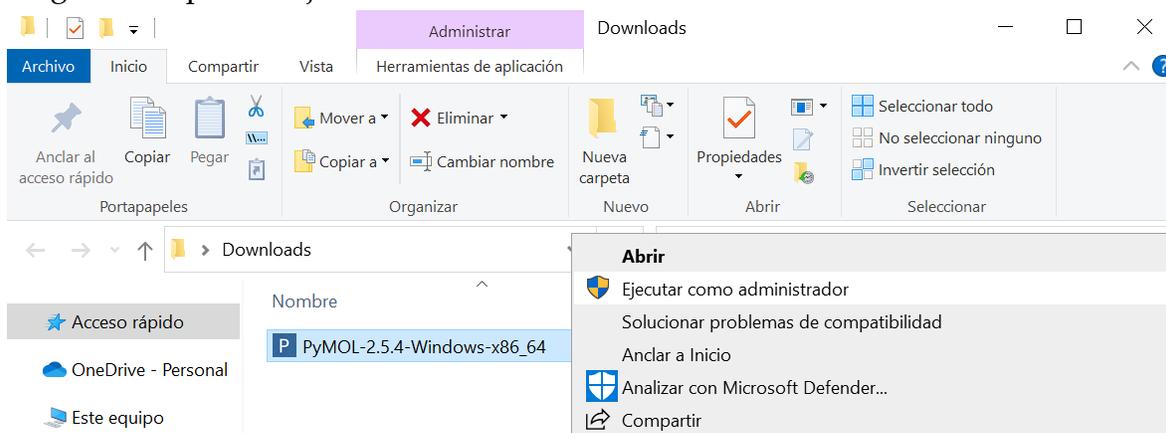


Para el instalador, dar clic en “PyMOL Download Page” (flecha y recuadro rojo de la imagen del punto 2.3.5.9), dirigirá a la página del punto 2.3.5.1, por lo cual dar clic en el símbolo de Windows (flecha y recuadro azul de la imagen del punto 2.3.5.1) para que comience la descarga del mismo.

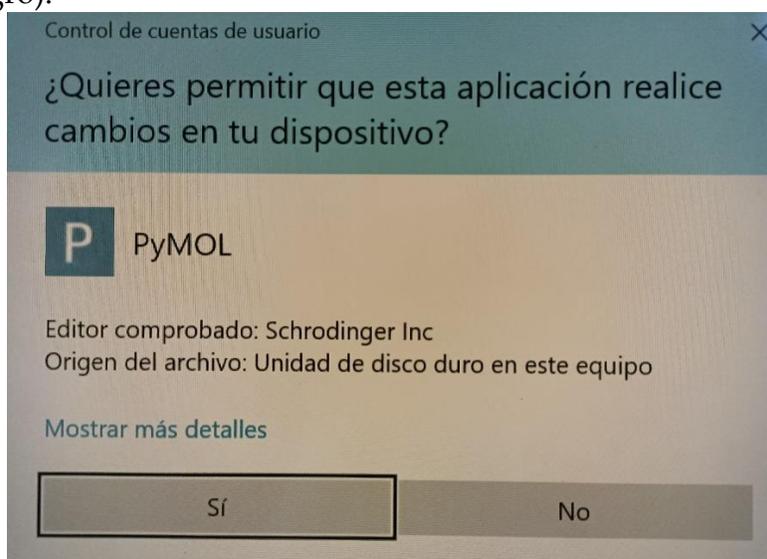
**2.3.5.10** Automáticamente comenzará la descarga del archivo instalable “PyMOL-2.5.4-Windows-x86\_64.exe” y podrá visualizarlo en su sitio de descargas del explorador utilizado para internet:



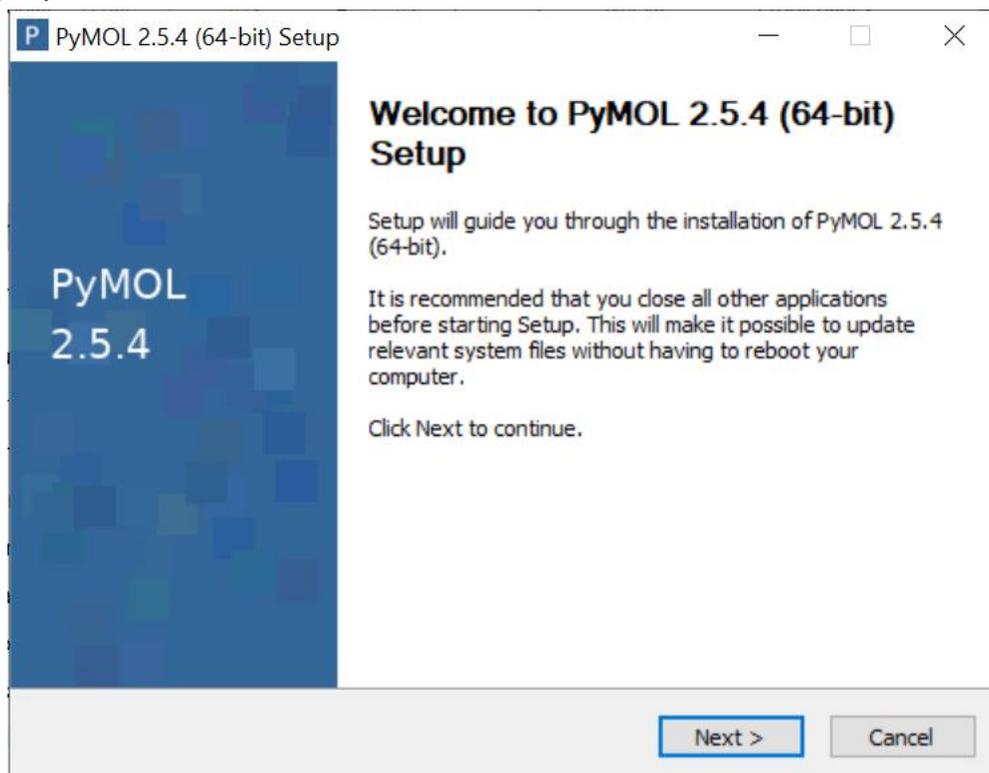
**2.3.5.11** En la carpeta de descargas, encontrar el archivo instalable, dar clic derecho sobre el ejecutable “PyMOL-2.5.4-Windows-x86\_64” (recuadro azul) y luego en la opción “Ejecutar como administrador”:



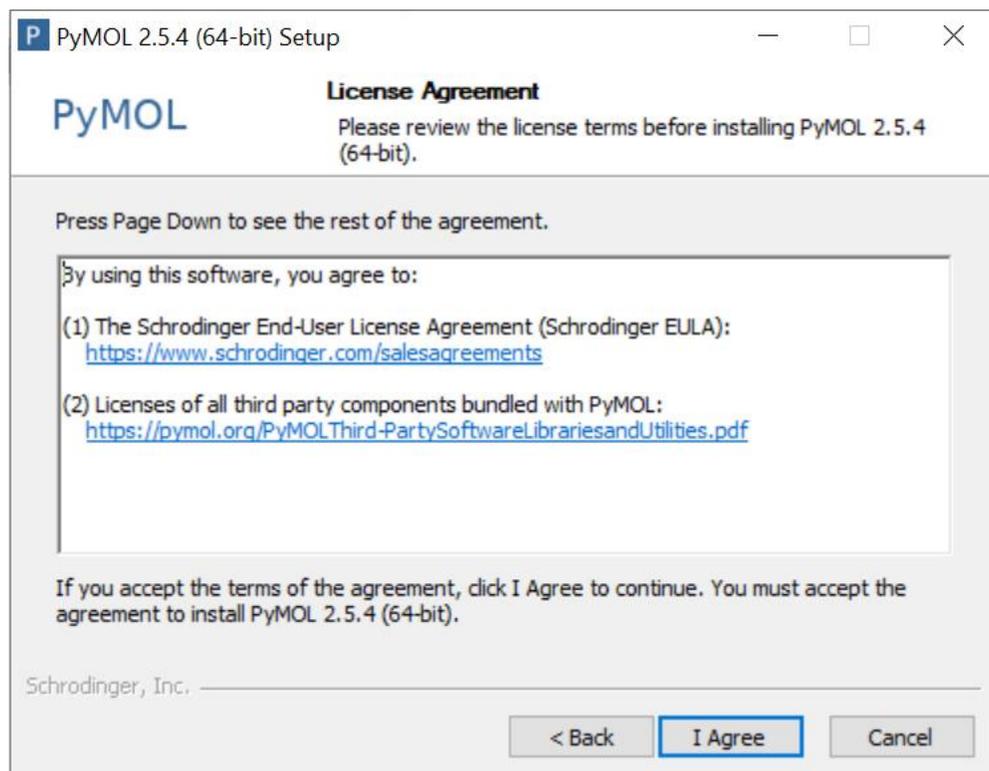
**2.3.5.12** Le pedirá permisos para instalar esta aplicación, dar clic en “Sí” (recuadro negro):



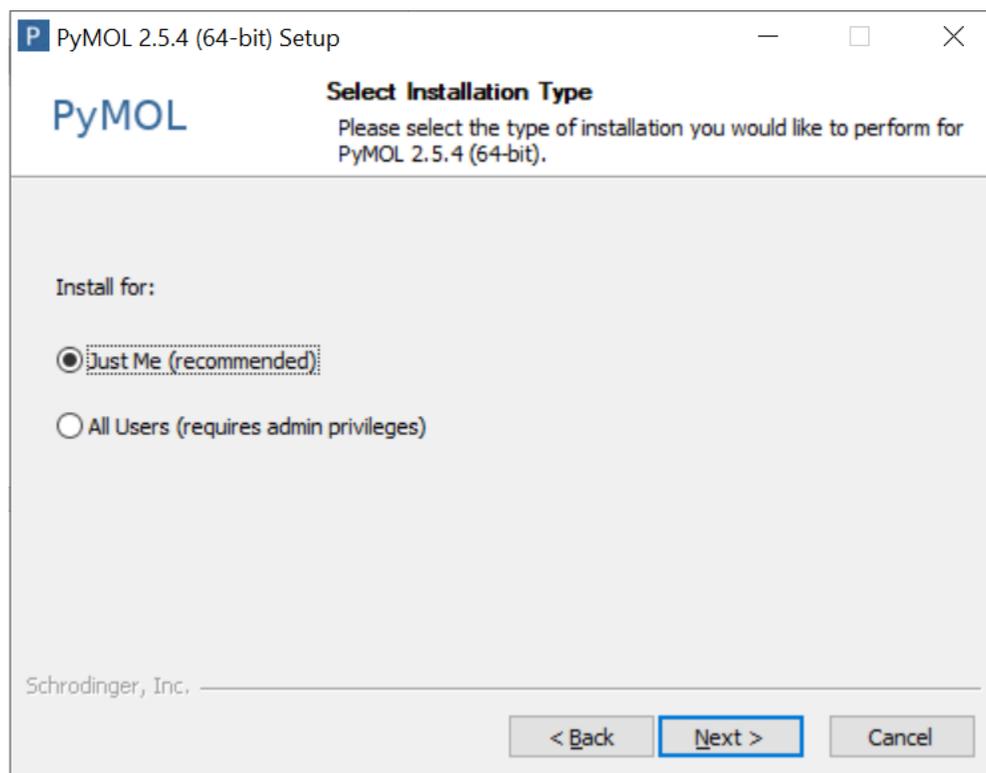
2.3.5.13 Después, acceder al asistente de instalación del programa, dar clic en “Next >”:



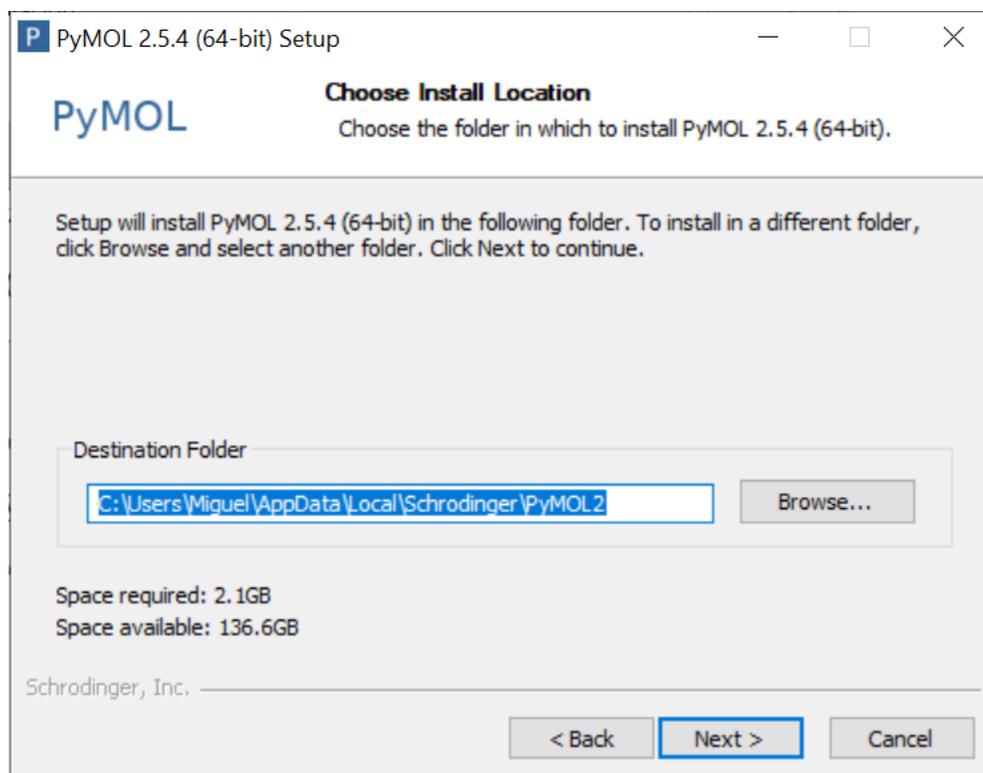
Aparecerá el aviso de licencia, dar clic en “I Agree”:



A continuación, pedirá permisos para instalar el programa en otros usuarios, seleccionar la casilla “Just Me (recommended)” y dar clic en “Next>”:

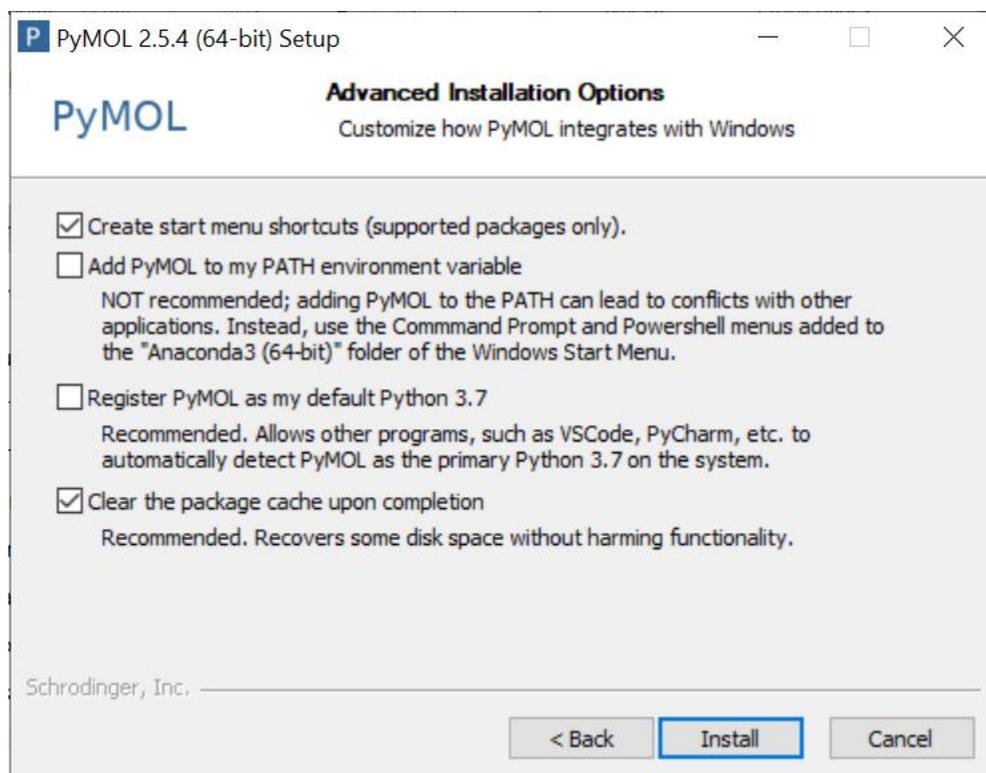


Luego, elegir el directorio de destino donde se requiere instalar el programa, por defecto el programa se instala en la dirección preestablecida del disco duro principal (regularmente C:) “C:\Users\Miguel\AppData\Local\Schrodinger\PyMOL2”. Si se requiere instalar en otra dirección, dar clic en “Browse...” (recuadro azul), y posteriormente dar clic en “Next >”:

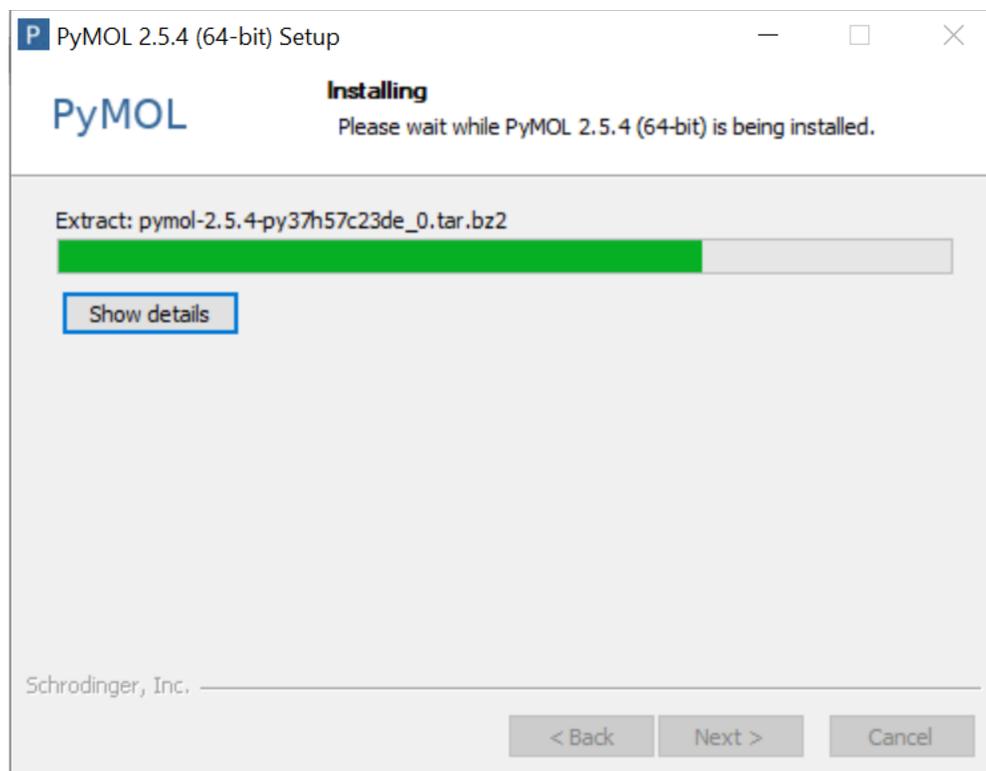


Si no se ejecuta como administrador, es muy probable que se despliegue una ventana de error acerca de la instalación ya que requiere menos de 46 caracteres para hacerlo, por ello debería dar permisos de administrador del punto 2.3.5.11. Si se desea, dar clic en “Cancel” y luego volver al punto 2.3.5.11 para empezar el proceso como administrador.

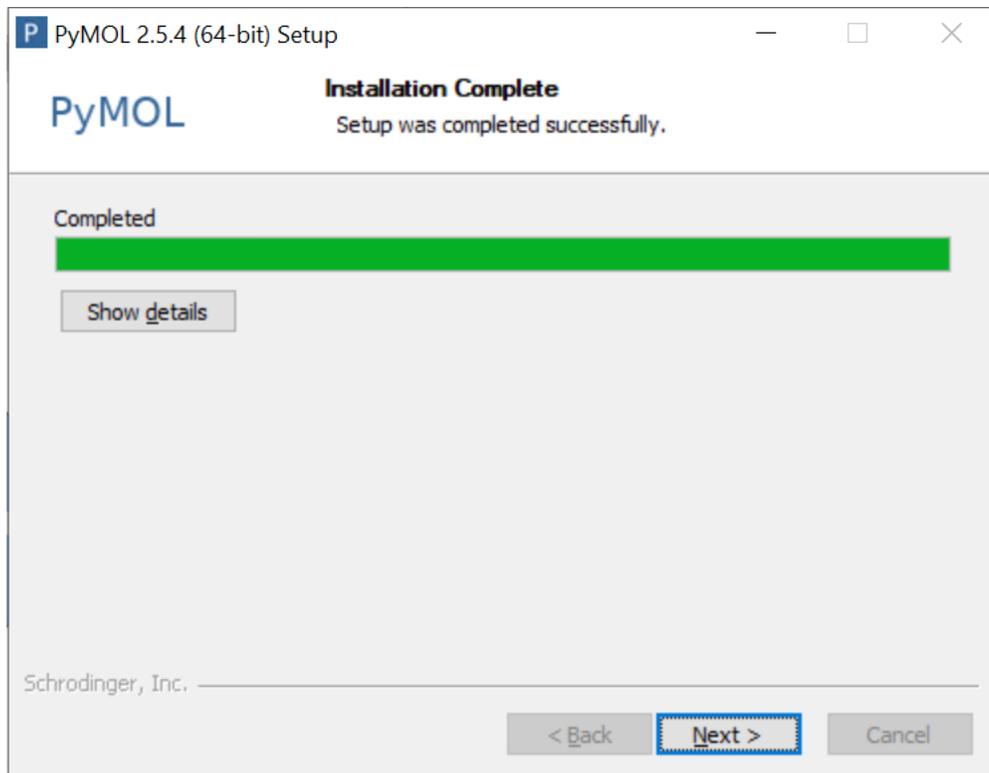
Posteriormente, seleccionar las casillas “Create start menu shortcuts (supported packages only)” y “Clear the package cache upon completion” y dar clic en “Install”:



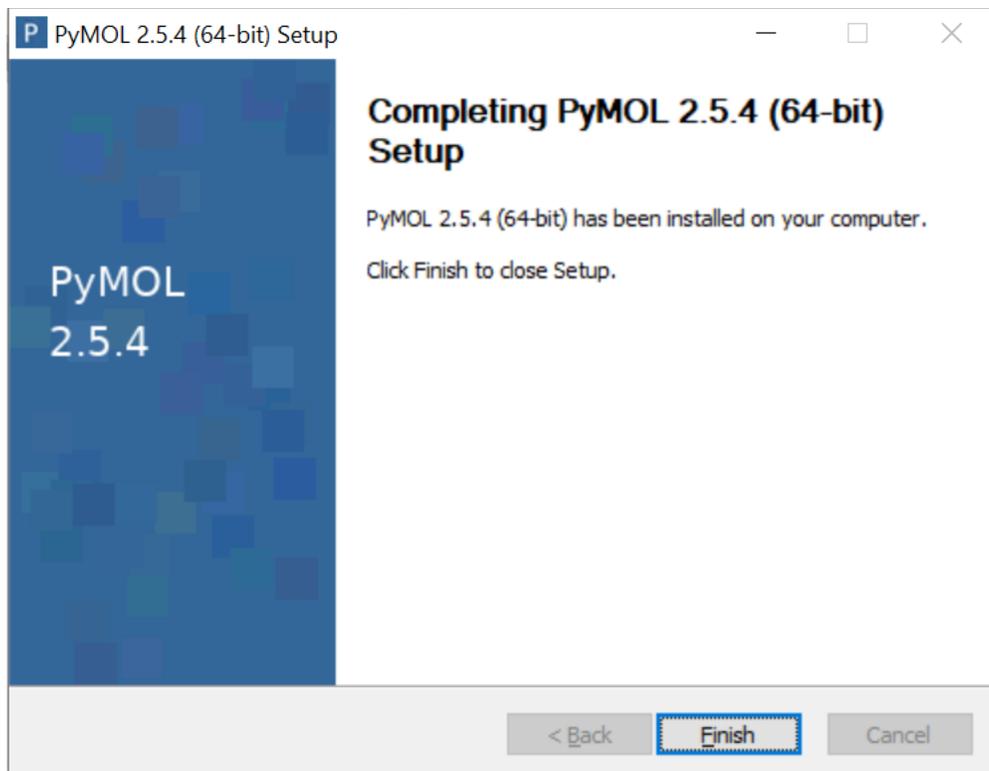
Comenzará a instalar el programa con las indicaciones antes dadas:



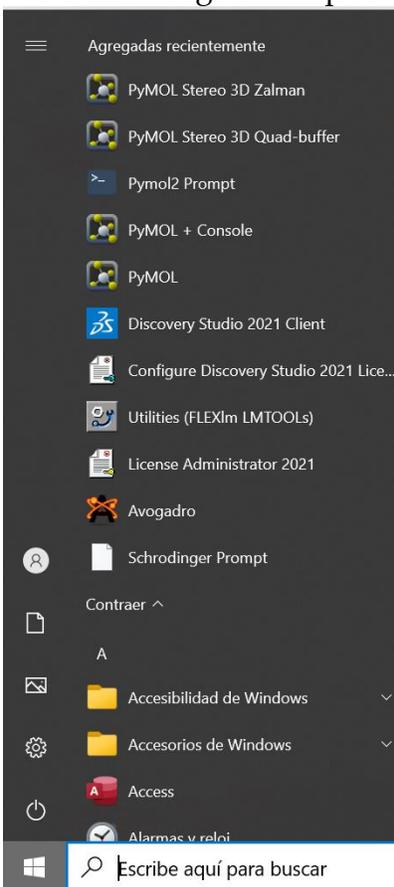
Completada la instalación, dar clic en "Next >"



Dar clic en "Finish" para cerrar el asistente de instalación del programa:



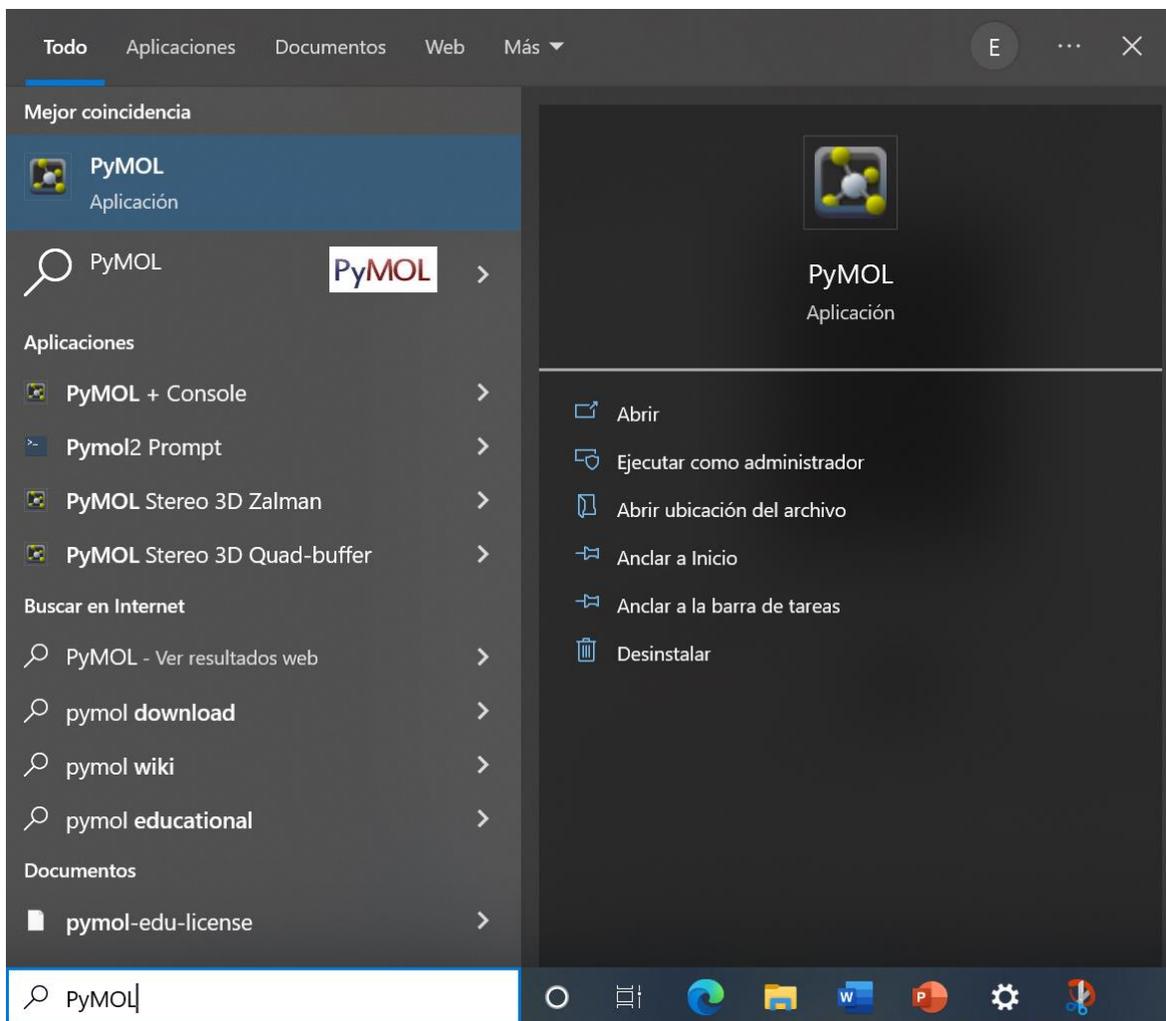
**2.3.5.14** Para ejecutar el programa, ir al icono de Windows de la barra de tareas (esquina inferior izquierda de la pantalla, comúnmente) o seleccionar la tecla de Windows en el teclado, para acceder al siguiente apartado:



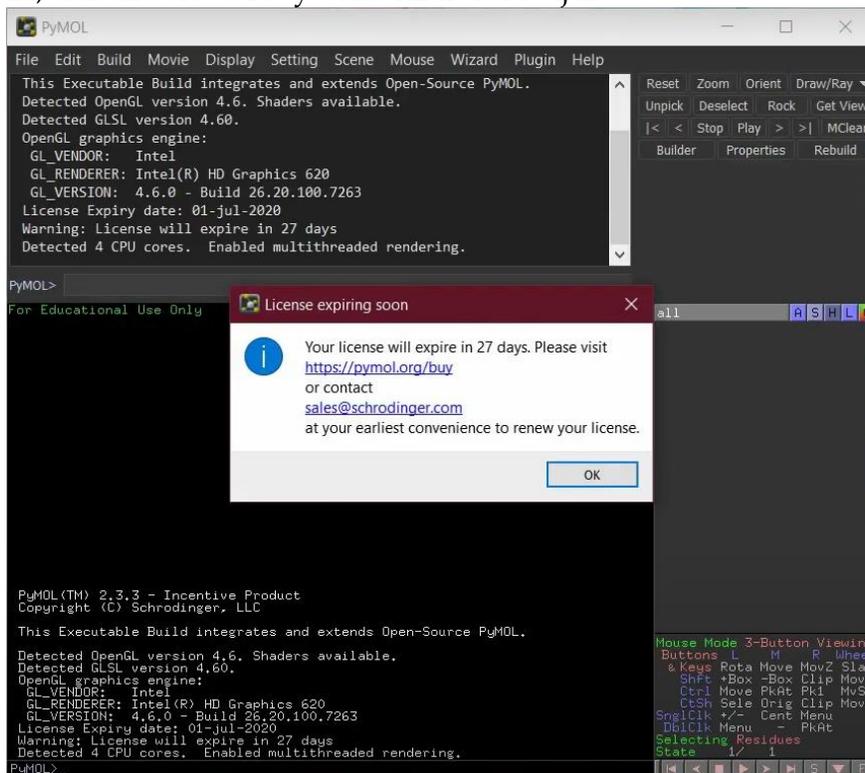
En el apartado de “Agregadas recientemente”, si no encuentra el programa “PyMOL” dar clic en “Expandir”, buscar el icono y dar clic para ejecutarlo:



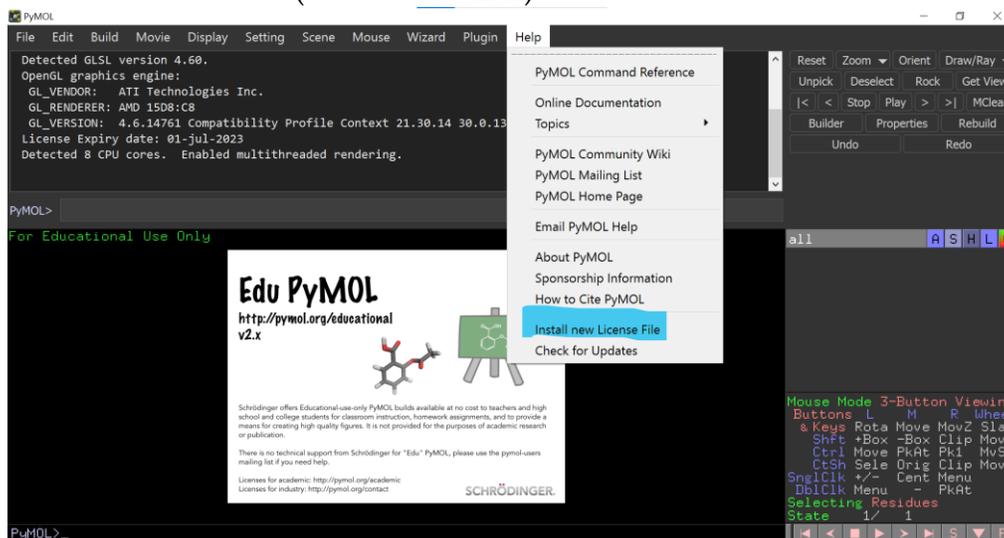
Si no se encuentra el icono, buscar en la caja de la barra de tareas “Escribe aquí para buscar” (recuadro azul) la palabra “PyMOL”, debería aparecer el programa con el mismo icono y dar clic para ejecutarlo:



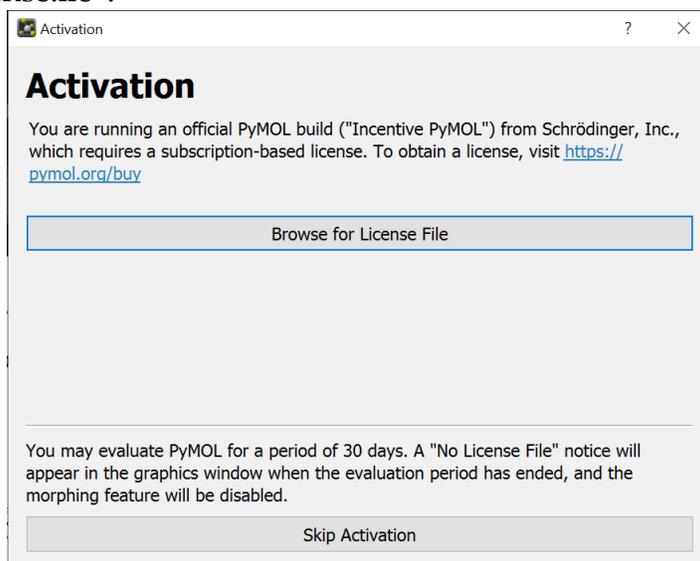
2.3.5.15 Una vez abierto el programa aparecerá un aviso acerca de la expiración de la licencia, dar clic en “OK” y comenzar a trabajar:



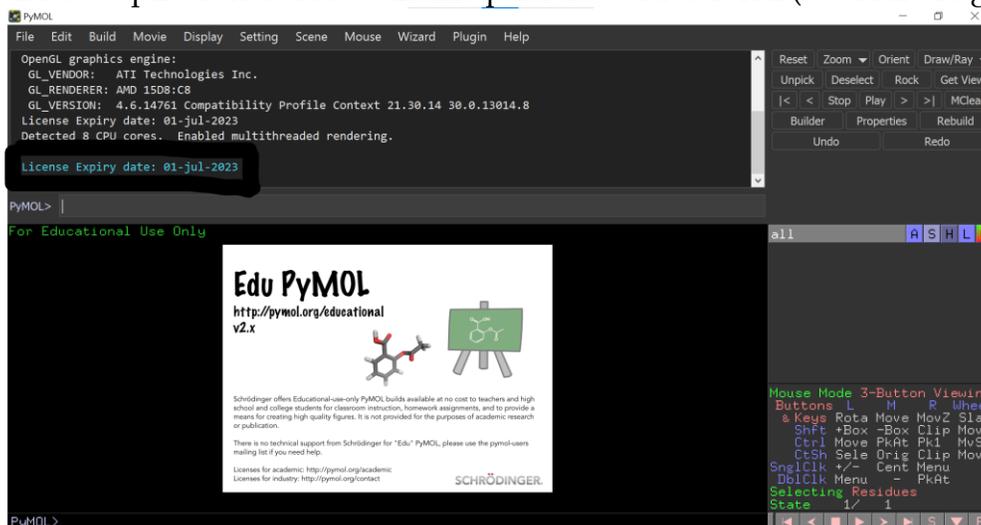
2.3.5.16 Para los pasos referentes a la licencia educacional (2.3.5.2 a 2.3.5.9), dar clic en “OK” del punto anterior, posteriormente ir a la pestaña “Help” y dar clic en “Install new License File” (remarcado azul):



**2.3.5.17** Dar clic en el apartado “Browse for License File” (recuadro azul) y elegir la ruta del archivo que se descargó en el paso 2.3.5.9 el cual tenía por nombre “pymol-edu-license.lic”:



**2.3.5.18** Al término, observar que se ha activado la licencia y ahora se tendrá una fecha de expiración de hasta un año para uso educacional (recuadro negro):



## 2.4 EJEMPLO

Se sabe que los AINEs ocasionan efectos secundarios principalmente, al interactuar con COX-1 ¿Cómo podría comprobar, mediante docking molecular, la interacción entre flurbiprofeno y COX-1? ¿Qué afinidad presenta el flurbiprofeno con respecto al sitio de acción de la COX-1?

### Recomendaciones generales

- Usar Sistema operativo Windows, ya que el manual se encuentra enfocado en este Sistema Operativo y no en MAC o Linux. Puede que los emuladores de Sistema Operativo Windows en MAC y Linux no funcionen correctamente al momento de llevar a cabo ciertas acciones.
- Seguir los pasos detalladamente ya que se utilizarán signos de puntuación específicos y se correrán archivos en el símbolo del sistema, por lo que es importante escribir correctamente minúsculas y mayúsculas. Se pueden confundir "." por ","; "l" por "1"; "I" por "1", "bd" por "db", etc., en diversas ocasiones se pegará el texto tal como se muestra en el ejemplo para evitar estos errores, sin embargo, cuando se trabaje por cuenta propia debe tener en cuenta estos errores comunes.
- Si se tienen diversas rutas de almacenamiento, como tener más de un disco duro o guardar archivos generalmente en la "nube", tener localizados dónde se colocan los archivos, ya que su ubicación será importante.
- En caso de que se sigan las rutas de acceso marcadas en el ejemplo, tomar en cuenta que "Miguel" deberá aparecer como el usuario que se encuentra trabajando actualmente en el equipo de cómputo y "Desktop" puede que se vea reflejado como "Escritorio", por ejemplo: C:\Users\Miguel\Desktop\Docking deberá ser: C:\Users\NOMBRE DE USUARIO\ESCRITORIO\Docking
- Si el equipo de cómputo no cuenta con recursos suficientes, ir cerrando ventanas que ya no se utilicen para evitar retardos en el proceso.
- Utilizar mouse ya que el touchpad, en laptops, puede no ser preciso para algunas acciones que se llevarán a cabo.

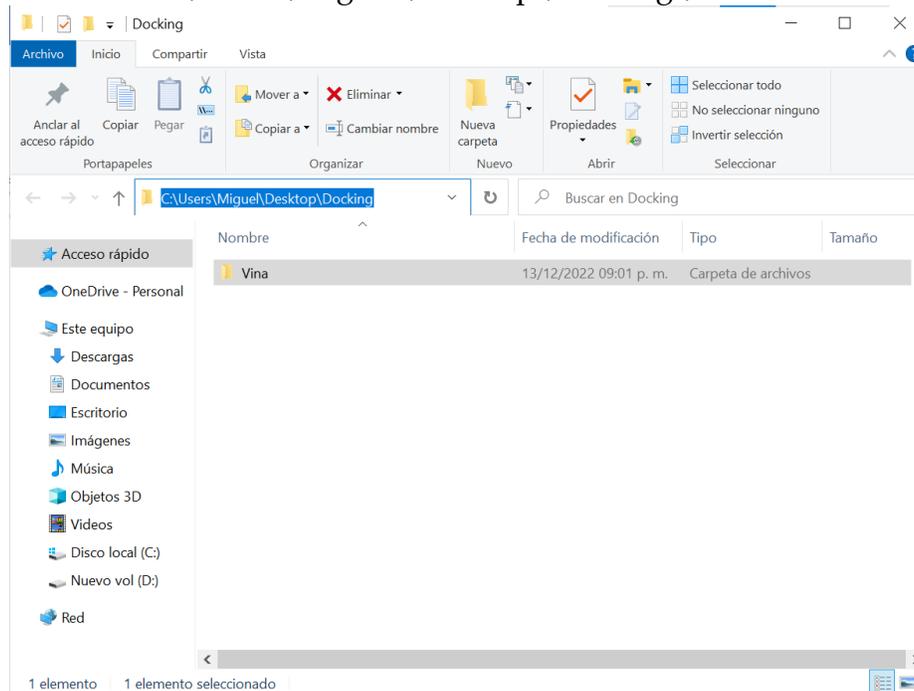
Para poder llevar a cabo el docking molecular del Flurbiprofeno con la COX y poder observar su afinidad con el sitio activo de ésta, proceder de la siguiente manera:

#### **2.4.1 Crear carpetas de fácil acceso para los archivos posteriores**

**2.4.1.1** Crear una carpeta de fácil acceso en el escritorio del equipo de cómputo llamada *Docking* (colocar el puntero en cualquier parte en blanco de su escritorio > clic derecho > Nuevo > Carpeta) por lo que la ruta de acceso a ésta será "C:\Users\Miguel\Desktop\Docking":



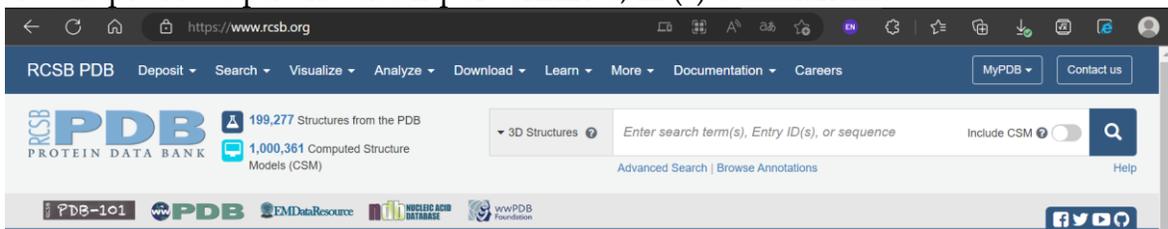
2.4.1.2 Dentro de la carpeta *Docking*, crear otra llamada *Vina*, por lo que la ruta de acceso a ésta será “C:\Users\Miguel\Desktop\Docking\Vina”:



## 2.4.2 Buscar la proteína de interés en RCSB PDB

2.4.2.1 Existen diversas páginas para buscar datos para utilizar en docking molecular, en el presente ejemplo se utiliza la página de “Research Collaboratory for Structural Bioinformatics” por sus siglas RCSB PDB en la siguiente liga: <https://www.rcsb.org/>.

2.4.2.2 Una vez dentro de la página, buscar la proteína de interés en la barra blanca de búsqueda. Se puede buscar por términos, ID(s) o secuencia.



2.4.2.3 Buscar la proteína con ID 3N8Z, seleccionar la única opción mostrada que debería ser la proteína buscada (Crystal Structure of Cyclooxygenase-1 in Complex with Flurbiprofen). Se muestran diversos apartados; los más destacados para un mejor rendimiento en el docking molecular son:

2.4.2.3.1 Organismo (preferente que sea para organismos Homo sapiens)

2.4.2.3.2 Mutaciones (No)

2.4.2.3.3 Método de cristalización (difracción de rayos X)

2.4.2.3.4 Resolución (preferente que sea menor a 3.0 Å)

2.4.2.3.5 Descargar archivos (de aquí se descargarán los archivos buscados)

2.4.2.3.1

2.4.2.3.2

2.4.2.3.3

2.4.2.3.4

Bajando más por la página, se llega al apartado de “Ligandos” y sus interacciones que posee la molécula con la proteína.

ID	Chains	Name / Formula / InChI Key	2D Diagram	3D Interactions
HEM <a href="#">Query on HEM</a>	H [auth A], M [auth B]	PROTOPORPHYRIN IX CONTAINING FE C <sub>34</sub> H <sub>32</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> KABFMIBPWXCXCRK-RGGAHWMSA-L		<a href="#">Ligand Interaction</a>
BOG <a href="#">Query on BOG</a>	I [auth A], J [auth A], K [auth A], N [auth B], O [auth B]	octyl beta-D-glucopyranoside C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> HEGSGKPOLMEBJL-RKQHYRCSA-N		<a href="#">Ligand Interaction</a>
FLP <a href="#">Query on FLP</a>	L [auth A], P [auth B]	FLURBIPROFEN C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> F O <sub>2</sub> SYTBZMRGLBWNTM-JTQLQIEISA-N		<a href="#">Ligand Interaction</a>

2.4.2.4 Identificados los puntos de interés, dar clic en “Download Files” (punto 2.4.2.3.5) y proceder a descargar el archivo “PDB Format” (no confundir con “PDB Format (gz)”, lo que descargará el archivo 3n8z.pdb:

The screenshot shows the RCSB PDB website interface for structure 3N8Z. The main content area displays the structure's name, classification (OXIDOREDUCTASE), organism (Ovis aries), and expression system (Spodoptera frugiperda). A dropdown menu under "Download Files" is open, showing various format options. The "PDB Format" option is highlighted.

Format
FASTA Sequence
PDBx/mmCIF Format
PDBx/mmCIF Format (gz)
<b>PDB Format</b>
PDB Format (gz)
PDBML/XML Format (gz)
Structure Factors (CIF)
Structure Factors (CIF - gz)

2.4.2.5 Descargado el archivo 3n8z.pdb, localizar el archivo en la carpeta de “Descargas” y copiar este archivo a la carpeta *Docking* del punto 2.4.1.1:

**Nota:** Puede ser que el archivo únicamente lleve por nombre 3n8z sin la extensión “.pdb”, para corroborar que el archivo corresponde a la extensión, dar clic derecho sobre el mismo > propiedades > Tipo de archivo > (.pdb) que indica la extensión del archivo.

The screenshot shows a Windows File Explorer window titled "Docking". The address bar shows the path "Docking". The main pane displays a list of files and folders:

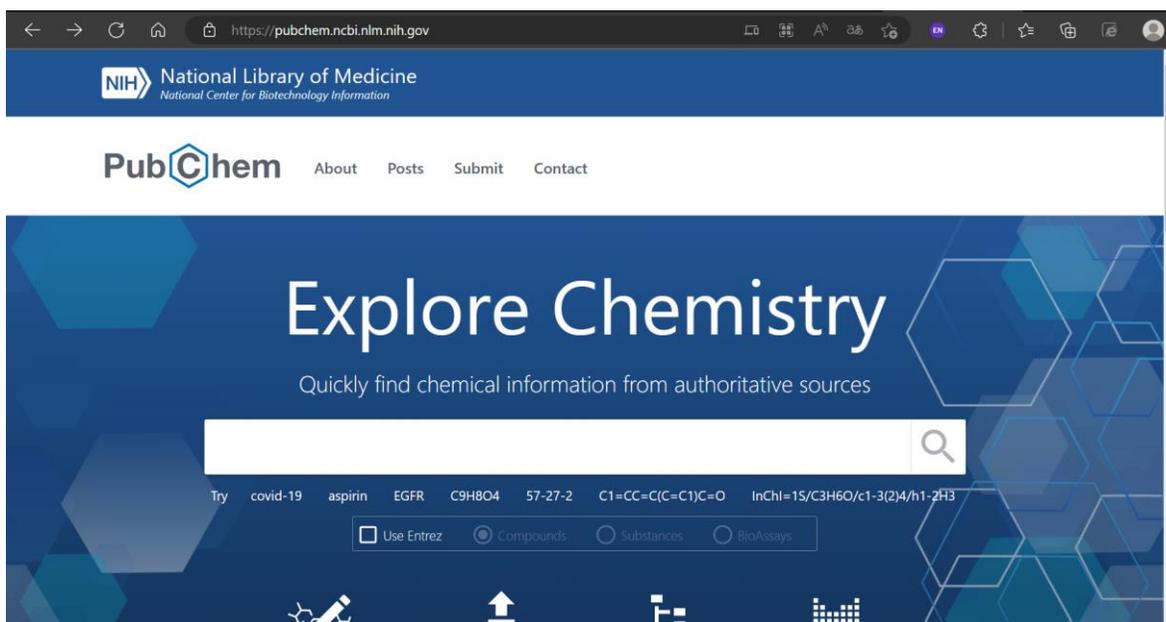
Nombre	Fecha de modificación	Tipo	Tamaño
Vina	13/12/2022 09:01 p. m.	Carpeta de archivos	
3n8z	14/12/2022 11:12 a. m.	BIOVIA Discovery ...	1,570 KB

The status bar at the bottom indicates "2 elementos" and "1 elemento seleccionado 1.53 MB".

## 2.4.3 Buscar un ligando en PubChem

2.4.3.1 Para buscar el ligando o molécula de interés, existen diversas páginas para ello o inclusive programas como Avogadro, ChemBioOffice, entre otros, permiten realizar estructuras moleculares con libertad y éstas pueden ser utilizadas para el docking molecular, pero en este ejemplo se utiliza la página “PubChem National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (NLM), National Institutes of Health (NIH)” en la siguiente liga: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Una vez dentro de la página, buscar el ligando o molécula de interés en la caja de búsqueda. Aquí se pueden buscar por términos, CAS, principio activo, entre otros:



The screenshot displays the PubChem website interface. At the top, the NIH logo and "National Library of Medicine" are visible. Below this is the "PubChem" logo and navigation links for "About", "Posts", "Submit", and "Contact". The main heading is "Explore Chemistry" with the tagline "Quickly find chemical information from authoritative sources". A large search bar is present, with a magnifying glass icon on the right. Below the search bar, there are several search suggestions: "Try covid-19", "aspirin", "EGFR", "C9H8O4", "57-27-2", "C1=CC=C(C=C1)C=O", and "InChI=1S/C3H6O/c1-3(2)/4/h1-2H3". Below the suggestions, there are three radio buttons: "Use Entrez" (unchecked), "Compounds" (checked), "Substances" (unchecked), and "BioAssays" (unchecked). At the bottom, there are four icons representing different search or analysis tools.

2.4.3.2 Buscar la molécula “Flurbiprofen”, seleccionar la primera opción dada en el apartado de “Compound”. Dirigirá a la página del compuesto, dar clic en la primera opción que aparece en el apartado “BEST MATCH”:

The screenshot shows the PubChem website interface. At the top, there is a search bar with the text 'flurbiprofen' entered. Below the search bar, the text 'Treating this as a text search.' is visible. Underneath, the 'BEST MATCH' section displays the chemical structure of Flurbiprofen and its associated information:

- Flurbiprofen; 5104-49-4; Ansaïd; Froben; Antadys; 2-(2-Fluorobiphenyl-4-Yl)Propanoic Acid; Cebutid; Flurofen;**
- Compound CID: 3394
- MF: C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>FO<sub>2</sub> MW: 244.26g/mol
- IUPAC Name: 2-(3-fluoro-4-phenylphenyl)propanoic acid
- Isomeric SMILES: CC(C1=CC(=C(C=C1)C2=CC=CC=C2)F)C(=O)O
- InChIKey: SYTBZMRGLBWNTM-UHFFFAOYSA-N
- InChI: InChI=1S/C15H13FO2/c1-10(15(17)18)12-7-8-13(14(16)9-12)11-5-3-2-4-6-11/h2-10H,1H3,(H,17,18)
- Create Date: 2005-03-25

At the bottom of the result box, there are links for 'Summary', 'Similar Structures Search', 'Related Records', and 'PubMed (MeSH Keyword)'.

2.4.3.3 Una vez determinada la estructura desaseada, dar clic en “Download”, dar clic en el apartado “Save” de “SDF” en “3D Conformer” (recuadro negro) para descargar una estructura en 3D:

**Nota:** También se pueden descargar y utilizar estructuras en 2D ya que el programa Avogadro, realiza arreglos para que la molécula en 2D pase a ser 3D.

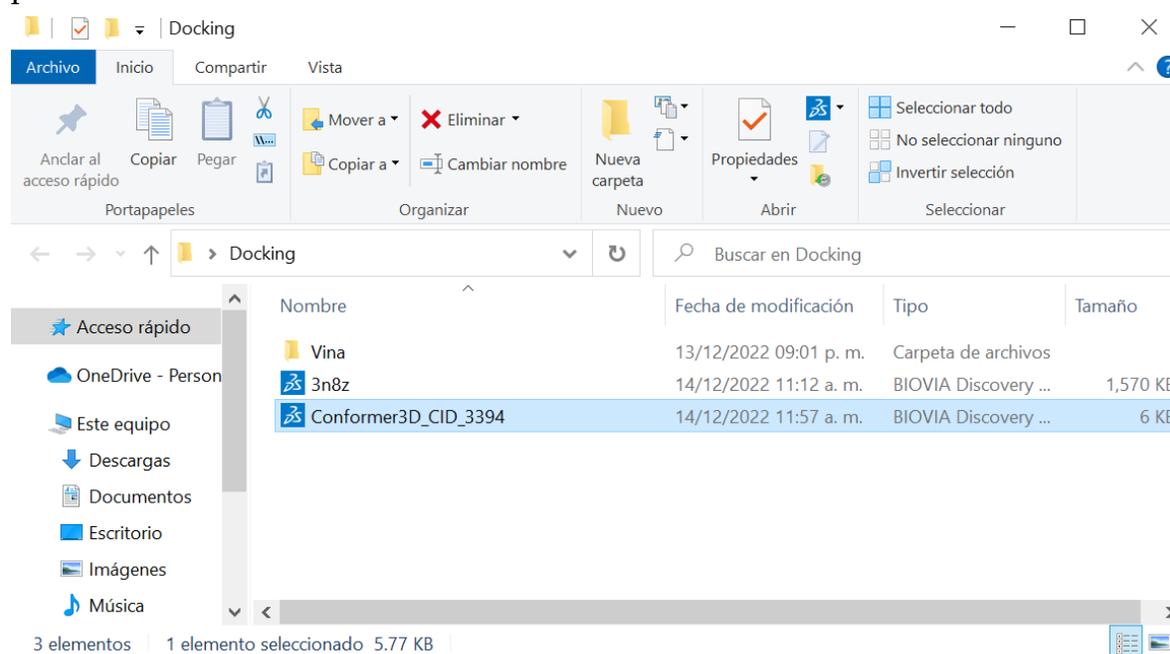
The screenshot shows the 'DOWNLOAD' dialog box on the PubChem website. The dialog is titled 'DOWNLOAD' and contains several sections for downloading data:

- Data Used to Display This Page:** Includes buttons for 'JSON', 'XML', and 'ASNT', each with 'Save' and 'Display' options.
- 2D Structure:** Includes buttons for 'SDF', 'JSON', and 'XML', each with 'Save' and 'Display' options, and a 'Save' button for 'ASNT'.
- 3D Conformer:** Includes buttons for 'SDF', 'JSON', and 'XML', each with 'Save' and 'Display' options, and a 'Save' button for 'ASNT'. The 'Save' button for 'SDF' is highlighted with a black box.

At the bottom of the dialog, there is a section titled 'Looking to Download a PDF of This Page?'.

The URL in the browser's address bar is: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/rest/pug/compound/CID/3394/record/SDF?record\\_type=3d&response\\_type=save&response\\_basename=Conformer3D\\_CID\\_3394](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/rest/pug/compound/CID/3394/record/SDF?record_type=3d&response_type=save&response_basename=Conformer3D_CID_3394)

**2.4.3.4** Descargará un archivo con nombre “Conformer3D\_CID\_3394”, ubicar el archivo en la carpeta de “Descargas” y copiar el archivo a la carpeta *Docking* del punto **2.4.1.1**:



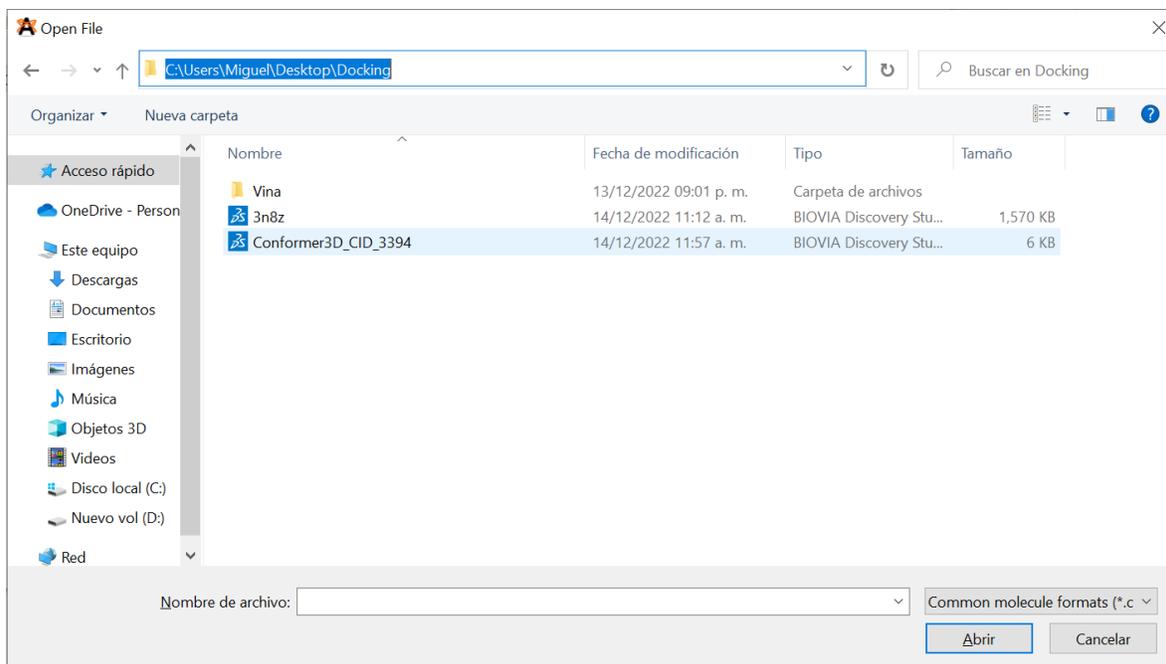
## 2.4.4 Modificar un ligando en Avogadro

**2.4.4.1** Abrir el programa Avogadro instalado en el punto **2.3.1**, dar clic en el icono correspondiente encontrado en el escritorio:



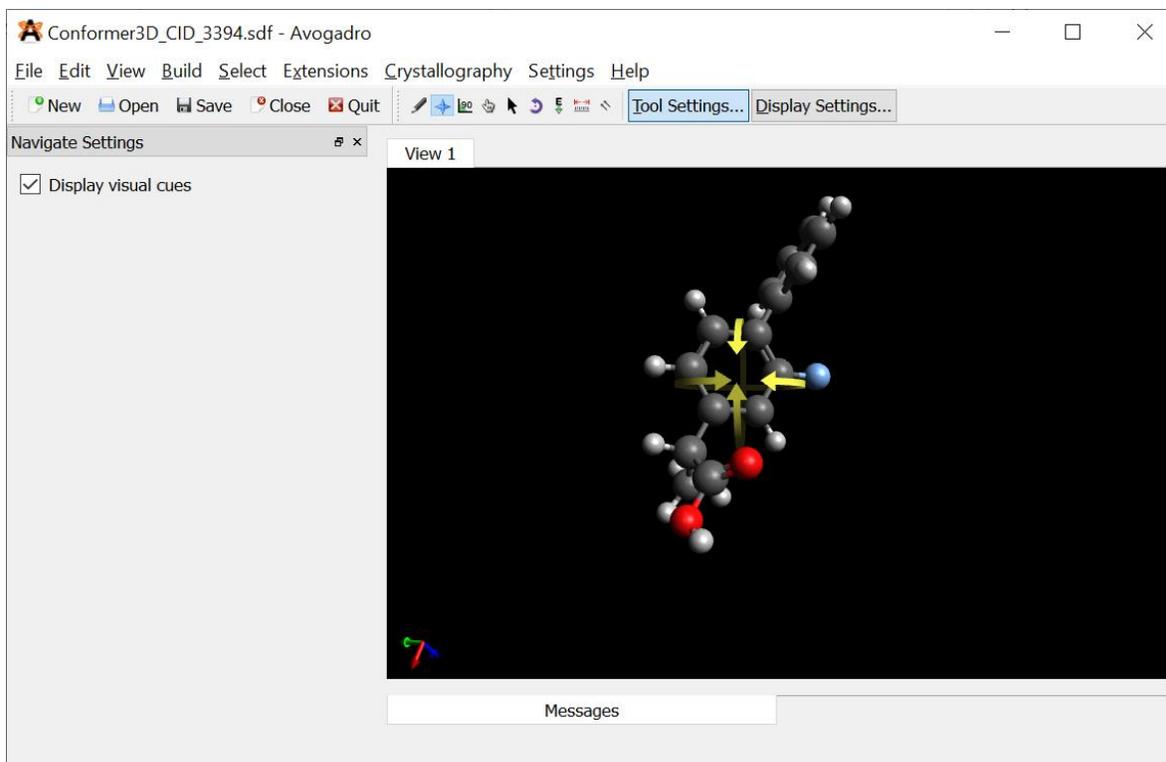
**2.4.4.2** Una vez abierto el programa, abrir el ligando en la ubicación donde se guardó (en el caso del ejemplo, seguir la ruta del directorio de la carpeta de *Docking* del punto **2.4.1.1**), dar clic en **File>Open> C:\Users\Miguel\Desktop\Docking\Conformer3D\_CID\_3394\Abrir**:

**Nota:** Para encontrar la carpeta donde se encuentra el archivo en cuestión, navegar por el panel ubicado a la izquierda de la ventana, si la carpeta se encuentra en el escritorio, en el panel izquierdo, dar clic en **Escritorio>Docking**, debería visualizarse el archivo como en la siguiente imagen:

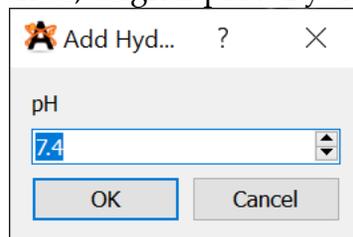


**2.4.4.3** Si se descargó la figura en 3D, se visualizará en la ventana del programa, si se descargó en 2D, el programa realizará los arreglos correspondientes para su conversión a 3D.

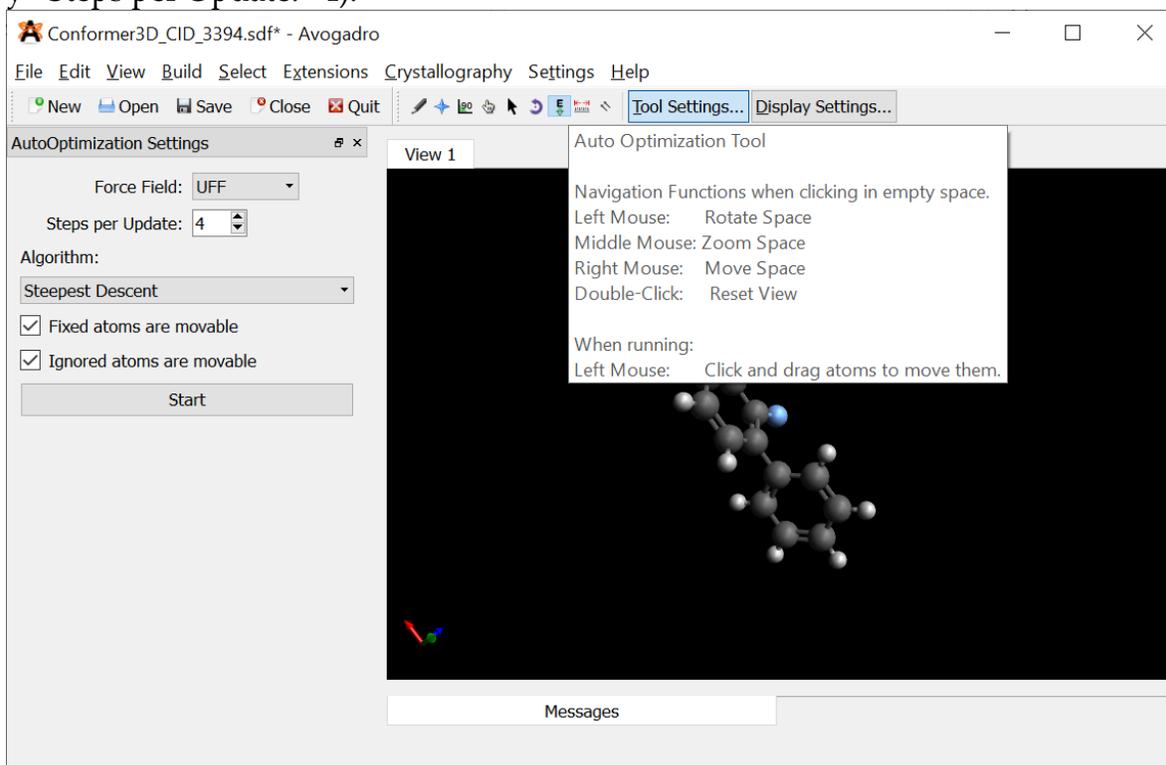
Se mostrará la molécula en la ventana principal. Se manipula manteniendo apretado clic izquierdo para que rote sobre su propio eje, con el clic derecho se mueve de lugar en los ejes X, Y, y con la rueda del ratón se aleja o acerca la molécula.



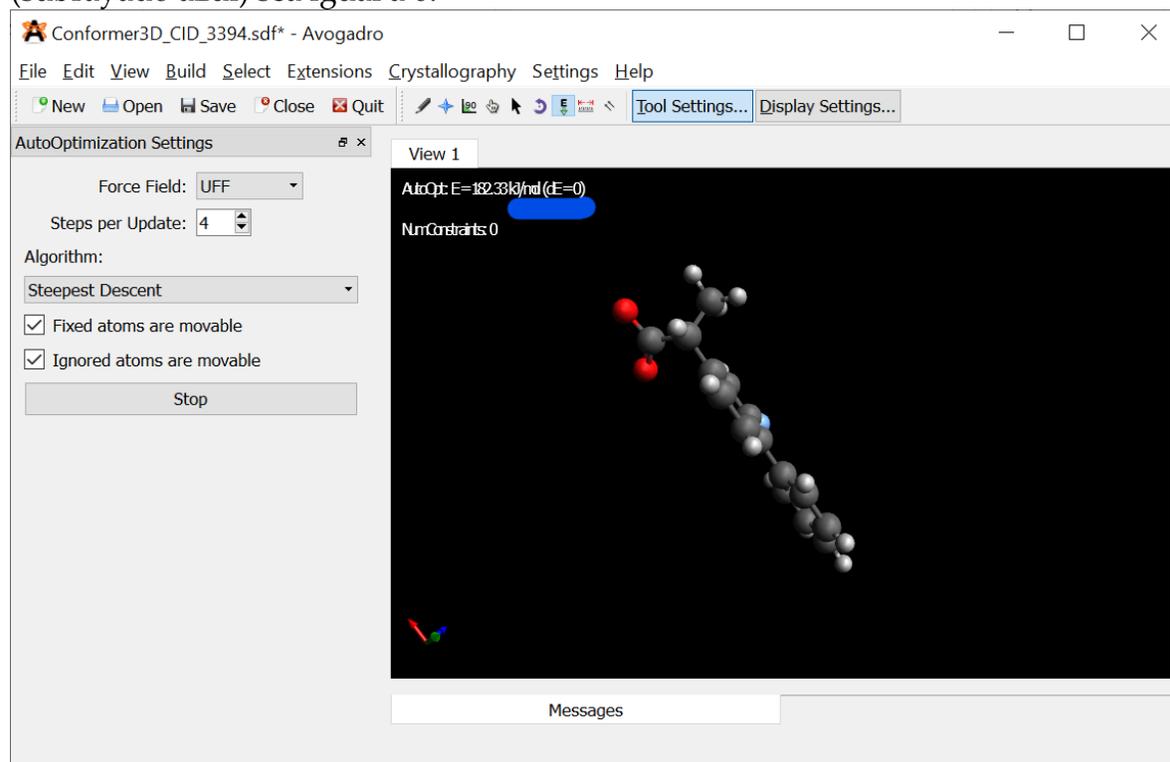
2.4.4.4 Para seguir optimizando la molécula, dar clic en Build>Add Hydrogens for pH... Dirigirá a una ventana para elegir a qué nivel de pH se requiere agregar o remover los hidrógenos presentes, asignar pH 7.4 y dar clic en "OK":



2.4.4.5 Posteriormente, dar clic en Auto Optimization Tool (letra E con una flecha verde debajo enmarcada en un recuadro azul en la imagen), abrirá un panel a la izquierda, dar clic en las casillas “Fixed atom are movable” y “Ignored atoms are movable”, dar clic en “Start” (dejar los demás datos sin modificar, hablando de UFF y “Steps per Update:” 4):



**2.4.4.6** Comenzará por hacer arreglos de energía, esperar hasta que el valor de  $dE$  (subrayado azul) sea igual a 0:

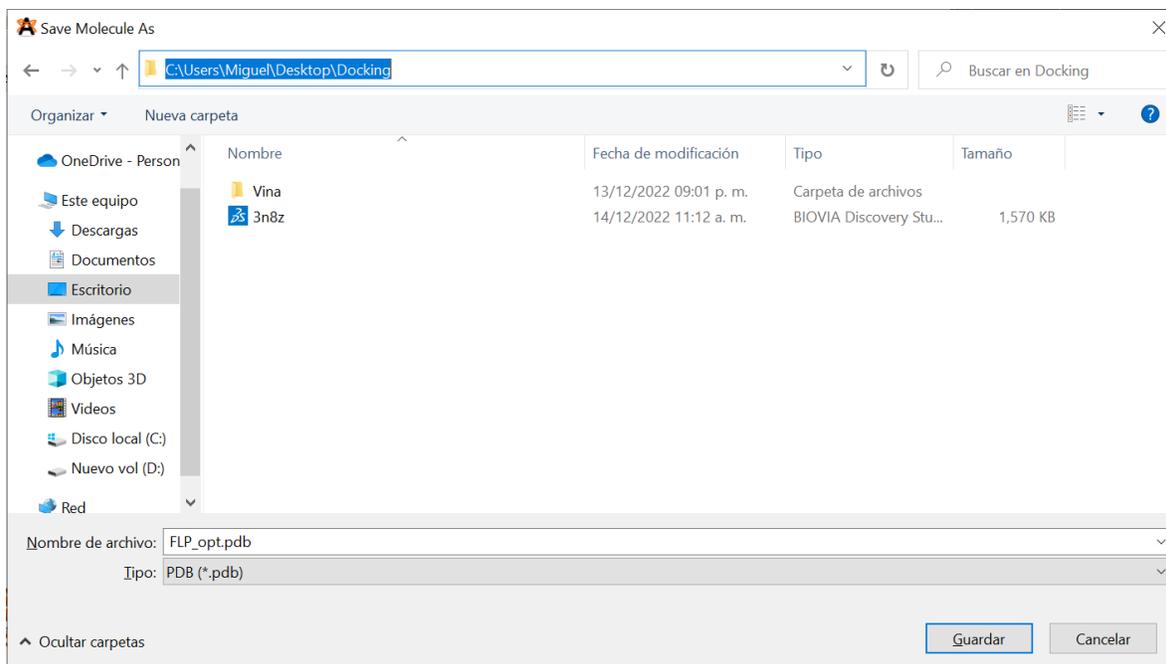


**2.4.4.7** Para terminar y guardar la molécula optimizada, dar clic en a File>Save As... Ubicar la carpeta de *Docking* del punto 2.4.1.1 y guardar la molécula con el nombre:

FLP\_opt.pdb

Asegurar que en el apartado "Tipo" se encuentre seleccionada la extensión "PDB (\*.pdb)" y dar clic en "Guardar".

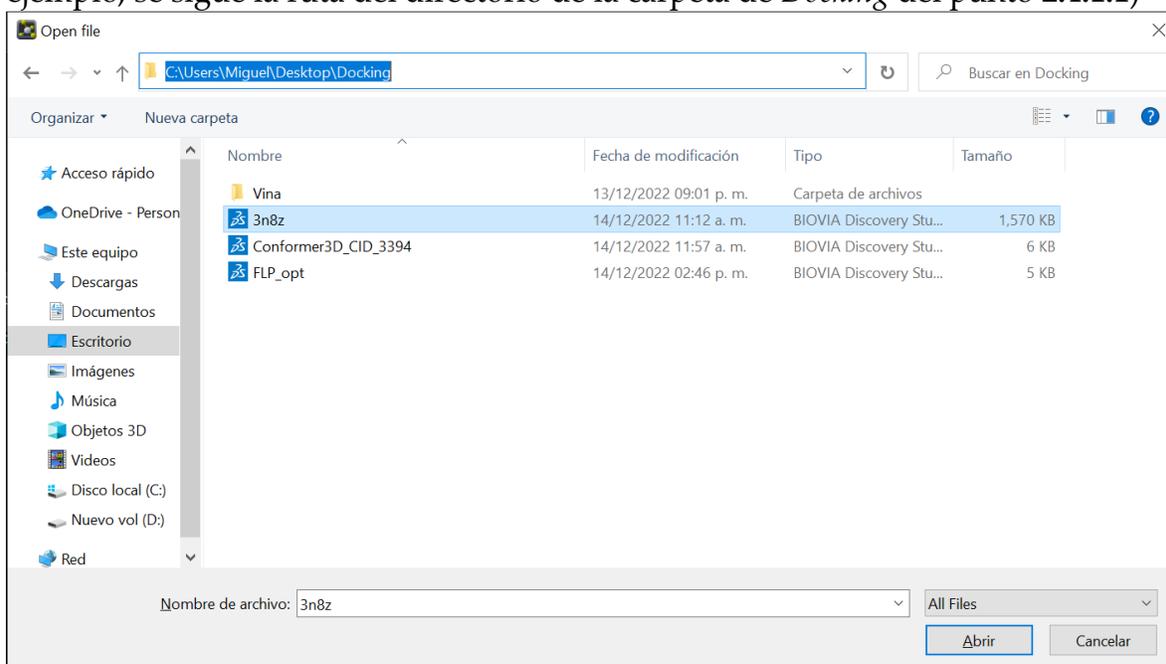
**Nota:** Considerar mayúsculas y signos de puntuación. Aunque el apartado "Tipo" esté seleccionado para la extensión "PDB (\*.pdb)" es necesario poner en el nombre la terminación .pdb



Cerrar el programa si el equipo de cómputo no cuenta con suficientes recursos.

## 2.4.5 Modificar una proteína en PyMOL

**2.4.5.1** Ejecutar el programa PyMOL según los puntos 2.3.5.14 a 2.3.5.15. Dar clic en File>Open> C:\Users\Miguel\Desktop\Docking\3n8z\Abrir (en el caso del ejemplo, se sigue la ruta del directorio de la carpeta de *Docking* del punto 2.4.1.1)

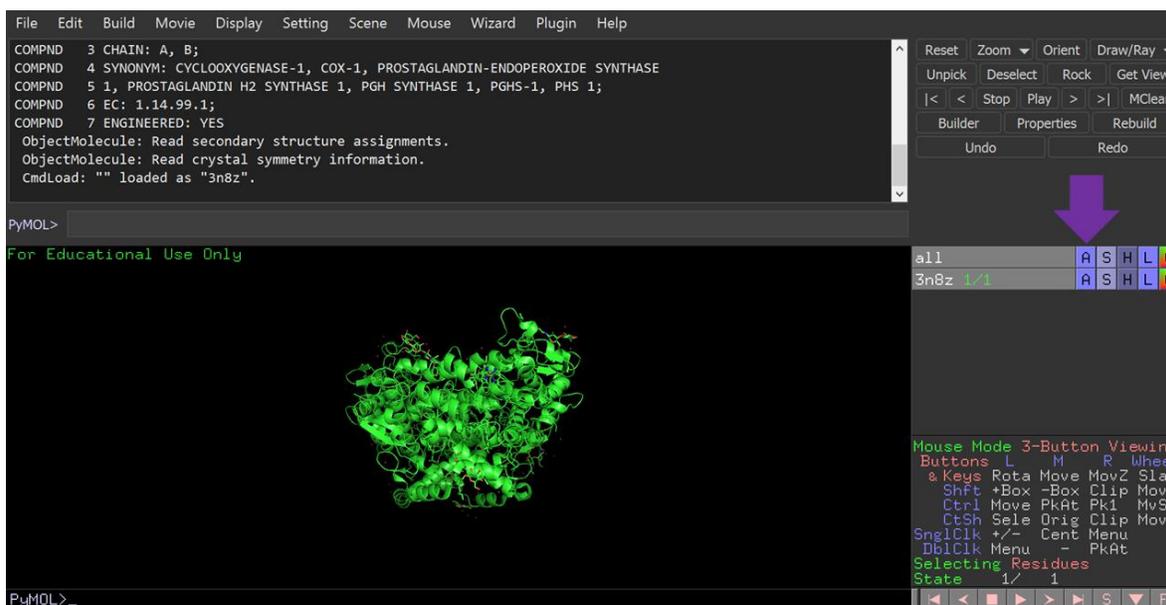


Abrirá la molécula descargada en los puntos 2.4.2.4 a 2.4.2.5, y se visualizará en el programa.

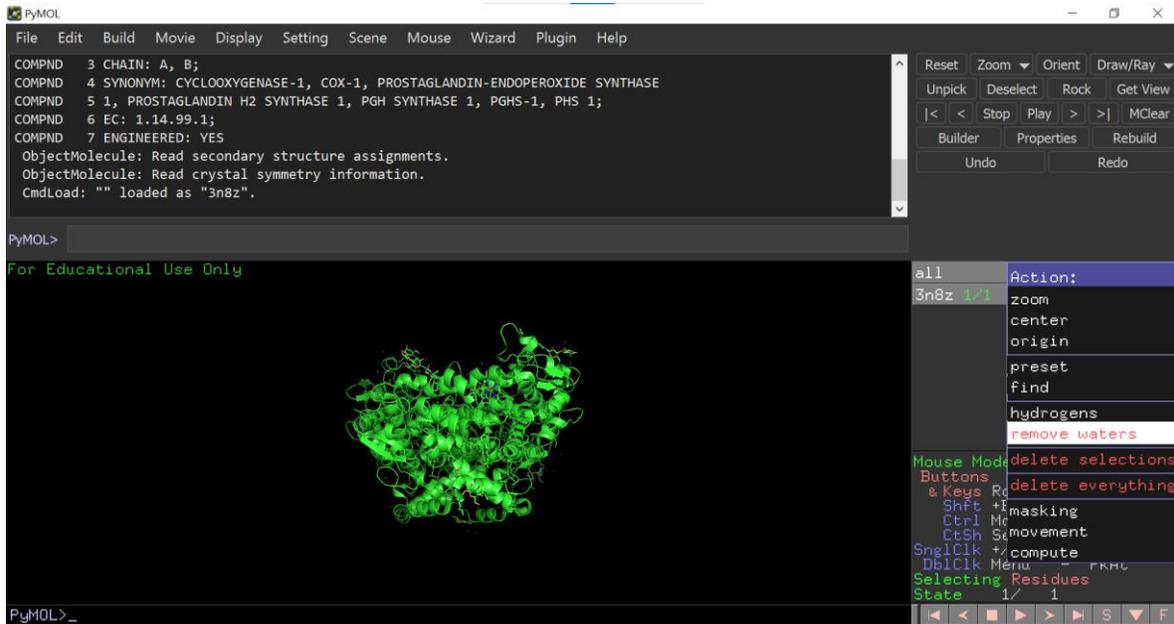
**2.4.5.2** Al igual que en el punto **2.4.4.3**, manteniendo el clic izquierdo puede girar la proteína sobre su propio eje, manteniendo el clic derecho acercará o alejará la proteína se realizan movimientos hacia arriba o abajo con el mouse, respectivamente.

**2.4.5.3** La proteína descargada en el punto **2.4.2.4**, se descarga con moléculas de agua cristalizada, las cuales serán eliminadas de la proteína para evitar interacciones indeseadas. Para esto, en el cuadrante superior derecho de la pantalla. localizar “all” y “3n8z” (flecha morada).

Dar clic en la letra “A” (flecha y fondo morado) del apartado “all”, lo cual desplegará un menú de “Acción”:



Dar clic en “remove water” (letras rojas, fondo blanco) del menú antes desplegado para eliminar el agua cristalizada de toda la proteína:



Notar que los puntos rojos alrededor de la molécula desaparecen.

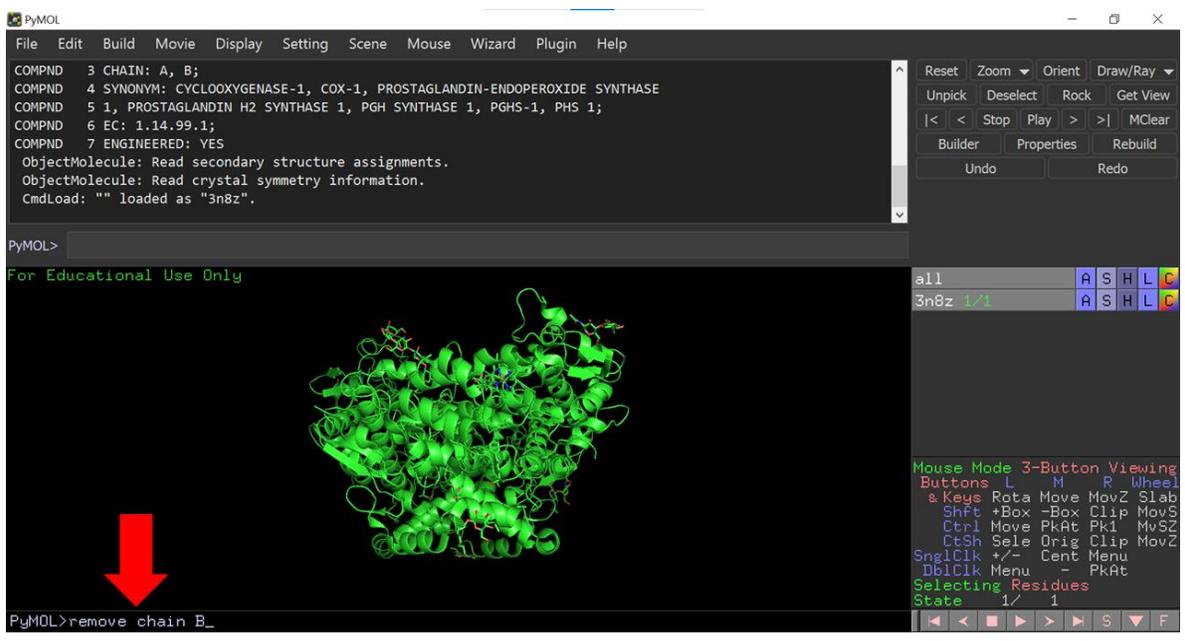
**2.4.5.4** La proteína se compone por 2 subunidades A y B, en este ejemplo se trabaja con la cadena A, eliminando la cadena B, y se remueven los ligandos añadidos que tampoco son de interés.

Para remover la cadena B, escribir en la barra de comando (flecha roja) la siguiente orden y luego oprimir la tecla “Enter” del teclado:

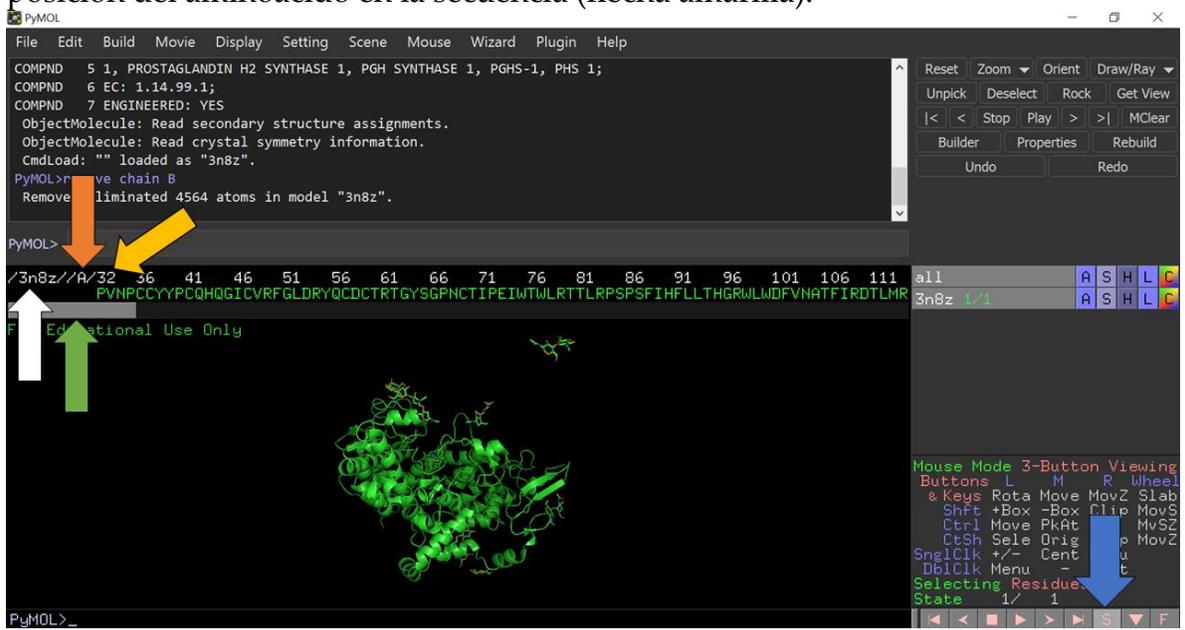
remove chain B

(Distinguir que hay espacios y la letra B es mayúscula)

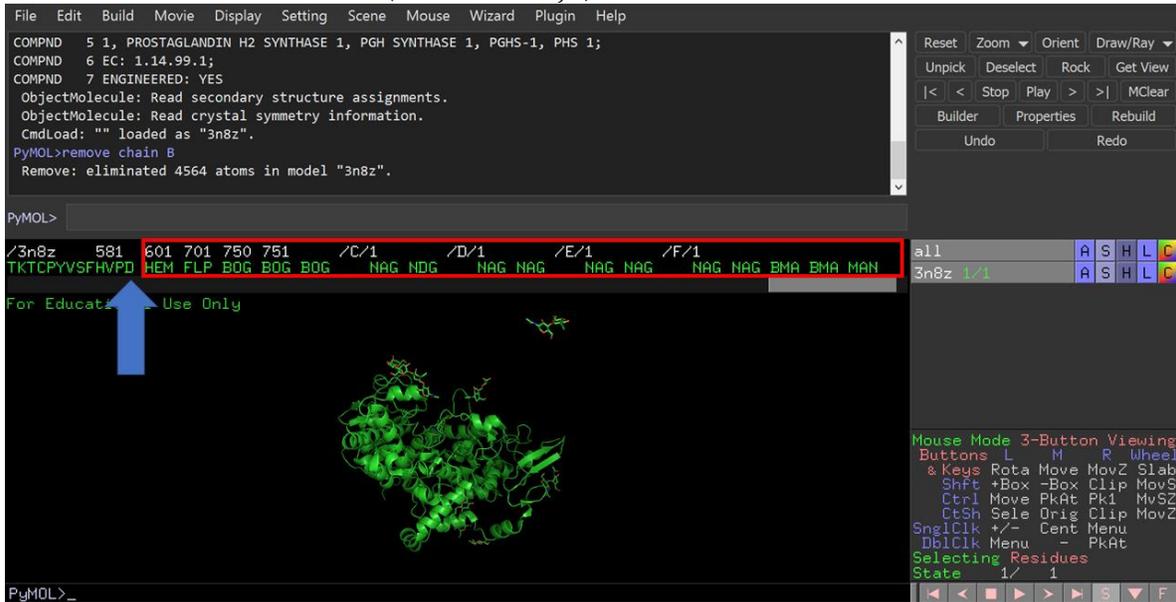
Notar que la proteína se reduce de tamaño ya que se removió la mitad de su estructura.



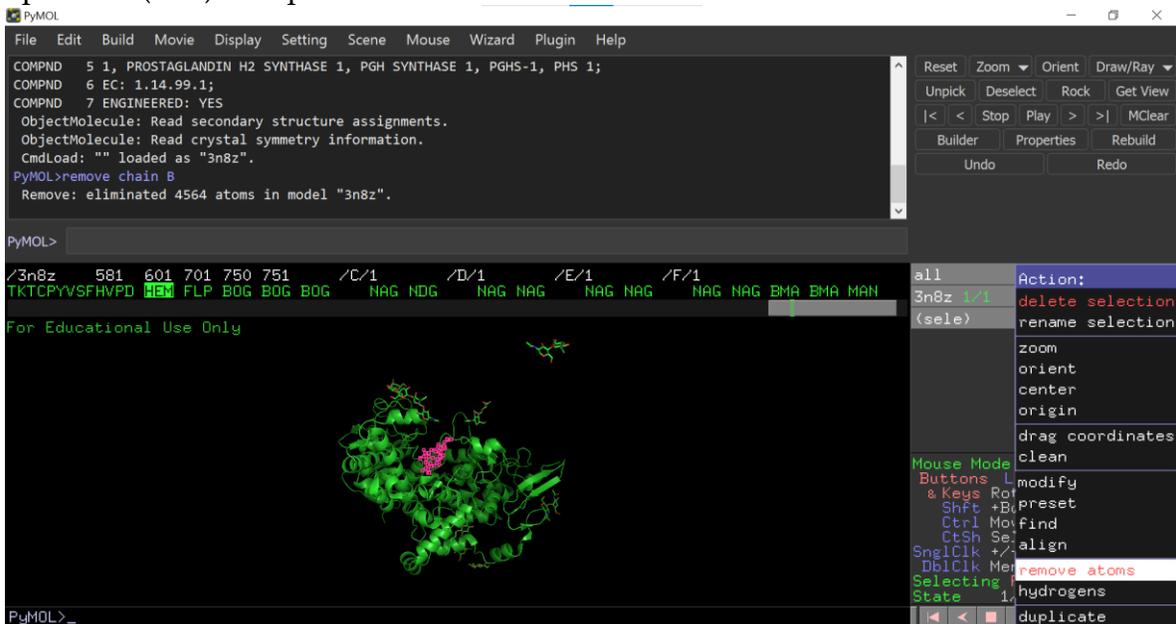
2.4.5.5 Para remover los ligandos añadidos, es necesario ver la secuencia de la proteína, dar clic en la letra S (flecha azul) o dar clic en Display>Sequence. Desplegará una nueva barra de desplazamiento a través de la secuencia (flecha verde), mostrará el nombre del archivo cargado o el nombre de la proteína dada (flecha blanca), la cadena inicial de la secuencia (flecha naranja) y el número o posición del aminoácido en la secuencia (flecha amarilla).



2.4.5.6 Desplazar a través de la barra deslizante (flecha verde de la imagen del punto 2.4.5.5) hasta encontrar el final de la cadena de aminoácidos, ubicar el aminoácido final atribuible a la proteína (flecha azul) y seguido, identificar los residuos que no son atribuibles a la proteína, es decir, los ligandos y residuos que se encontraban cristalizados con la misma (recuadro rojo):

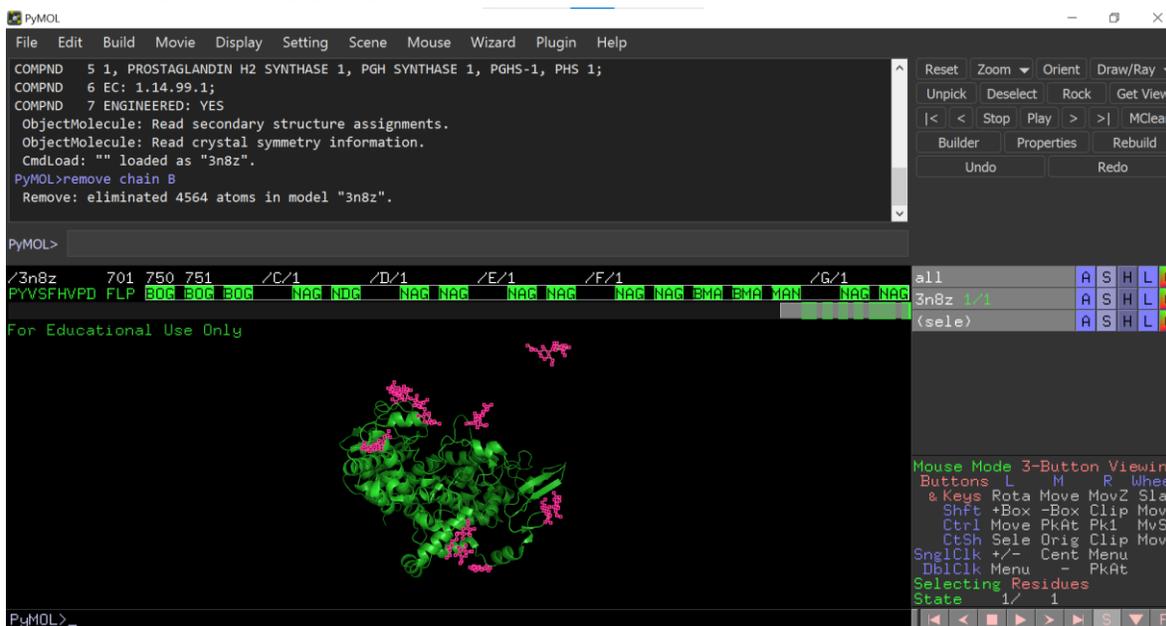


2.4.5.7 Para eliminar solo el residuo “HEM”, dar clic en las letras verdes “HEM” y observar en el cuadrante derecho el apartado (sele), dar clic en la letra “A” de (sele) para que desplace el menú de acción, dar clic en la opción “remove atoms” (letras rojas, fondo blanco), observar que la molécula “HEM” se elimina de la proteína y el apartado (sele) desaparece:



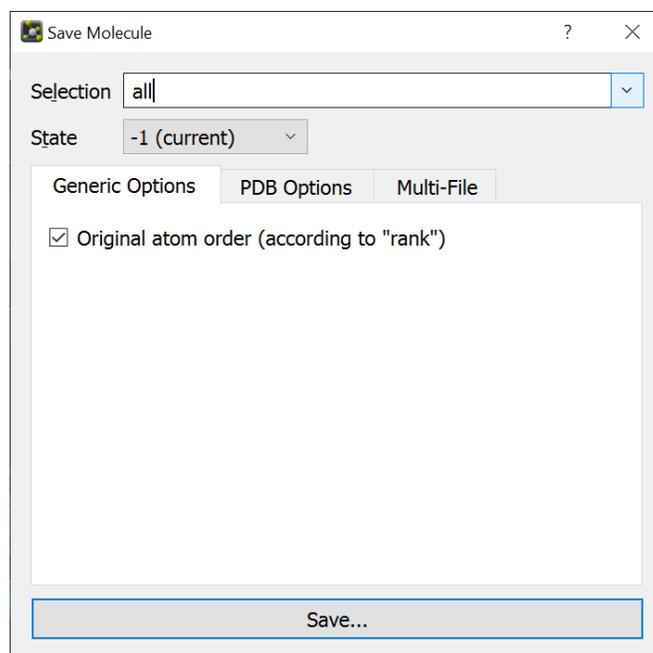
**Nota:** En el punto 2.4.5.8 se eliminan los residuos “BOG”, “NAG”, “NDG”, “BMA” y “MAN”, sin embargo, se debe tener cuidado de no eliminar el residuo “FLP” ya que será ocupado posteriormente.

**2.4.5.8** Para seleccionar los residuos “BOG”, “NAG”, “NDG”, “BMA” y “MAN”, dejar apretado el clic izquierdo sobre “BOG” y deslizar el puntero del mouse a la derecha para seleccionar las unidades a la derecha. Observar, como en el punto 2.4.5.7, que resaltan las moléculas seleccionadas y aparece el apartado de (sele). Para remover las moléculas, dar clic en “A” de (sele) y luego “remove atoms” para eliminar los residuos seleccionados:



**2.4.5.9** Se tendrá como resultado la proteína con el ligando “FLP”. Dar clic en File>Export Molecule.

Aparecerá una ventana, dar clic en el apartado “Selection”, desplazar la lista hasta encontrar la opción “all”. El apartado State se quedará tal cual como está, marcar la casilla de “Original atom order (according to “rank”)”. Dar clic en “Save...” lo que conducirá a guardar la proteína con el ligando FLP acoplado:

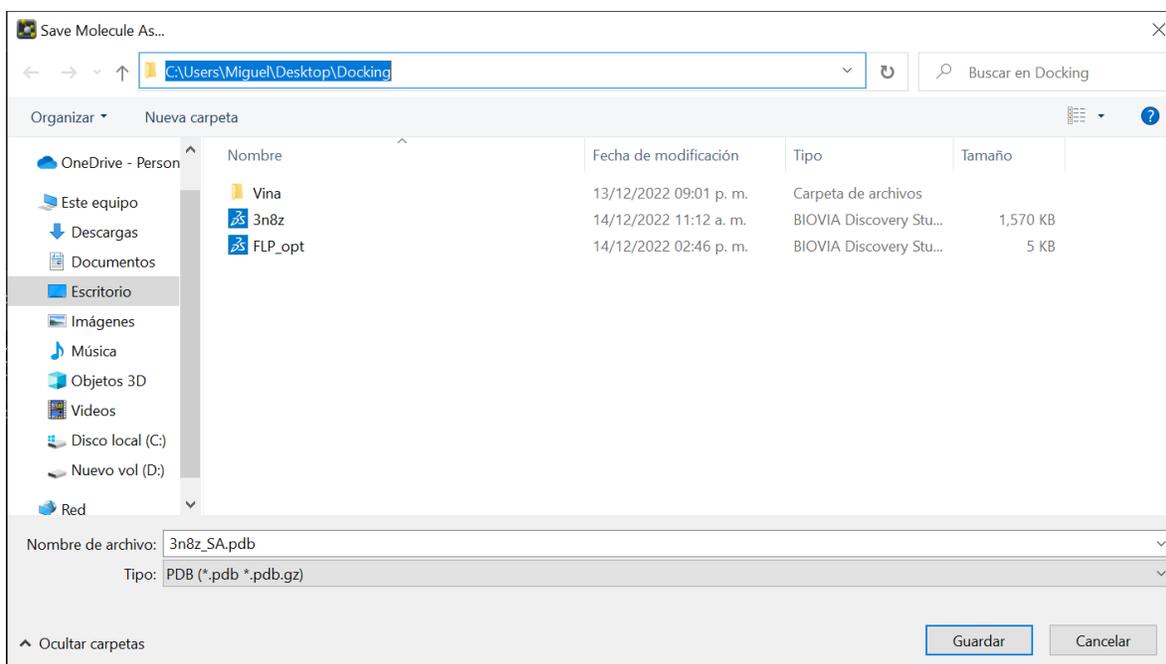


**2.4.5.10** Guardar la molécula en la dirección de la carpeta *Docking* del paso **2.4.1.1** con el nombre:

3n8z\_SA.pdb

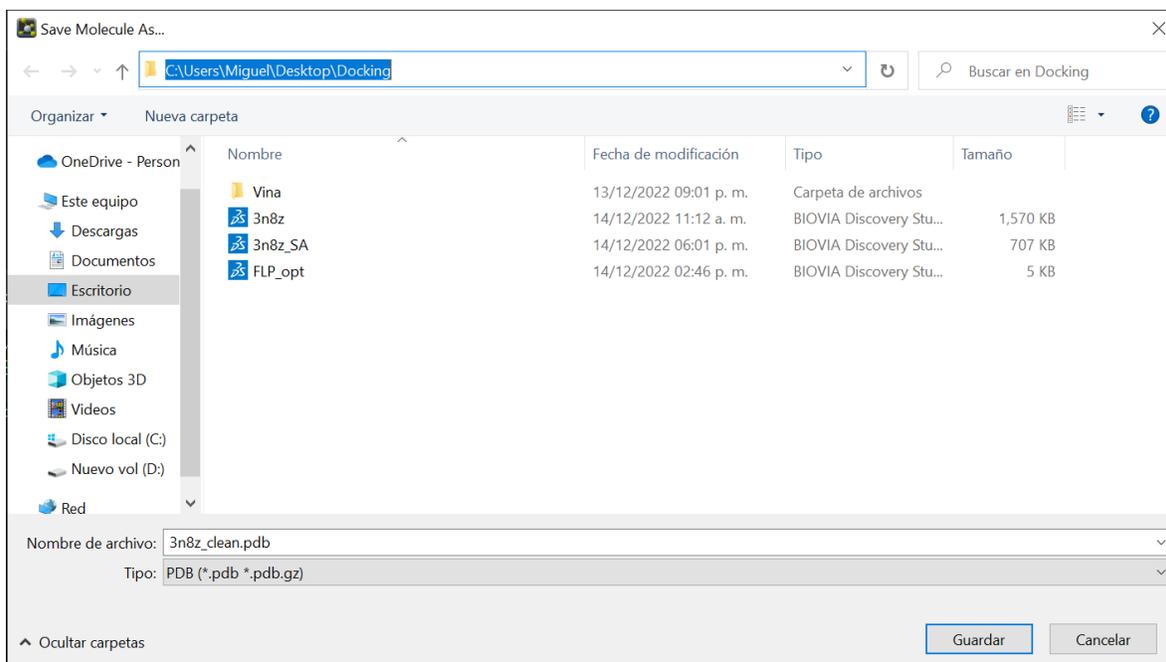
Asegurar que en el apartado "Tipo" se encuentre seleccionada la opción "PDB (\*.pdb)", no confundir con "PDBx/mmCIF", y dar clic en "Guardar".

**Nota:** Considerar mayúsculas y signos de puntuación. Aunque el apartado "Tipo" esté seleccionado para la extensión "PDB (\*.pdb)" es necesario poner en el nombre la terminación .pdb



**2.4.5.11** Repetir los pasos del punto 2.4.5.7 para seleccionar y eliminar el ligando “FLP” de la proteína. Guardar la molécula sola como los pasos 2.4.5.9 y 2.4.5.10 con el siguiente nombre:

3n8z\_clean.pdb



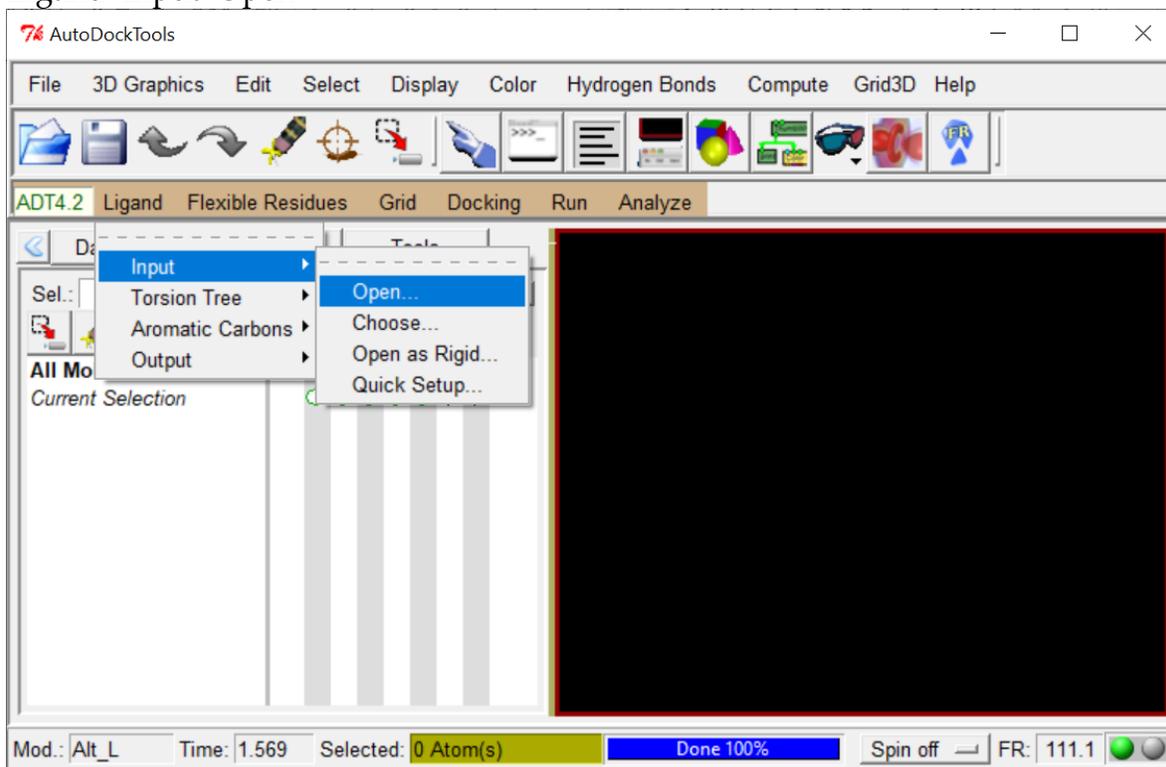
Cerrar el programa si el equipo de cómputo no cuenta con suficientes recursos.

## 2.4.6 Optimización del ligando en AutoDock Tools

2.4.6.1 Abrir el programa AutoDockTools-1.5.7 instalado en el punto 2.3.4, dar clic en su icono correspondiente encontrado en el escritorio:

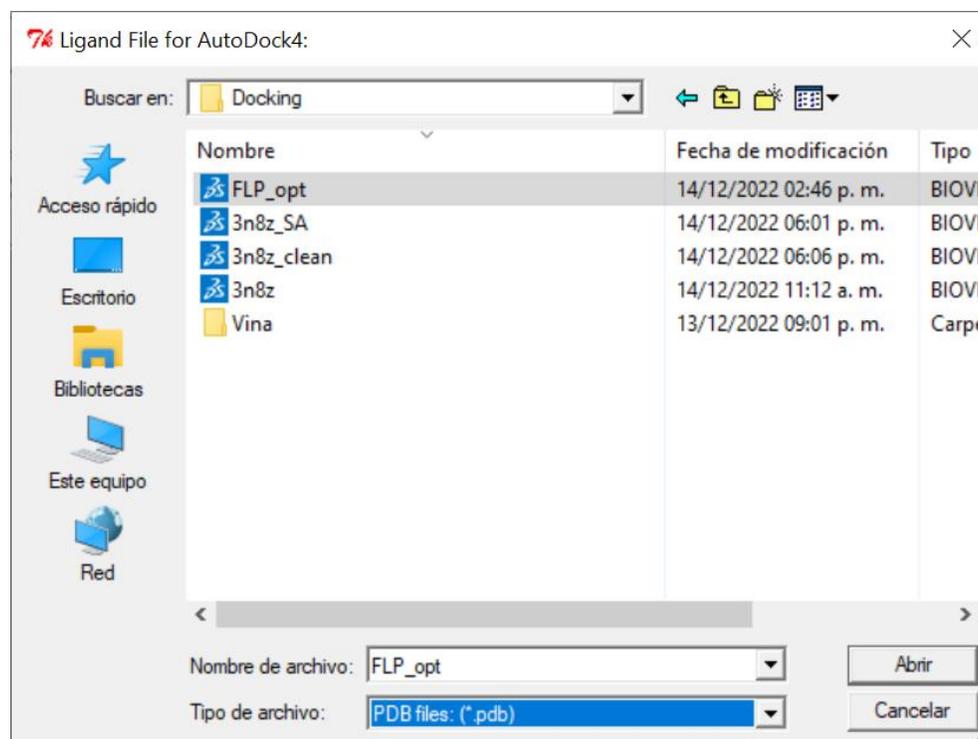


2.4.6.2 Una vez que el programa se encuentre abierto, dar clic en Ligand>Input>Open...

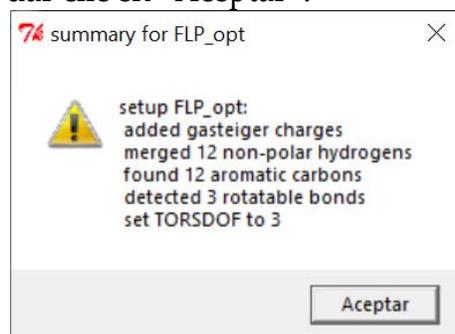


2.4.6.3 Aparecerá una ventana para buscar el archivo. Del lado izquierdo de la ventana se navega entre diversos paneles, dar clic en "Escritorio" y luego en la carpeta "Docking".

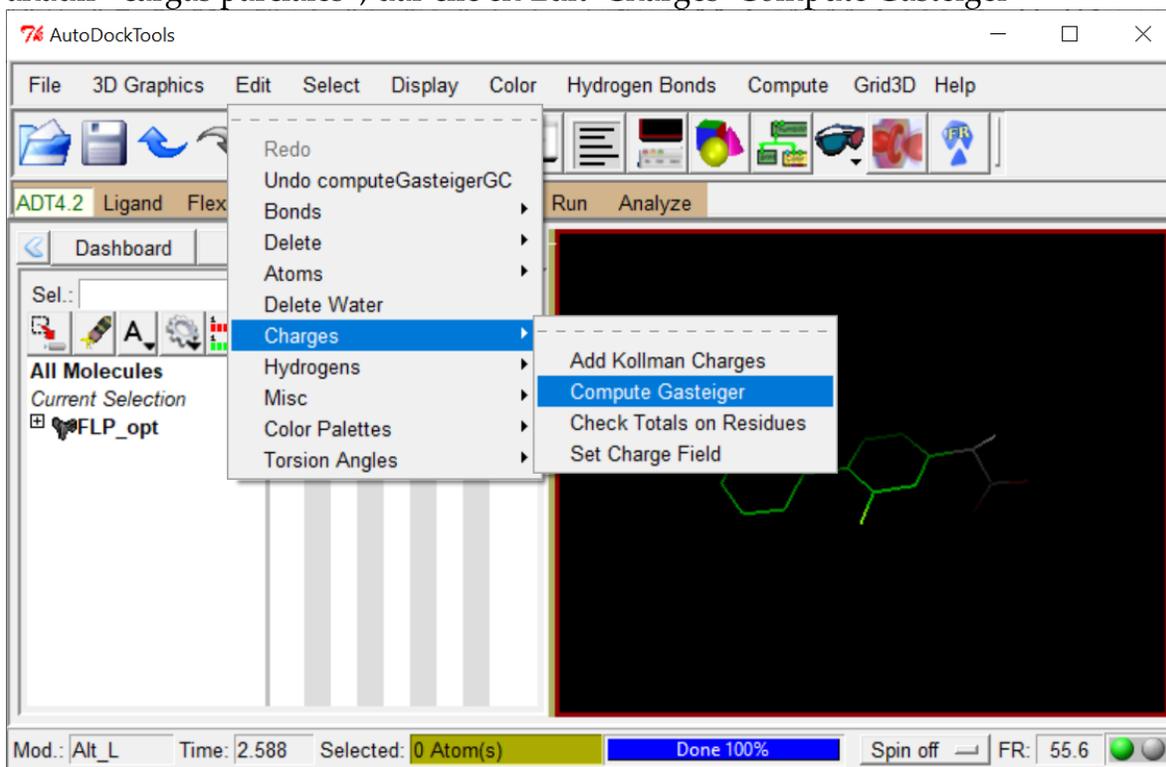
Abrir el archivo *FLP\_opt.pdb* guardado en los puntos 2.4.3.3 a 2.4.3.4. Seleccionar en "Tipo de archivo" "PDB Files (.pdb)" ya que por default el programa estará buscando archivos con terminación (.pdbqt), luego dar clic en "Abrir":



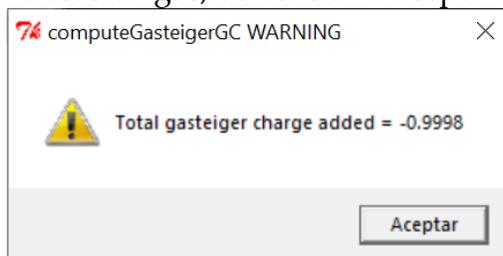
2.4.6.4 Aparecerá una ventana informando acerca de las torciones encontradas en la molécula y demás datos, dar clic en “Aceptar”:



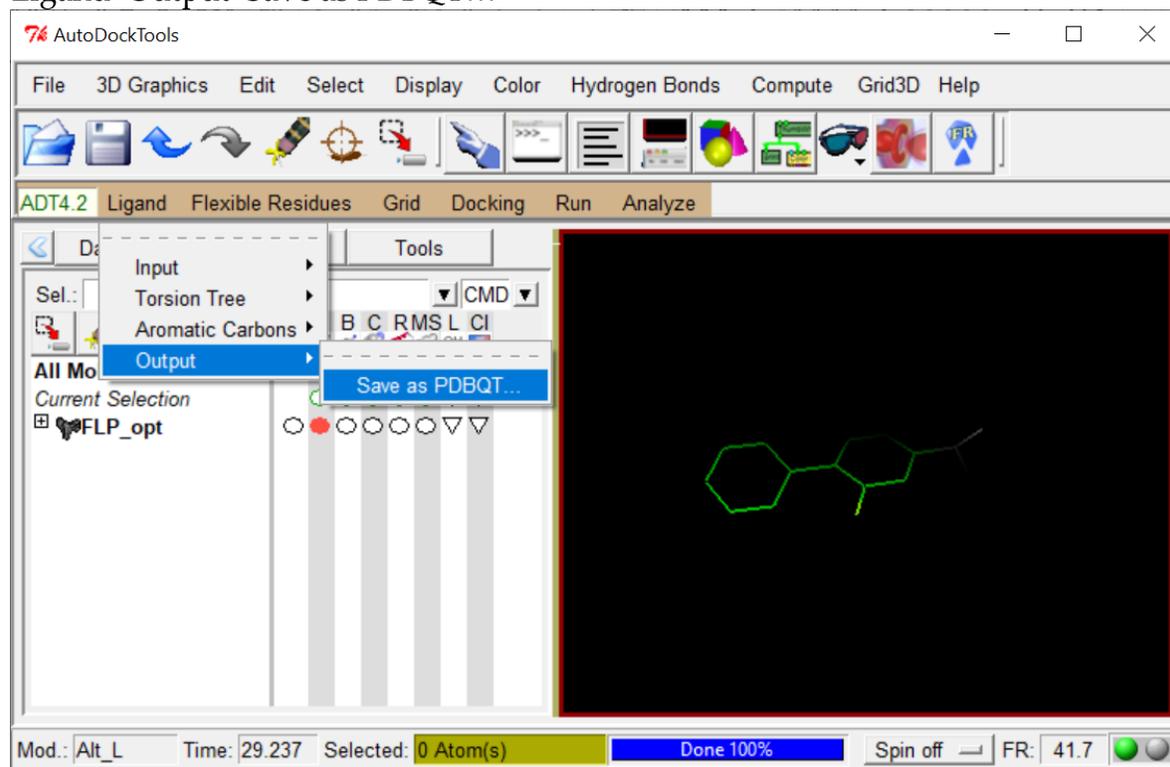
2.4.6.5 La molécula podrá ser manipulada al igual que en el punto 2.4.4.3. Para añadir “cargas parciales”, dar clic en Edit>Charges>Compute Gasteiger



2.4.6.6 La molécula ahora contará con “cargas parciales”, lo que ayudará a un mejor rendimiento al momento de realizar el docking molecular, y aparecerá el siguiente mensaje dando un valor a esas cargas, dar clic en “Aceptar”:



2.4.6.7 Para guardar la molécula con las especificaciones antes descritas, dar clic en Ligand>Output>Save as PDBQT...

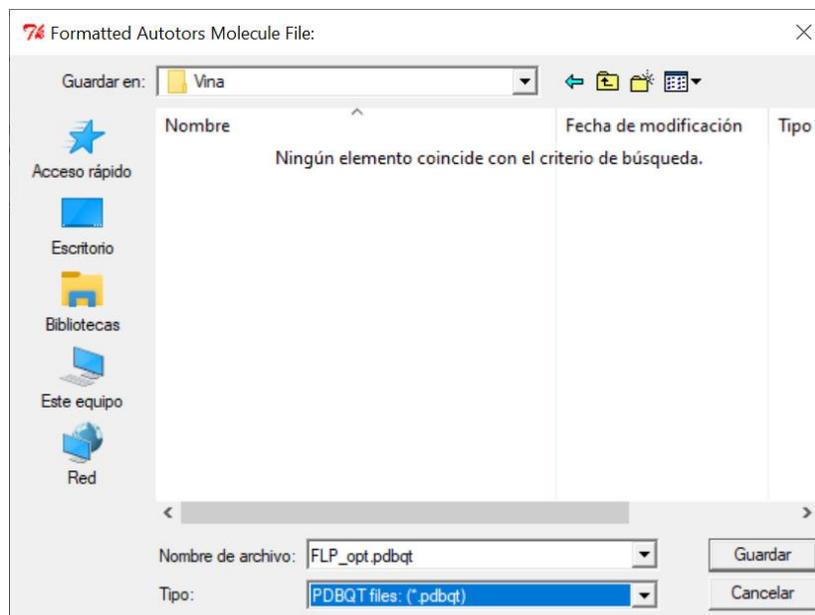


Guardar la nueva molécula en la carpeta *Vina* del punto 2.4.1.2, asignando el nombre:

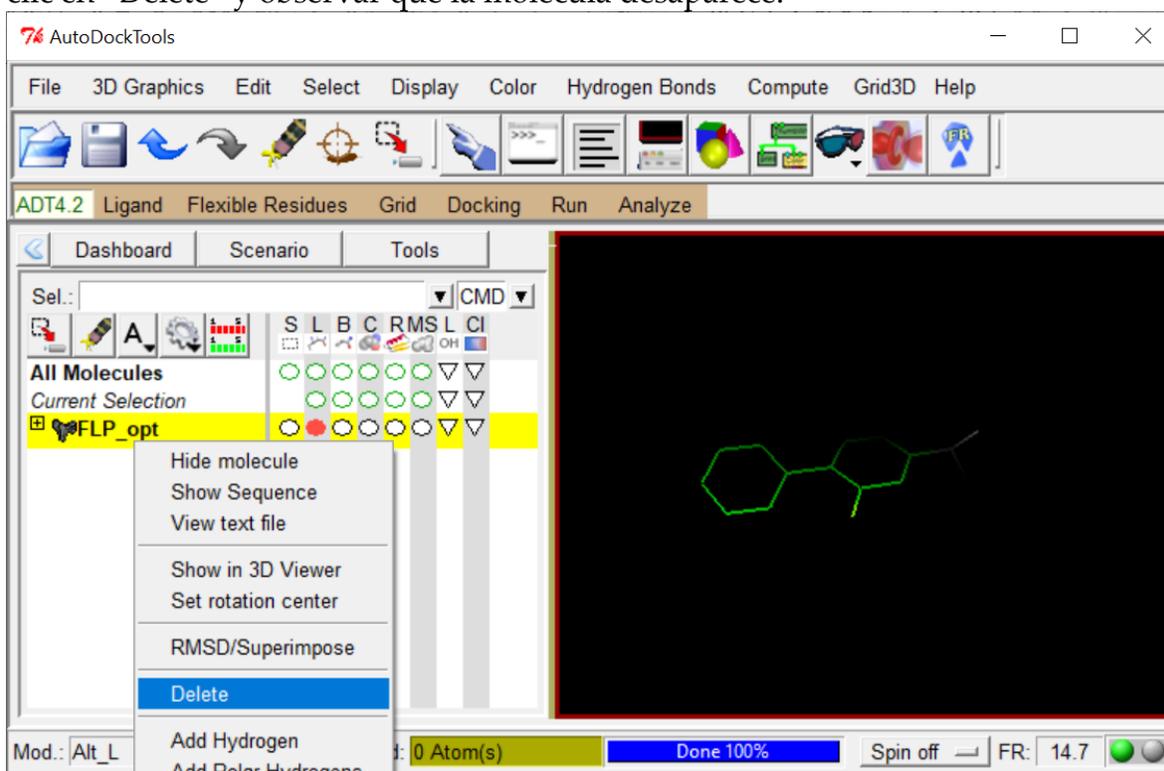
FLP\_opt.pdbqt

Asegurar poner al final la extensión “.pdbqt”, probablemente el archivo no contenga esta extensión; en consecuencia, el archivo no funcionará más adelante, dar clic en “Guardar”.

**Nota:** Observar que el archivo se guardó en la carpeta *Vina* y no en *Docking* y su extensión ahora es .pdbqt en lugar de .pdb, como en anteriores ocasiones.

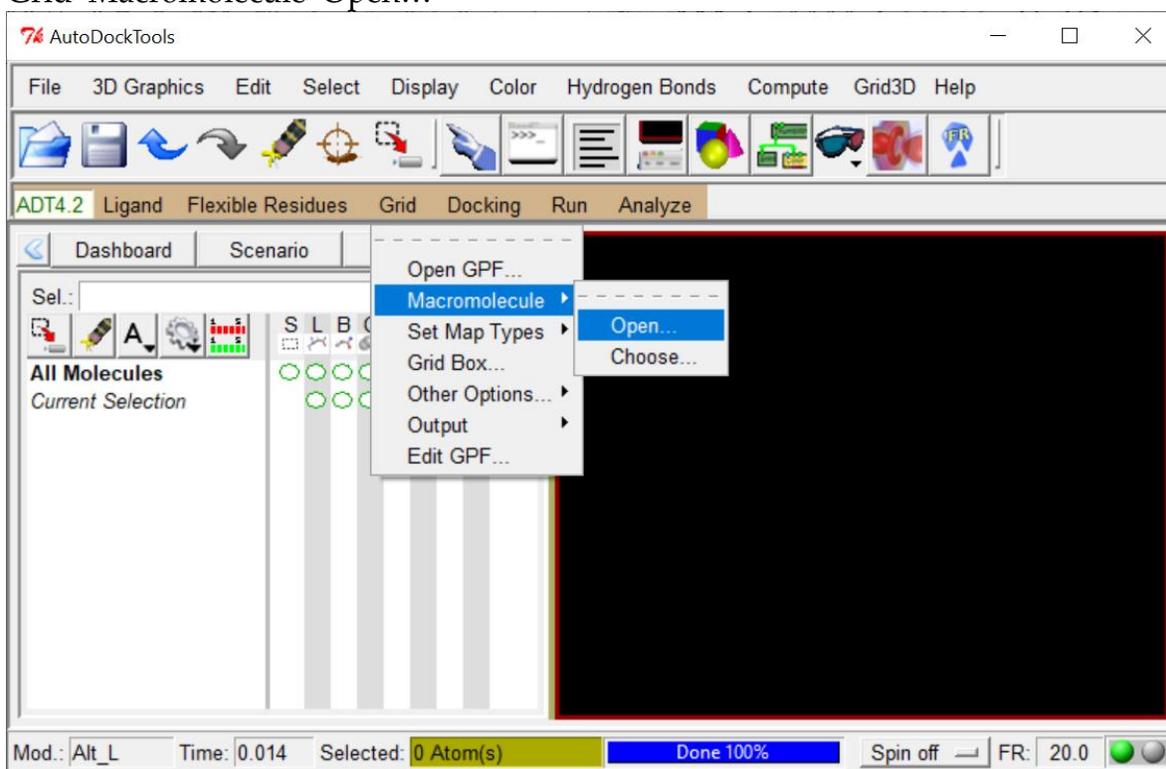


2.4.6.8 Terminado el proceso de optimización de la molécula, dar clic izquierdo sobre la molécula “FLP\_opt” en el panel izquierdo del programa, lo que hará que resalte en amarillo, dar clic derecho sobre la misma para desplegar diversas opciones, dar clic en “Delete” y observar que la molécula desaparece:



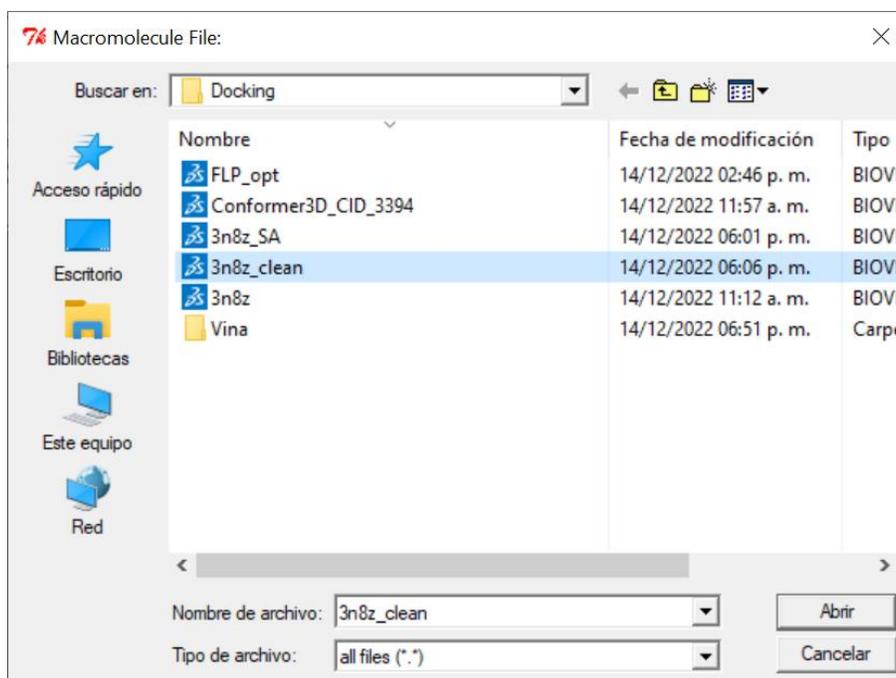
## 2.4.7 Optimización de la proteína en AutoDock Tools

2.4.7.1 Asegurar haber eliminado el ligando en el paso 2.4.6.8. Dar clic en Grid>Macromolecule>Open...

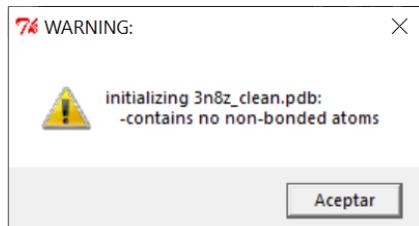


2.4.7.2 Aparecerá una ventana para buscar el archivo. Del lado izquierdo de la ventana se puede navegar entre diversos paneles, dar clic en “Escritorio” y luego en la carpeta “Docking”.

Abrir el archivo *3n8z\_clean.pdb* (el que no contiene ligando FLP) guardado en el punto 2.4.5.11. Seleccionar en “Tipo de archivo” “all files (\*.\*)” ya que por default el programa estará buscando archivos con terminación (.pdbqt), dar clic en “Abrir”:



2.4.7.3 La proteína se abrirá y tendrá un color rosa. Aparecerá una ventana con detalles acerca de la molécula (aunque mencione “WARNING” no significa algún tipo de problema, el programa tiene por default ese título para esa pantalla de aviso), dar clic en “Aceptar”:

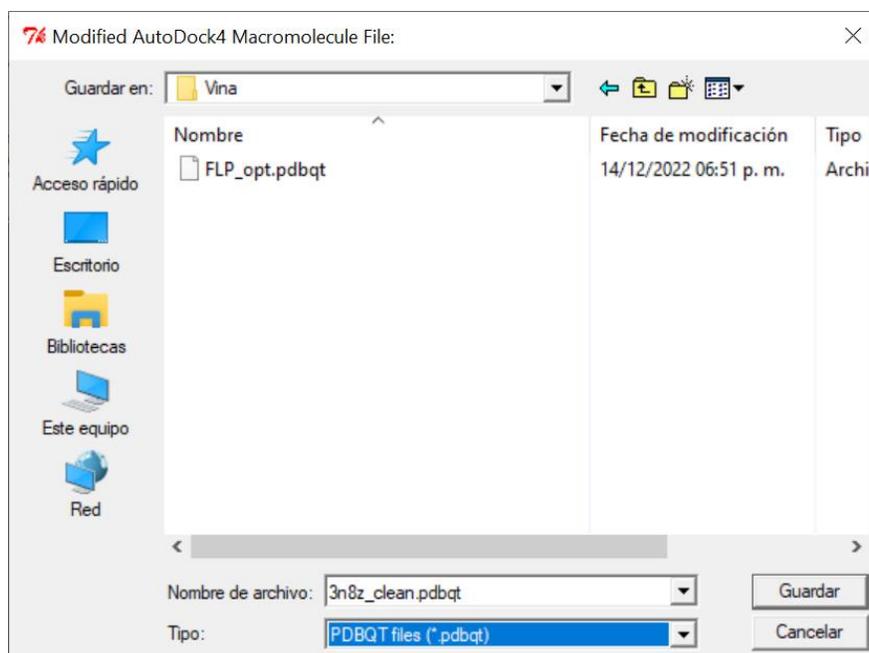


2.4.7.4 Se abrirá nuevamente una ventana solicitando guardar la proteína. Ir a la ubicación de la carpeta de *Vina*, realizada en el punto 2.4.1.2, y guardar el archivo con el nombre:

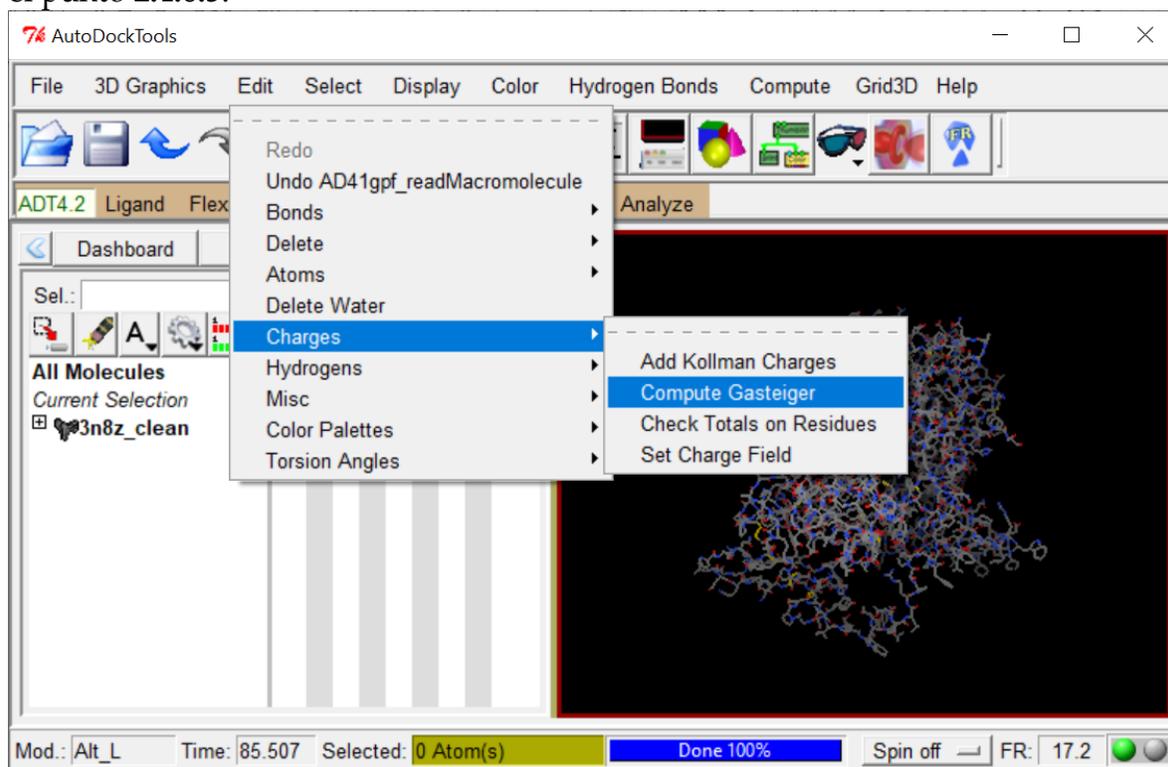
3n8z\_clean.pdbqt

Asegurar poner al final la extensión “.pdbqt” ya que puede que el archivo no tenga dicha extensión y, por lo tanto, no funcione más adelante, dar clic en “Guardar”:

**Nota:** Observar que el archivo se guardó en la carpeta *Vina* y no en *Docking* y su extensión ahora es .pdbqt en lugar de .pdb, como en anteriores ocasiones.



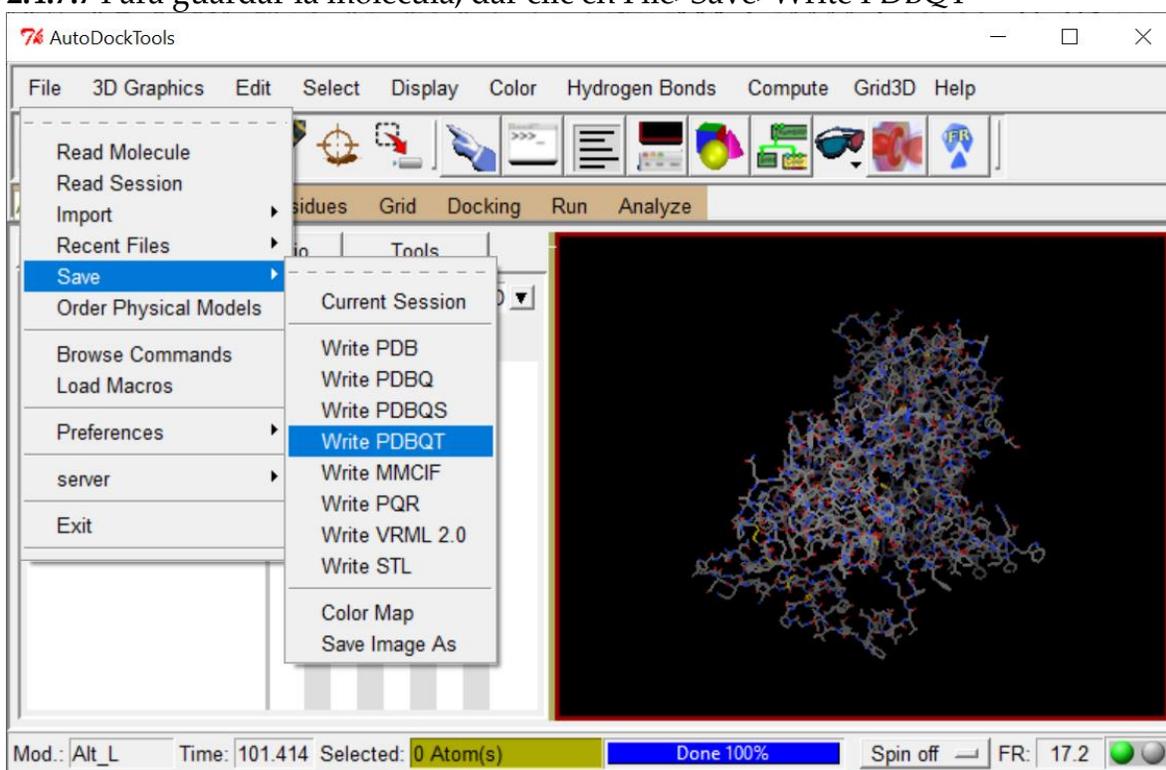
2.4.7.5 La proteína tomará una coloración gris. Dar clic en Edit>Charges>Compute Gasteiger, para agregar “cargas parciales” al igual que se realizó con el ligando en el punto 2.4.6.5.



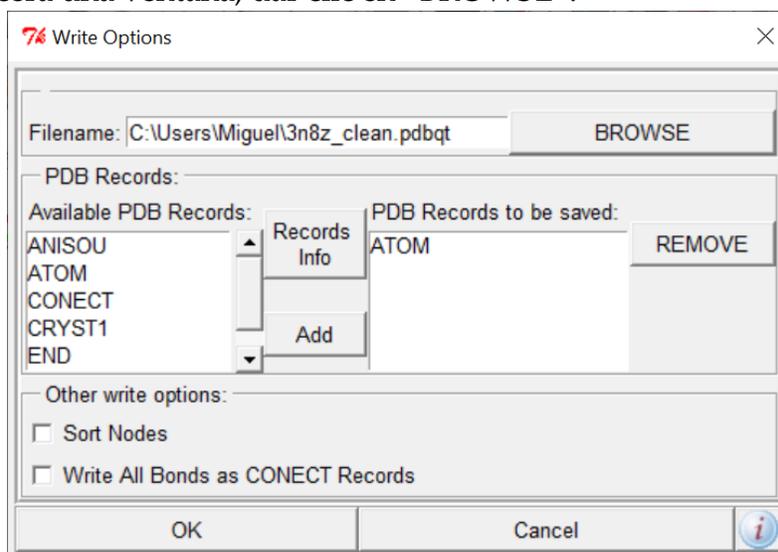
2.4.7.6 La proteína ahora contará con “cargas parciales”, lo que ayudará a un mejor rendimiento al realizar el docking molecular, y aparecerá el siguiente mensaje dando un valor a esas cargas, dar clic en “Aceptar”:



2.4.7.7 Para guardar la molécula, dar clic en File>Save>Write PDBQT



2.4.7.8 Aparecerá una ventana, dar clic en “BROWSE”:

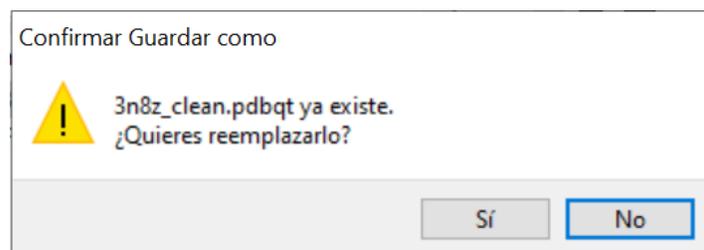


2.4.7.9 Guardar la proteína en la carpeta *Vina*, reescribir el archivo creado en el paso 2.4.7.4 dejando como nombre:

3n8z\_clean.pdbqt

Asegurar poner al final la extensión “.pdbqt” ya que puede que el archivo no tenga esta extensión y, por lo tanto, no funcione más adelante, dar clic en “Guardar”.

Saltará una advertencia acerca de reemplazar el archivo , dar clic en “Sí”:



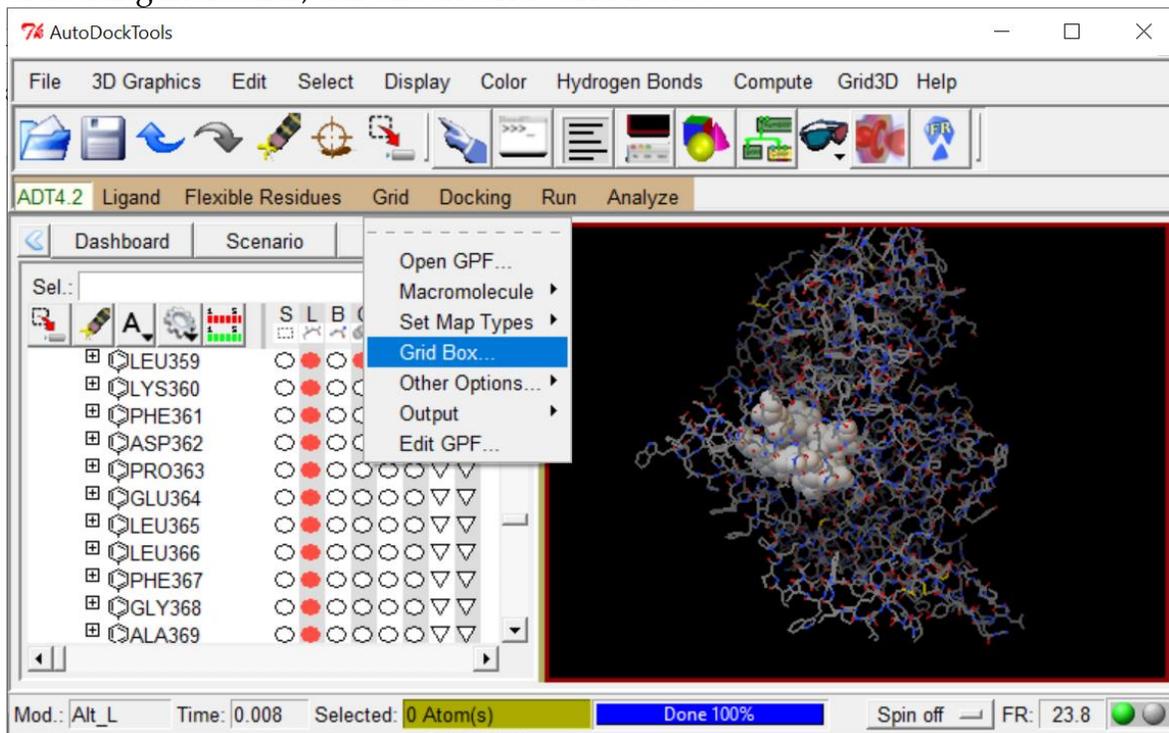
La ventana del paso 2.4.7.8 volverá a surgir, dar clic en “OK”

2.4.7.10 Para este paso es necesario que se haga una investigación bibliográfica del mecanismo de acción de la molécula en cuestión y tener presentes los aminoácidos con los que interacciona, ya que se preparará visualmente la zona donde se pueda crear el Grid (la zona donde se realizará el docking molecular). Dar clic en el signo de “+” encontrado al lado izquierdo del nombre de la proteína “3n8z\_clean”. Aparecerá una “A” indicando la cadena de la proteína, si no se removió la cadena “B” en el punto 2.4.5.4, elegir únicamente la cadena “A” para trabajar ya que igualmente aparecerá el apartado de la cadena B.

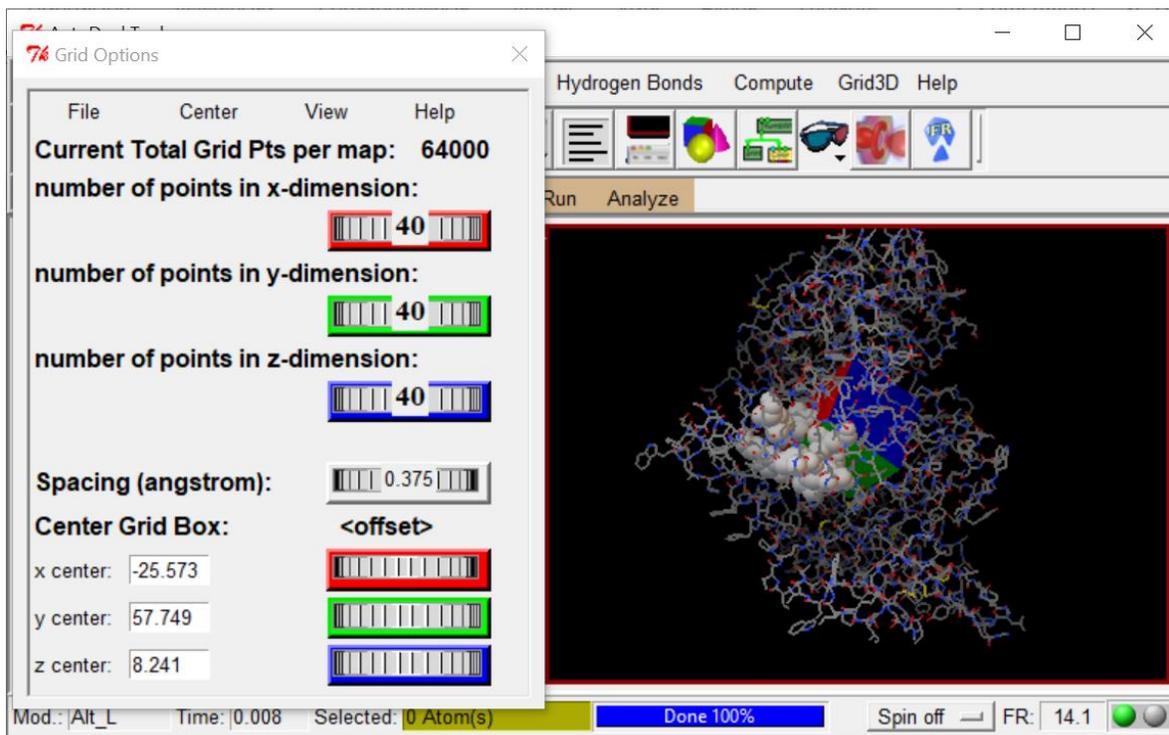




2.4.7.12 Para preparar el Grid, el cual determina la zona en la que se realizará el docking molecular, dar clic en Grid>Grid Box...



Aparecerá una ventana de opciones y un cubo de color rojo, verde y azul indicando los ejes X, Y, Z respectivamente del espacio en la proteína:



**2.4.7.13** Para centrar el Grid en la zona resaltada con esferas del punto **2.4.7.11**, mover las “perillas” debajo del texto “<offset>” o poner el valor deseado en los textos x center, y center, z center (cuadro rojo).

Para modificar las dimensiones del Grid, mover las “perillas” del cuadro azul o dar clic derecho a las mismas lo que abrirá otra ventana (flecha azul), mover el intervalo de “Value” al valor deseado seguido de “OK”.

El valor de “Spacing (angstrom)” por defecto viene en 0.375 por lo que será el valor utilizado.

Para este ejemplo, se cubrirá toda la zona con el Grid conforme los siguientes valores:

x-dimension: 52

y-dimension: 46

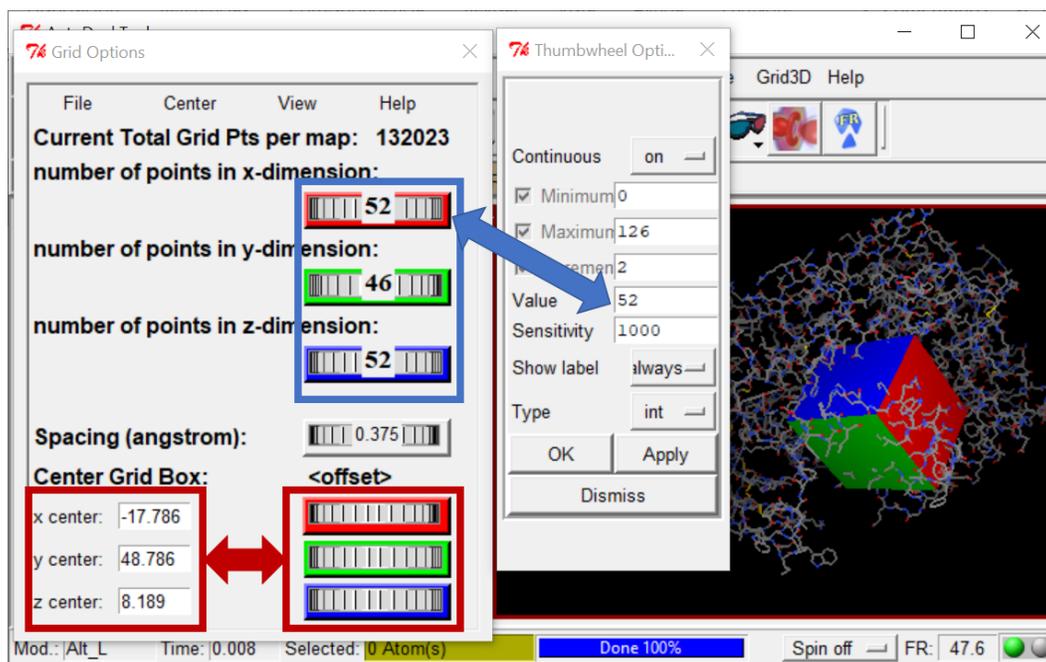
z-dimension: 52

Spacing (angstrom): 0.375

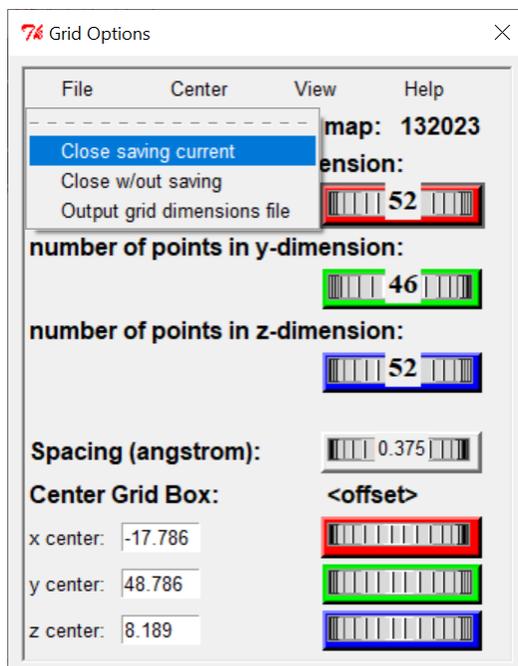
x center: -17.786

y center: 48.786

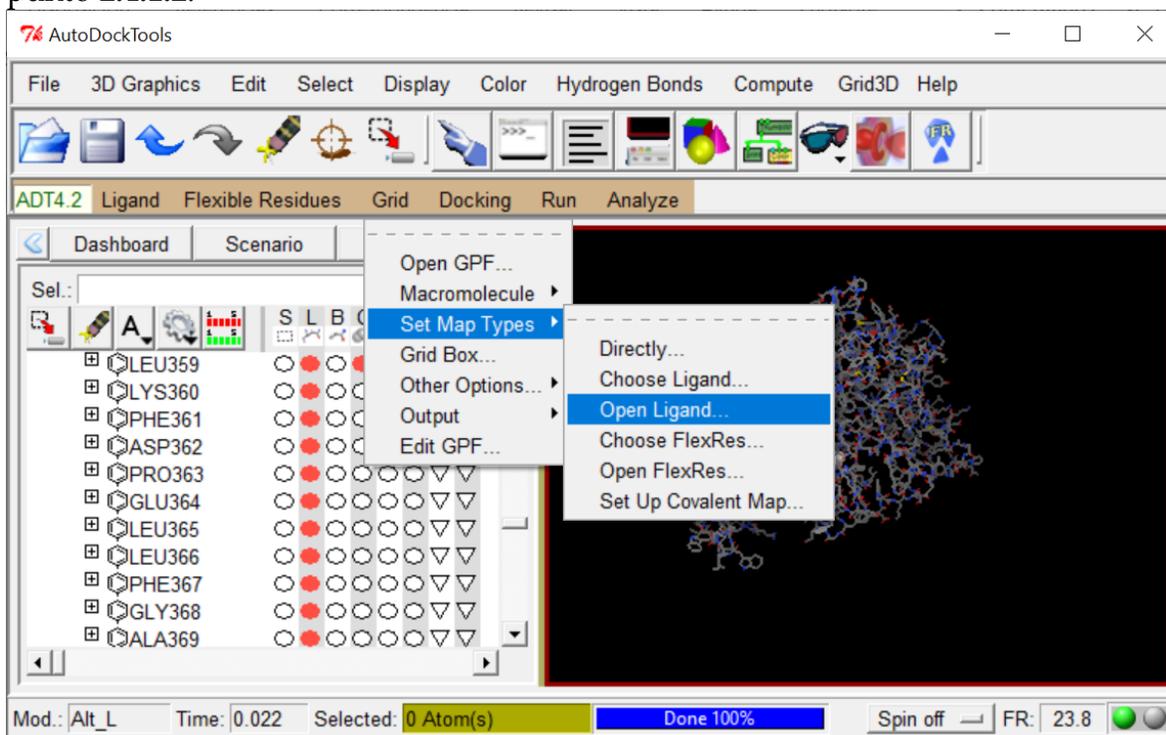
z center: 8.189



**2.4.7.14** Terminado el proceso para centrar el Grid, dar clic en File>Close saving current, el Grid desaparecerá y la ventana se cerrará. La configuración de las dimensiones y espacio configurado se habrán guardado con las especificaciones dadas.

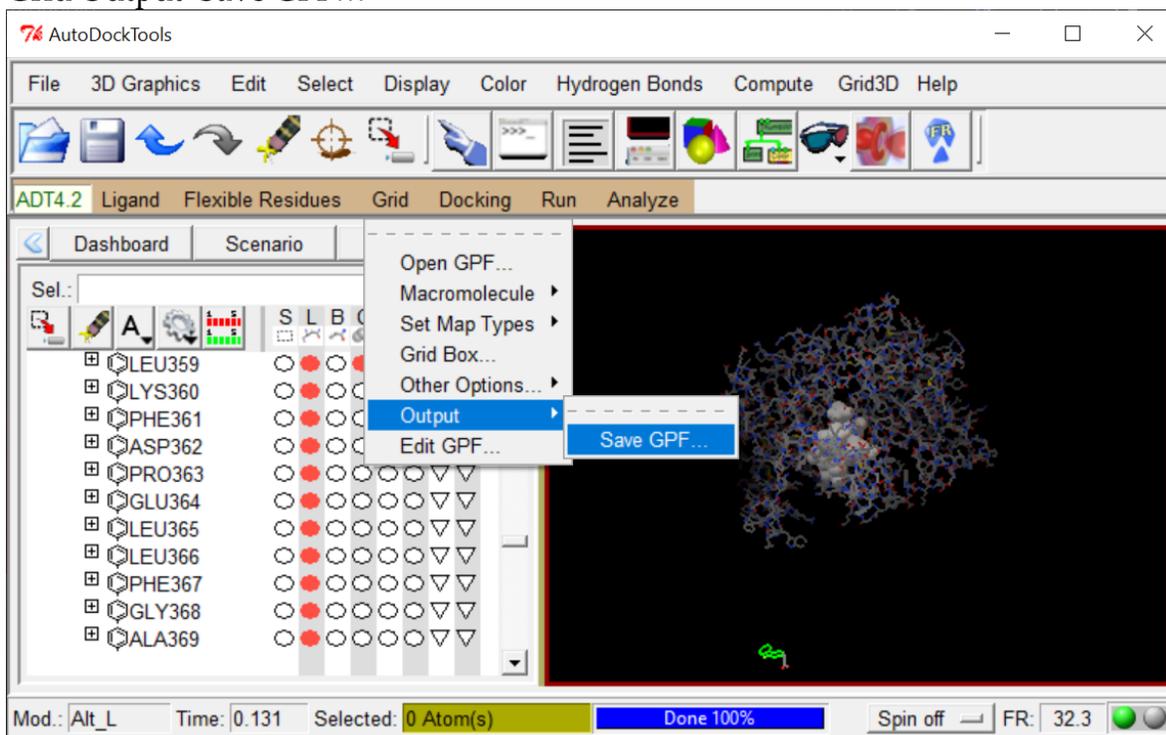


**2.4.7.15** Para generar un mapa dentro del Grid, lo cual sirve para identificar los átomos del ligando (Flurbiprofeno) y pueda tener un mejor rendimiento a la hora de realizar el docking molecular, dar clic en Grid>Set Map Types>Open Ligand... Abrir el archivo creado en el punto 2.4.6.7 *FLP\_opt.pdbqt* ubicado en la carpeta *Vina* del punto 2.4.1.2:



Observar que el ligando aparece en un lugar alejado de la proteína.

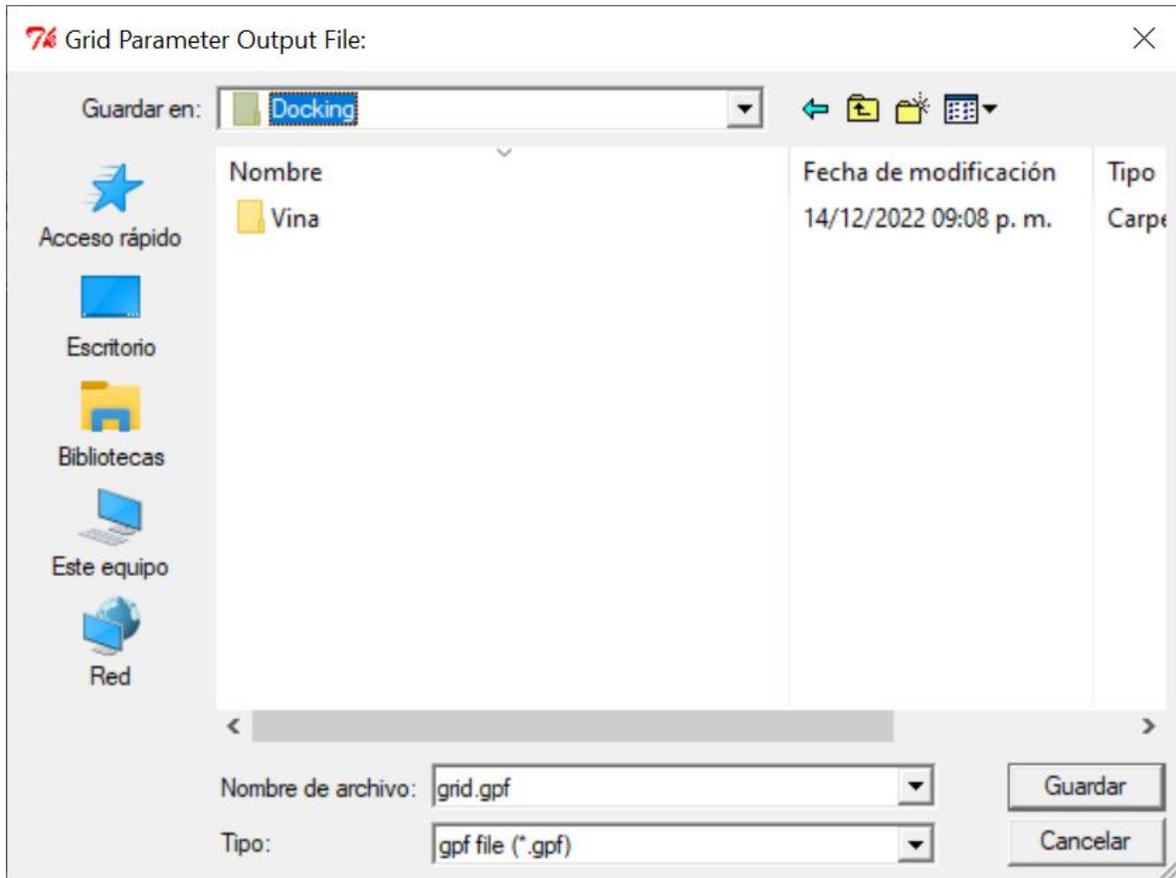
**2.4.7.16** Para terminar y guardar las configuraciones dadas al Grid, dar clic en Grid Output>Save GPF...



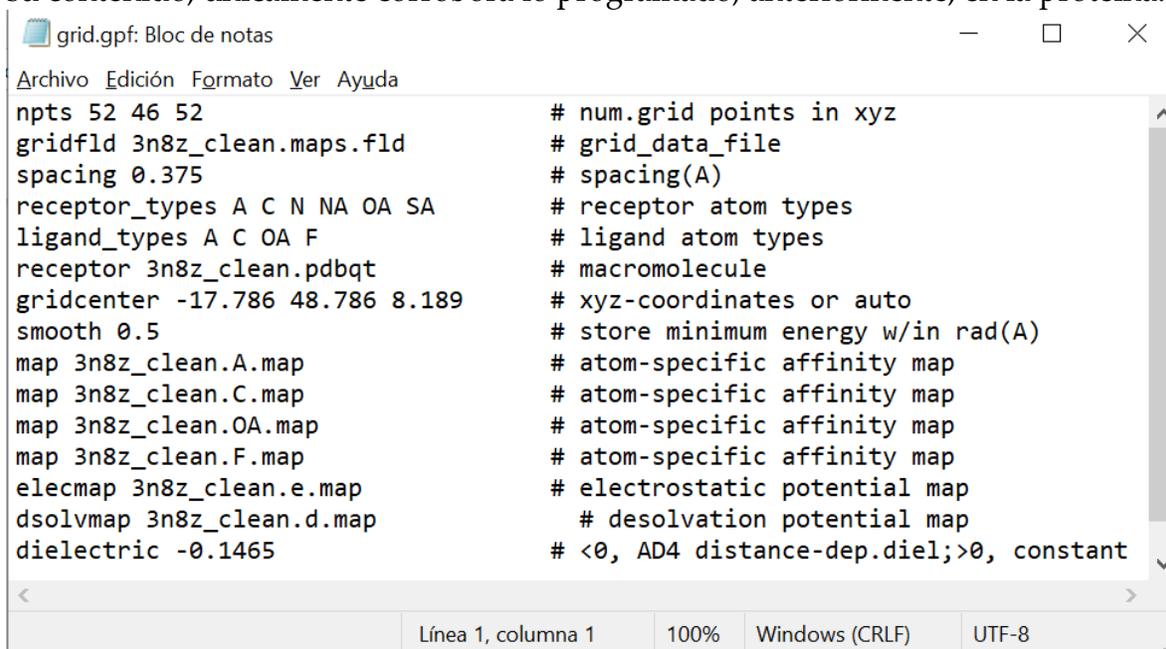
Pedirá elegir una ruta de guardado, elegir la carpeta *Docking* del punto 2.4.1.1, colocar el siguiente nombre y luego dar clic en “Guardar”:

grid.gpf

Observar que se guardó en la carpeta *Doking* y no *Vina*.



**2.4.7.17** El archivo podrá ejecutarse con la aplicación Bloc de notas o Wordpad instaladas por defecto en el equipo de cómputo. En la ventana se mostrará la configuración del Grid, anteriormente programada, entre otra información acerca del ligando seleccionado y los mapas creados. No es necesario abrir o editar nada de su contenido, únicamente corrobora lo programado, anteriormente, en la proteína.



```

grid.gpf: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
npts 52 46 52 # num.grid points in xyz
gridfld 3n8z_clean.maps.fld # grid_data_file
spacing 0.375 # spacing(A)
receptor_types A C N NA OA SA # receptor atom types
ligand_types A C OA F # ligand atom types
receptor 3n8z_clean.pdbqt # macromolecule
gridcenter -17.786 48.786 8.189 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5 # store minimum energy w/in rad(A)
map 3n8z_clean.A.map # atom-specific affinity map
map 3n8z_clean.C.map # atom-specific affinity map
map 3n8z_clean.OA.map # atom-specific affinity map
map 3n8z_clean.F.map # atom-specific affinity map
elecmap 3n8z_clean.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap 3n8z_clean.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465 # <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant

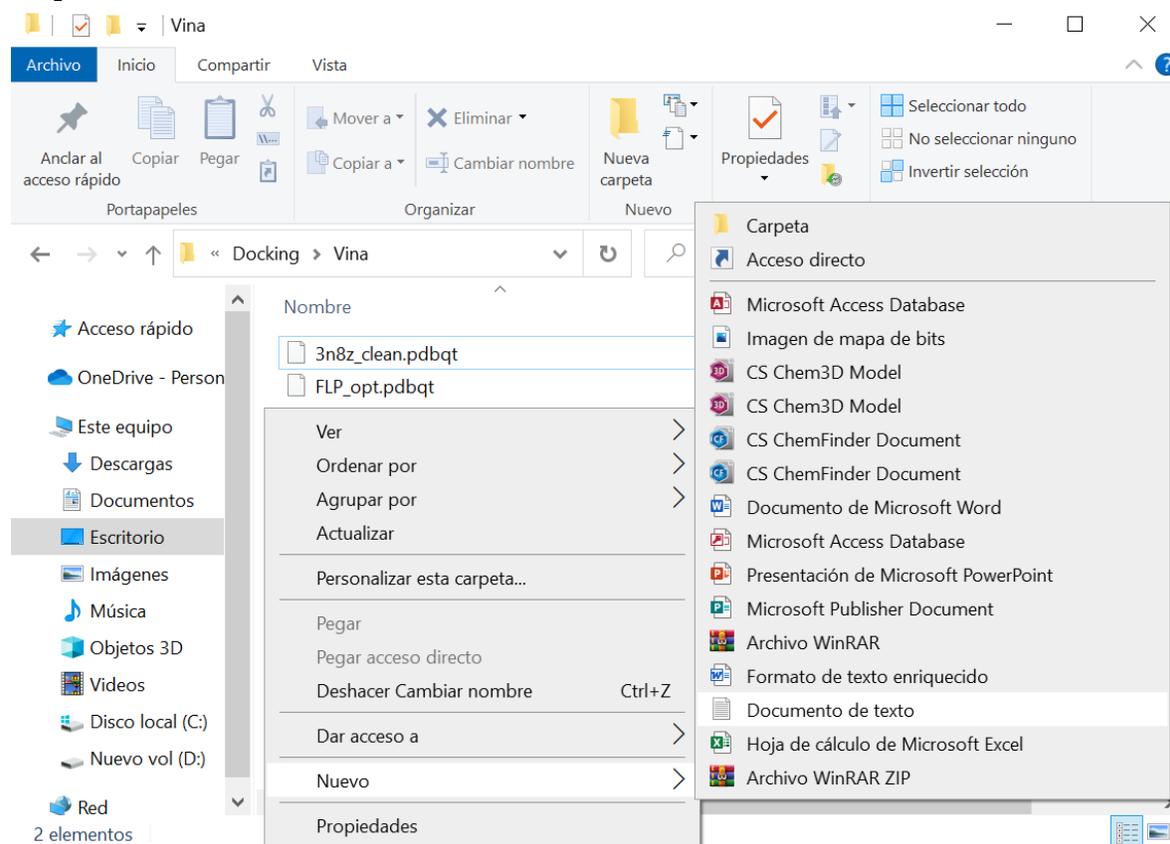
```

Línea 1, columna 1 100% Windows (CRLF) UTF-8

Cerrar el programa si el equipo de cómputo no cuenta con suficientes recursos.

## 2.4.8 Ejecutar docking molecular con AutoDock Vina

2.4.8.1 Abrir la carpeta *Vina* del punto 2.4.1.2 y dentro de la misma carpeta generar un archivo de texto, dar clic derecho en cualquier parte en blanco dentro de la carpeta>Nuevo>Documento de texto:



2.4.8.2 Cambiar el nombre del nuevo archivo creado, dar clic derecho sobre el mismo y dar clic en “Cambiar nombre” asignando el nombre:

config

2.4.8.3 Abrir el archivo creado en el punto 2.4.8.2, ya sea con el programa Bloc de notas o WordPad instalados por defecto en el equipo de cómputo, escribir las siguientes líneas de comando:

receptor = 3n8z\_clean.pdbqt

ligand = FLP\_opt.pdbqt

center\_x = -17.786

center\_y = 48.786

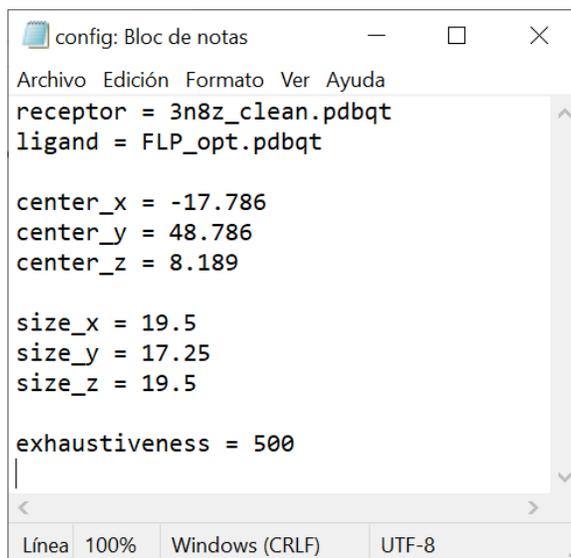
center\_z = 8.189

size\_x = 19.5

size\_y = 17.25

size\_z = 19.5

exhaustiveness = 500



```
config: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
receptor = 3n8z_clean.pdbqt
ligand = FLP_opt.pdbqt

center_x = -17.786
center_y = 48.786
center_z = 8.189

size_x = 19.5
size_y = 17.25
size_z = 19.5

exhaustiveness = 500
```

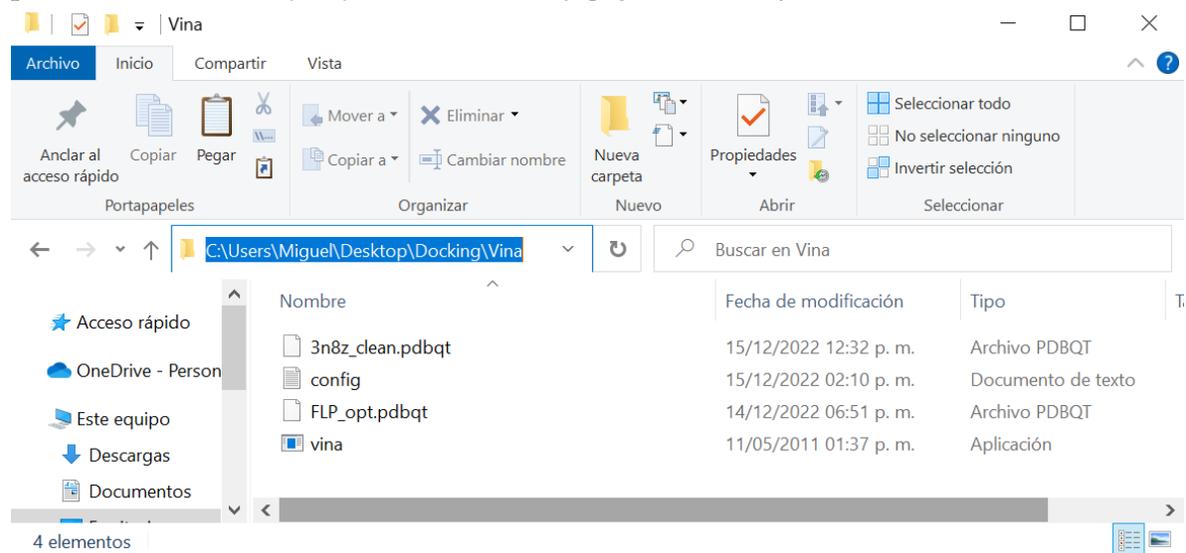
Importante tener en cuenta lo siguiente:

- Utilizar mayúsculas y minúsculas como se muestran en el ejemplo, si las moléculas poseen otro nombre al propuesto durante el ejemplo, escribir los nombres exactamente igual a como están guardadas.
- Asegurar poner “espacios” antes y después de los signos de = (igual).  
Dar espacios en blanco, por ejemplo, al momento de escribir el comando: ligand = FLP\_opt.pdbqt[en este momento, oprimir en el teclado “Enter” para que se haga un espacio para abajo, y nuevamente, oprimir en el teclado “Enter” para crear un espacio en blanco] ahora escribir la siguiente línea la cual será center\_x = -17.786...
- El nombre puesto en “receptor” será el nombre del archivo asignado a la proteína realizada en el punto 2.4.7.9, “ligand” el nombre del archivo asignado a la molécula realizada en el punto 2.4.6.7, los valores de “center” serán las coordenadas y “size” las dimensiones dadas al Grid en el punto 2.4.7.13, observar que los valores de “size”

no corresponden a 52 46 52, ya que estos valores se multiplican por el valor de “spacing” (0.375) y el resultado es el colocado en “size” (si no se recuerdan estos valores, pueden ser corroborados con el archivo *grid.gfp* creado en el punto 2.4.7.16, abrir este archivo con Bloc de notas o WordPad). Por último “exhaustiveness” es un valor que pide AutoDock Vina y será de 500.

**2.4.8.4** Corroborado lo anterior, dar clic en Archivo>Guardar. Cerrar esta ventana ya que no será necesaria de nuevo, a menos que se requiera editar algún comando.

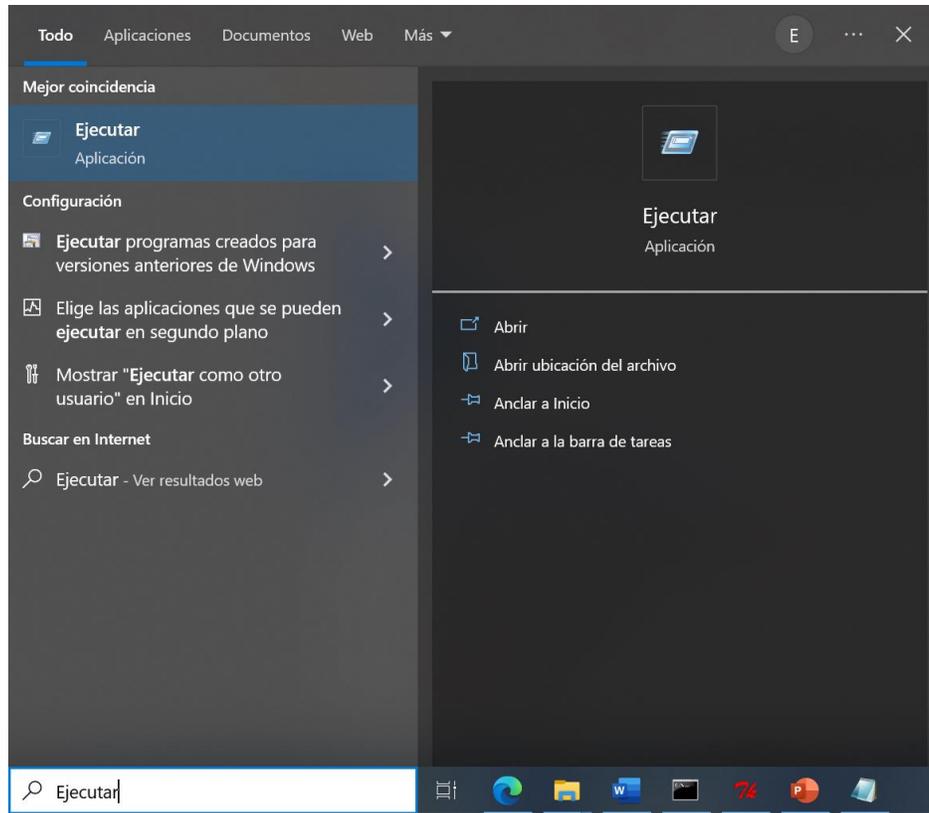
**2.4.8.5** Abrir la carpeta de la ruta del punto 2.3.2.4, la cual contiene los archivos instalados del programa vina, recordar que en ésta carpeta se encuentran tres archivos (*vina.exe* o *vina*, *vina\_license* y *vina\_split.exe* o *vina\_split*), copiar únicamente el archivo por nombre *vina* (o *vina.exe*, si el equipo de cómputo permite ver extensiones en el nombre), pegar en la carpeta *Vina* del punto 2.4.1.2 quedando cuatro archivos en la carpeta *Vina*, los cuales incluyen: el ligando *FLP\_opt.pdbqt*, la proteína *3n8z\_clean.pdbqt*, el archivo *config*, y ahora el ejecutable *vina*:



**2.4.8.6** En la barra de tareas, esquina inferior izquierda, observar una caja de búsqueda en blanco, escribir en este apartado:

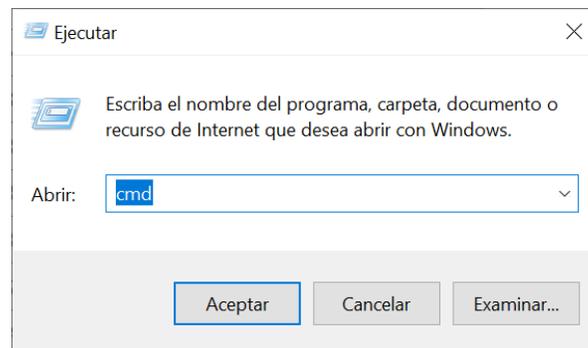
Ejecutar

Dar clic en la opción que menciona la aplicación del mismo nombre:



2.4.8.7 Se abrirá una pequeña ventana que lleva por título “Ejecutar”, escribir en la caja en blanco encontrada después de “Abrir:”:

cmd



Dar clic en “Aceptar”.

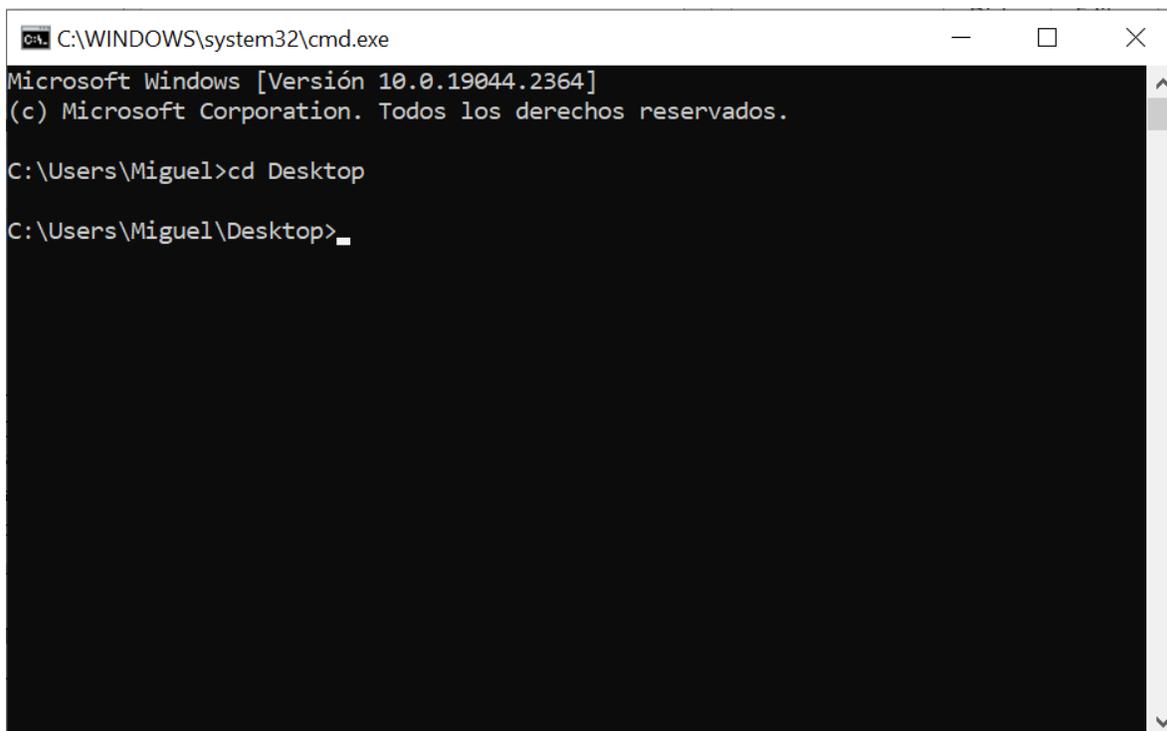
**2.4.8.8** A partir de este punto, se abrirá una ventana perteneciente al símbolo del sistema por lo que es importante seguir los pasos como se indican, tener localizados los archivos y sus ubicaciones dentro de las rutas específicas, si se tienen problemas siguiendo los pasos, cerrar la ventana y volverlo a intentar o buscar asesoría.

**2.4.8.9** Una ventana en negro se ejecutará esperando que se introduzcan líneas de comando para continuar. Por defecto, se ubica en la ruta C:\Usuario\Nombre del usuario. El objetivo es llegar a la carpeta *Vina* a través de comandos, introducir:

```
cd Desktop
```

Oprimir la tecla "Enter" del teclado.

**Nota:** Observar los espacios, mayúsculas, signos de puntuación que se utilizarán ya que, si existe un error, no se podrá acceder a las rutas deseadas. Si al momento de introducir los comandos o se tienen carpetas de nombre similar y se cometió un error al momento de escribir, volver un paso atrás escribiendo el comando: cd..



```
C:\WINDOWS\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Versión 10.0.19044.2364]
(c) Microsoft Corporation. Todos los derechos reservados.

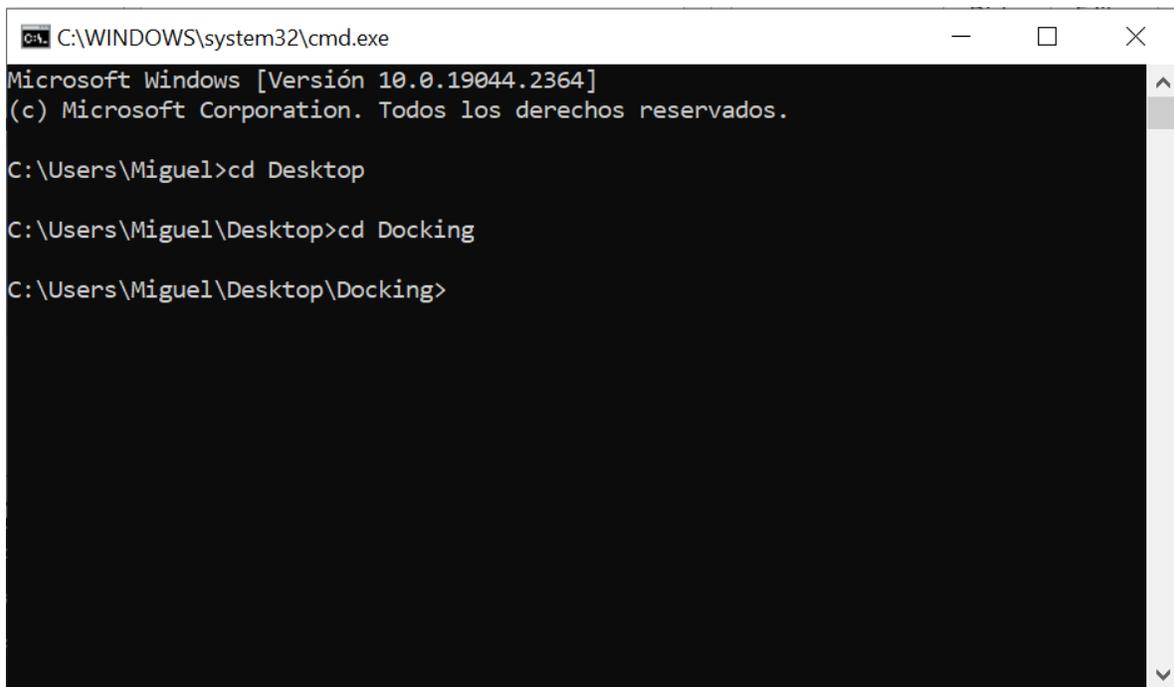
C:\Users\Miguel>cd Desktop

C:\Users\Miguel\Desktop>
```

**2.4.8.10** Observar que en la línea de comando se agregó "Desktop" a la ruta especificada. Seguir los pasos del punto **2.4.8.9**, escribir:

```
cd Docking
```

Oprimir la tecla "Enter" del teclado.



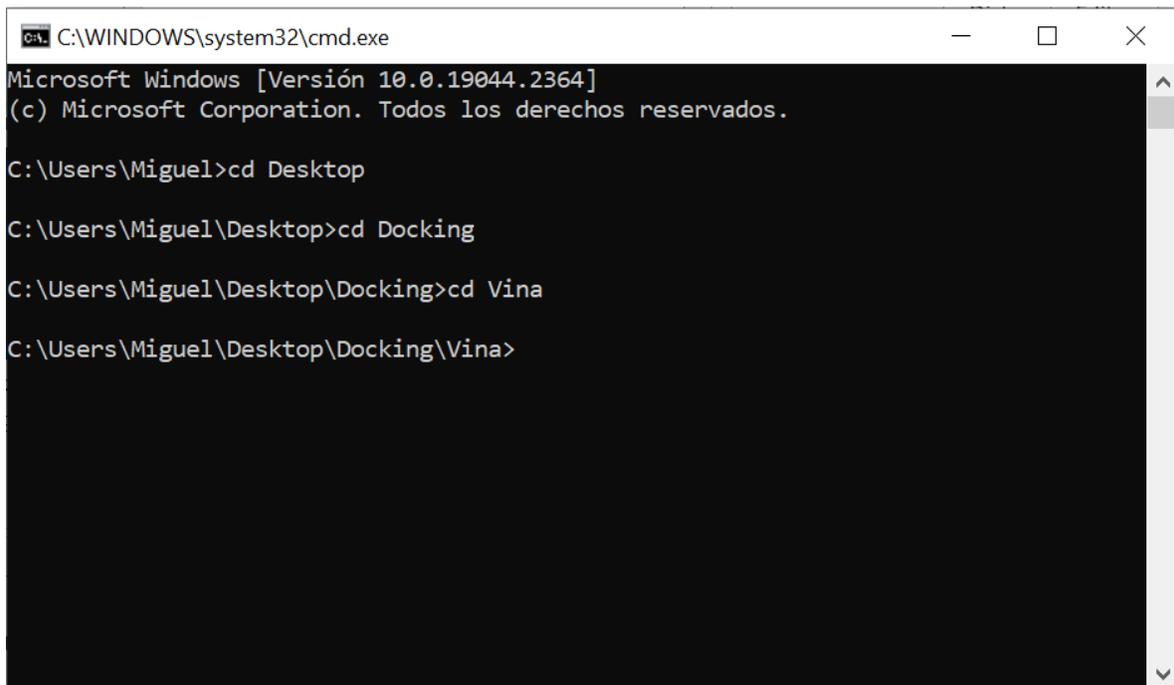
```
C:\WINDOWS\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Versión 10.0.19044.2364]
(c) Microsoft Corporation. Todos los derechos reservados.

C:\Users\Miguel>cd Desktop
C:\Users\Miguel\Desktop>cd Docking
C:\Users\Miguel\Desktop\Docking>
```

**2.4.8.11** Observar que en la línea de comando se agregó “Docking” a la ruta especificada. Seguir los pasos del punto 2.4.8.10, escribir:

cd Vina

Oprimir la tecla “Enter” del teclado.



```
C:\WINDOWS\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Versión 10.0.19044.2364]
(c) Microsoft Corporation. Todos los derechos reservados.

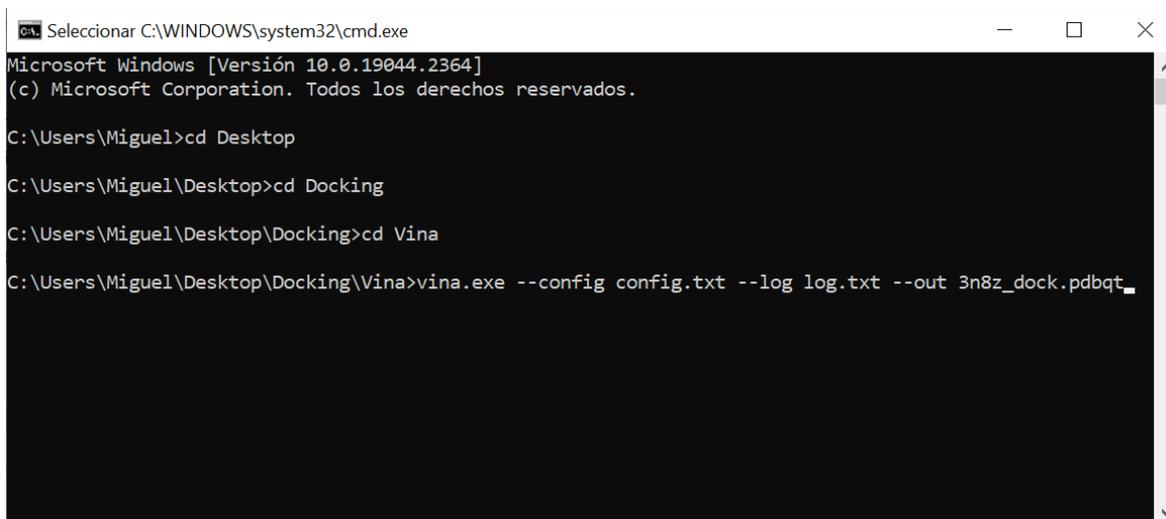
C:\Users\Miguel>cd Desktop
C:\Users\Miguel\Desktop>cd Docking
C:\Users\Miguel\Desktop\Docking>cd Vina
C:\Users\Miguel\Desktop\Docking\Vina>
```

**2.4.8.12** Observar que en la línea de comando se agregó “Vina” a la ruta especificada. Llegado a la ruta del objetivo, la carpeta *Vina*, escribir en una sola línea de comando lo siguiente:

```
vina.exe --config config.txt --log log.txt --out 3n8z_dock.pdbqt
```

Oprimir la tecla “Enter” del teclado, se ejecutará el docking molecular en AutoDock Vina:

**Nota:** Observar los espacios incluidos (vina.exe[espacio]--config...), se utilizan 2 guiones en lugar de 1 (--config, no -config) y colocar las extensiones pertinentes en sus lugares correspondientes (vina.exe, config.txt, log.txt, 3n8z\_dock.pdbqt).



```
Selecciónar C:\WINDOWS\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Versión 10.0.19044.2364]
(c) Microsoft Corporation. Todos los derechos reservados.

C:\Users\Miguel>cd Desktop
C:\Users\Miguel\Desktop>cd Docking
C:\Users\Miguel\Desktop\Docking>cd Vina
C:\Users\Miguel\Desktop\Docking\Vina>vina.exe --config config.txt --log log.txt --out 3n8z_dock.pdbqt_
```

**2.4.8.13** El proceso del docking molecular comenzará normalmente y aparecerá la siguiente pantalla indicando, entre otras cosas, el porcentaje del proceso:

```

C:\WINDOWS\system32\cmd.exe - vina.exe --config config.txt --log log.txt --out 3n8z_dock.pdbqt
Microsoft Windows [Versión 10.0.19044.2364]
(c) Microsoft Corporation. Todos los derechos reservados.

C:\Users\Miguel>cd Desktop
C:\Users\Miguel\Desktop>cd Docking
C:\Users\Miguel\Desktop\Docking>cd Vina
C:\Users\Miguel\Desktop\Docking\Vina>vina.exe --config config.txt --log log.txt --out 3n8z_dock.pdbqt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:      #
#                                                           #
# O. Trott, A. J. Olson,                                    #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and    #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461                                                    #
#                                                           #
# DOI 10.1002/jcc.21334                                     #
#                                                           #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.  #
#####

Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -33126384
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|
*

```

Para este punto, el equipo de cómputo se verá ralentizado, dependiendo de los recursos de éste, si no se necesita el equipo para otras actividades, dejar correr únicamente el proceso de docking molecular y esperar que concluya.

**2.4.8.14** Concluido el proceso, la barra de porcentaje se llenará al 100% y se mostrará información acerca de las conformaciones resultantes (mode), la afinidad (affinity (kcal/mol)) y la distancia relativa a la mejor conformación (dist from best mode). Estos datos pueden ser consultados en el archivo *log.txt* que se creó en la carpeta *Vina*. Para cerrar la ventana, escribir en la línea de comando: *exit* y oprimir "Enter" en el teclado o dar clic en la X de la esquina superior derecha de la ventana.

```

C:\WINDOWS\system32\cmd.exe
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite: #
# #
# O. Trott, A. J. Olson, #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461 #
# #
# DOI 10.1002/jcc.21334 #
# #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #
#####

Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -769658880
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****
done.
Refining results ... done.

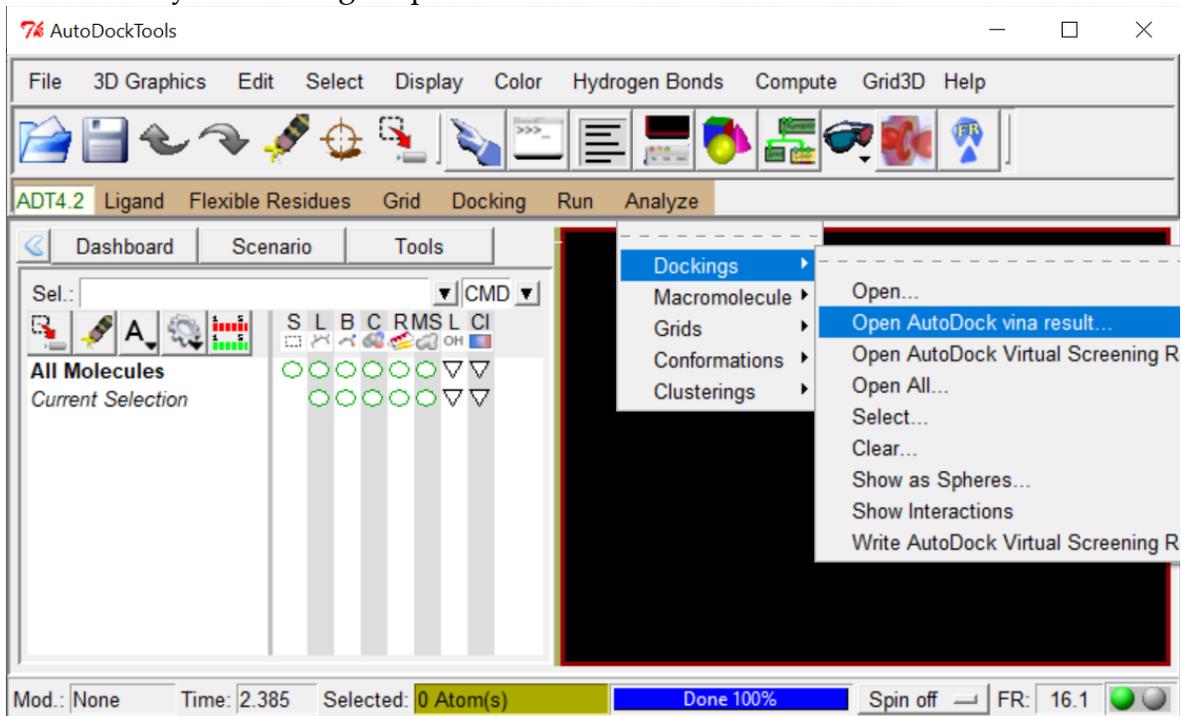
mode | affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----+
1      -8.5      0.000      0.000
2      -8.5      0.042      1.138
3      -8.2      1.206      2.008
4      -8.0      3.555      6.762
5      -8.0      3.563      6.758
6      -7.8      1.322      1.628
7      -7.8      1.330      1.990
8      -7.8      3.397      6.579
9      -7.7      3.393      6.581
Writing output ... done.

C:\Users\Miguel\Desktop\Docking\Vina>exit

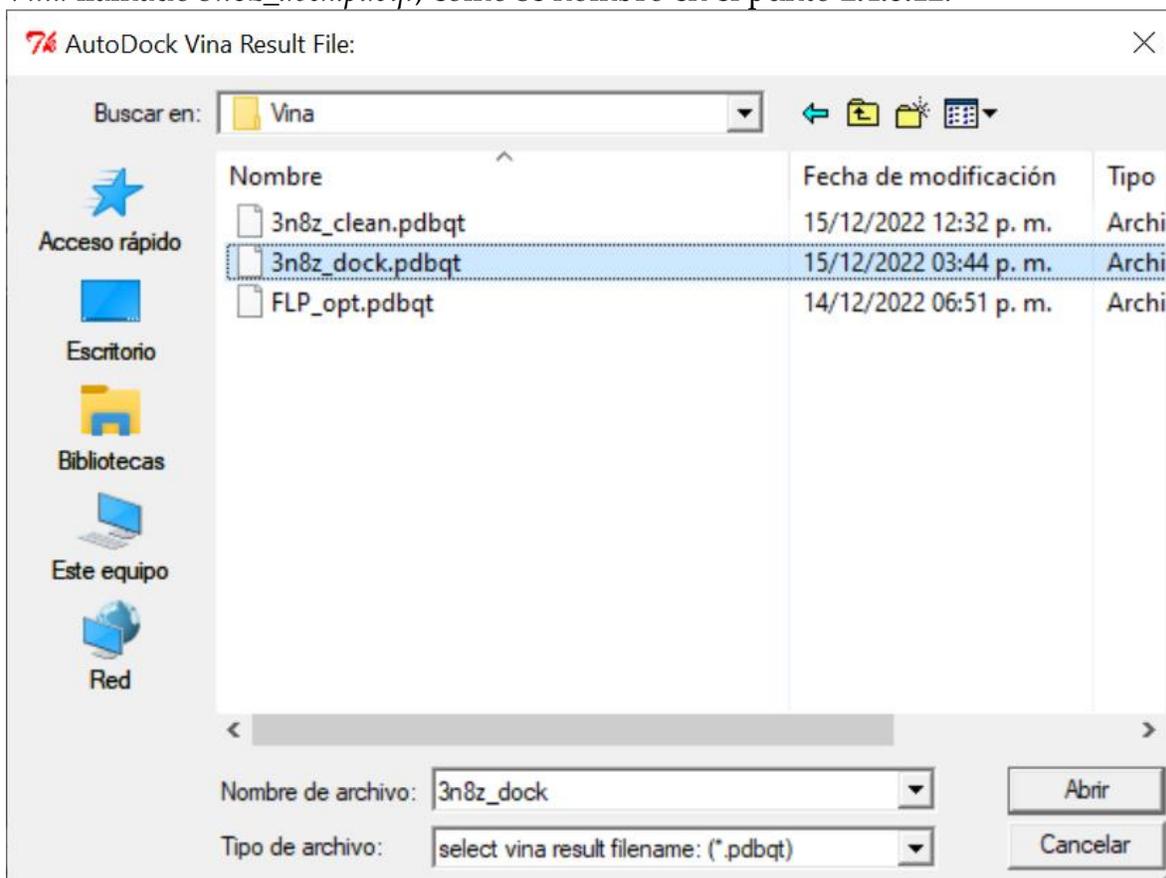
```

## 2.4.9 Analizar resultados en AutoDock Tools

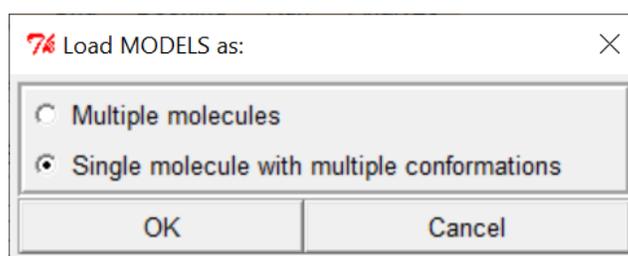
2.4.9.1 Realizado el docking molecular en AutoDock Vina, analizar los resultados del punto 2.4.8.14 en AutoDock Tools, abrir el programa como en el punto 2.4.6.1 y dar clic en Analyze>Dockings>Open AutoDock vina result...



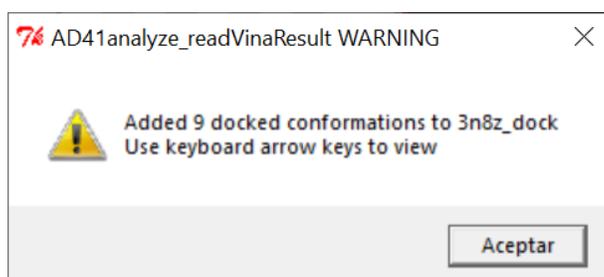
2.4.9.2 Abrir el archivo creado durante el docking molecular, debe estar en la carpeta *Vina* llamado *3n8z\_dock.pdbqt*, como se nombró en el punto 2.4.8.12:



2.4.9.3 Aparecerá una ventana preguntando cómo se desea cargar la molécula, seleccionar la opción "Single molecule with multiple conformations" y dar clic en "OK":

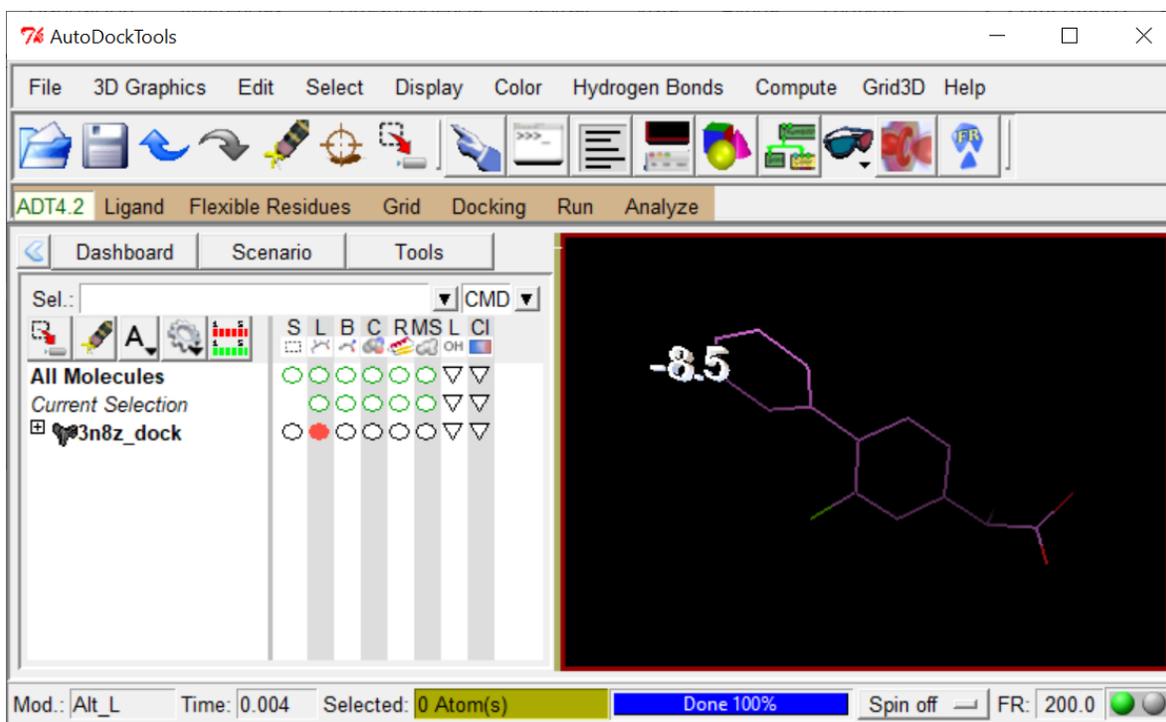


**2.4.9.4** El programa avisará cuantas conformaciones (poses) se encontraron dentro del archivo, las cuales corresponden a las conformaciones mostradas en el punto 2.4.8.14:

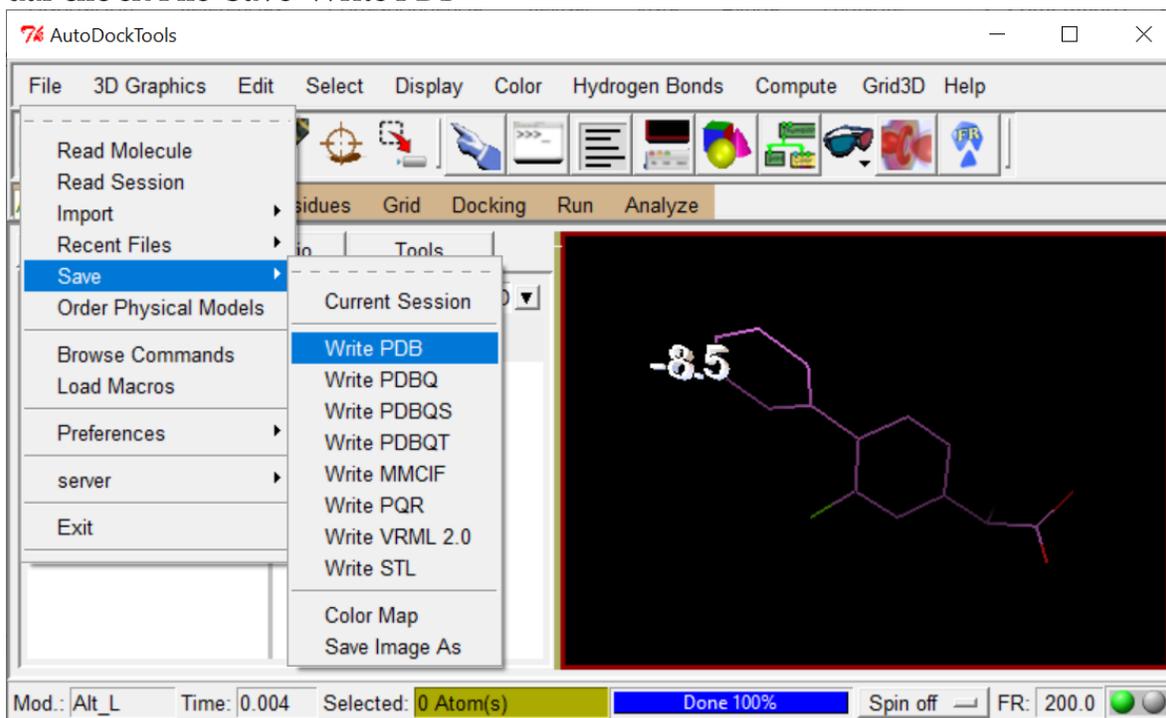


**2.4.9.5** Por defecto, se mostrará la conformación con energía más negativa, que corresponde a la primera conformación mostrada en el punto 2.4.8.14 (-8.5). Para visualizar las conformaciones restantes, oprimir las “flechas” del teclado para ir cambiando de estructura.

Si no se visualiza el número como en la imagen, rotar la molécula, dejar apretado el clic izquierdo del mouse y mover la molécula hasta su correcta visualización:



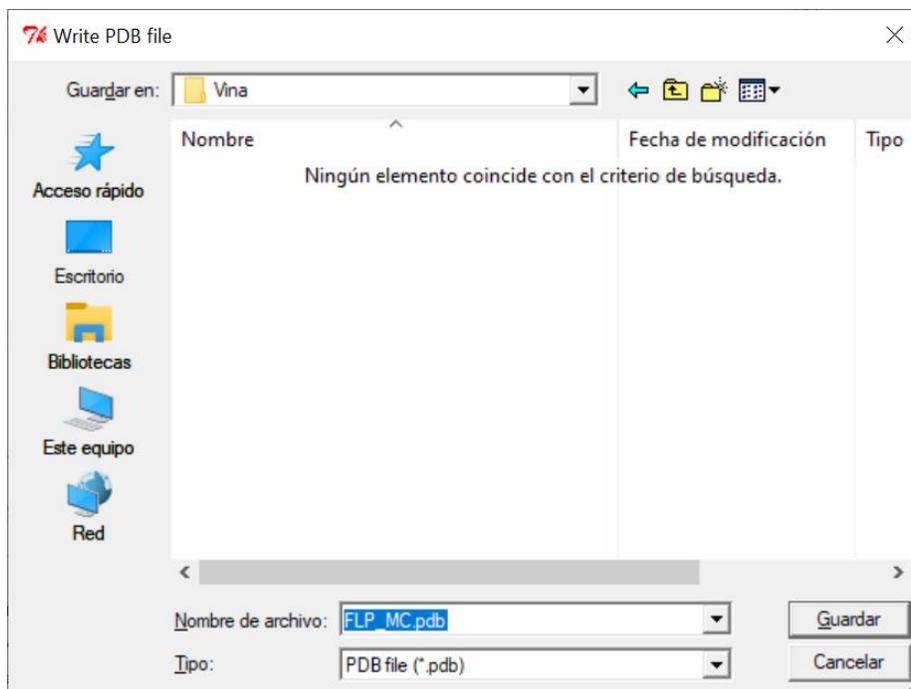
2.4.9.6 Para guardar la conformación que tuvo el valor mayormente negativo (-8.5), dar clic en File>Save>Write PDB



Aparecerá otra ventana, dar clic en “BROWSE” y buscar la carpeta *Vina* para guardar el archivo con el siguiente nombre:

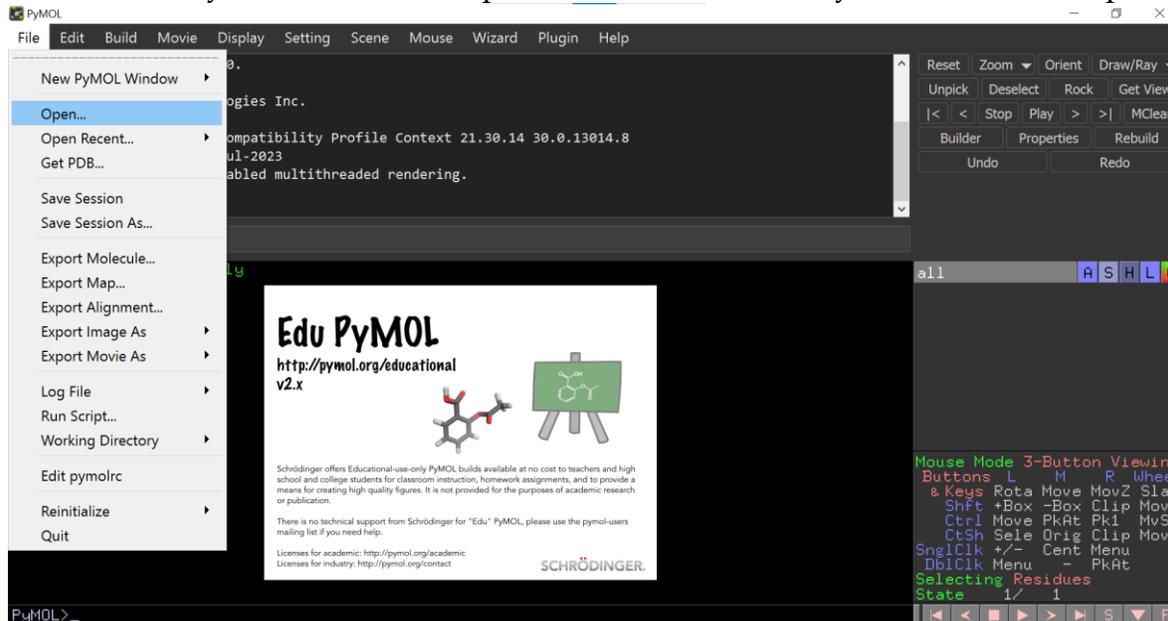
FLP\_MC.pdb

Colocar la extensión .pdb en el nombre y dar clic en “Guardar”, posteriormente el programa regresará a la ventana anterior, dar clic en “OK” para terminar.

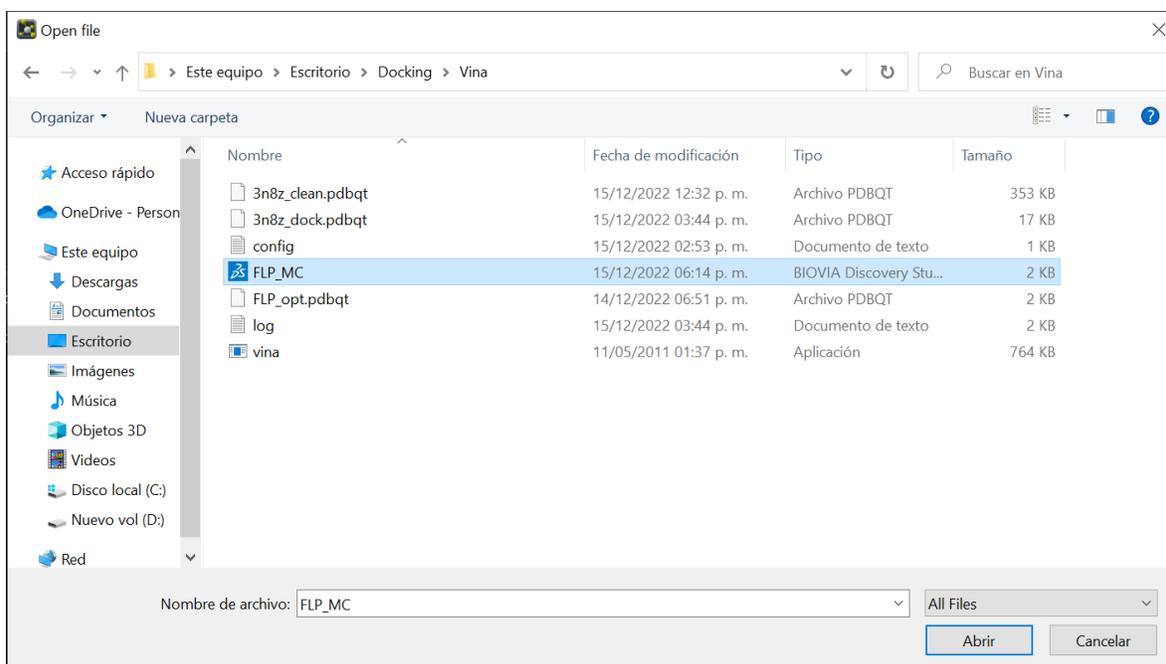


El programa regresará a la ventana del punto 2.4.9.5, si el equipo de cómputo no cuenta con recursos suficientes, cerrar AutoDock Tools.

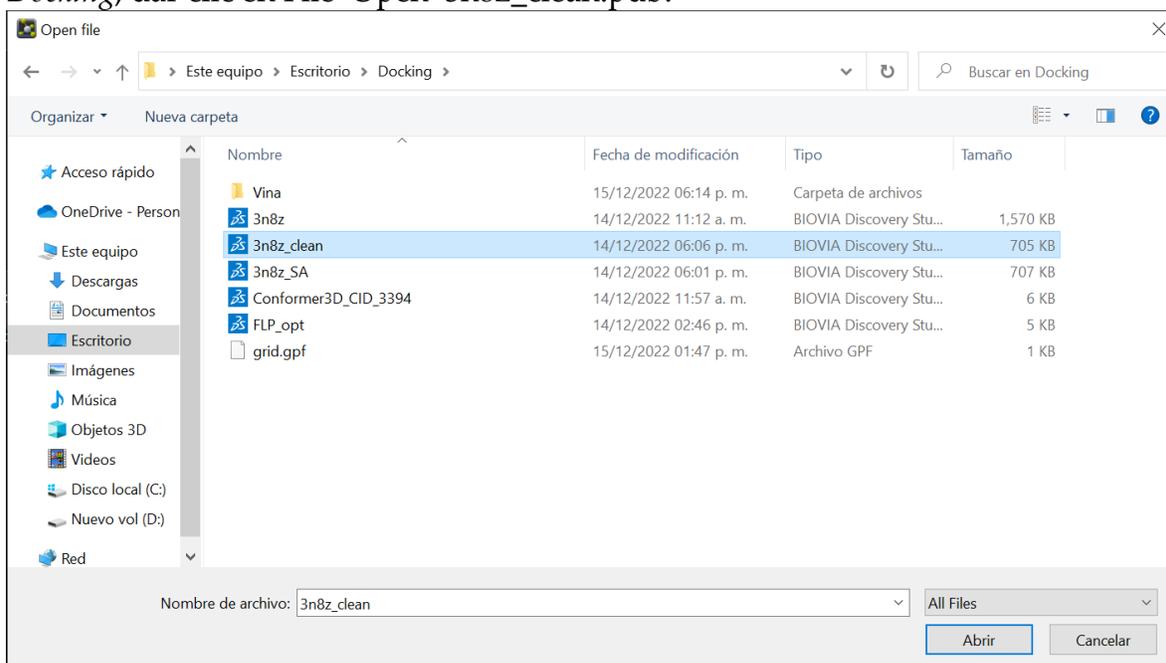
#### 2.4.9.7 Abrir PyMOL como en los puntos 2.3.5.14 a 2.3.5.15 y dar clic en File>Open



Abrir el archivo creado en el punto 2.4.9.6 con nombre *FLP\_MC.pdb* de la carpeta *Vina*, dar clic en “Abrir”:

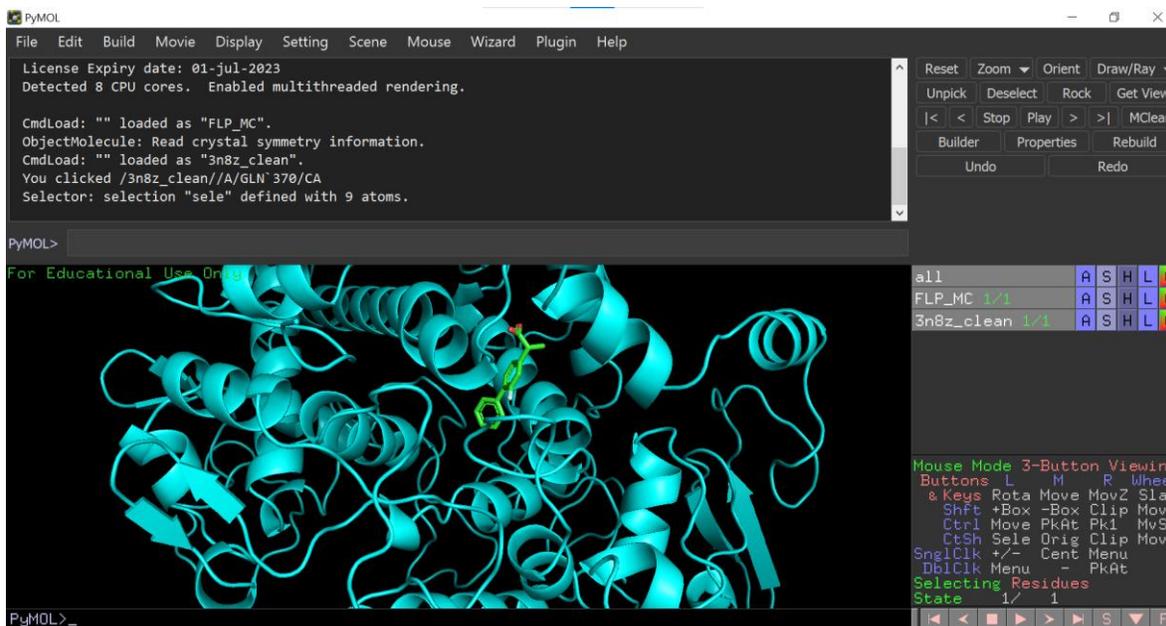


**2.4.9.8** Se proyectará el ligando guardado. Posteriormente, abrir la proteína guardada en el punto 2.4.5.11 con nombre *3n8z\_clean.pdb* encontrada en la carpeta *Docking*, dar clic en File>Open>*3n8z\_clean.pdb*:

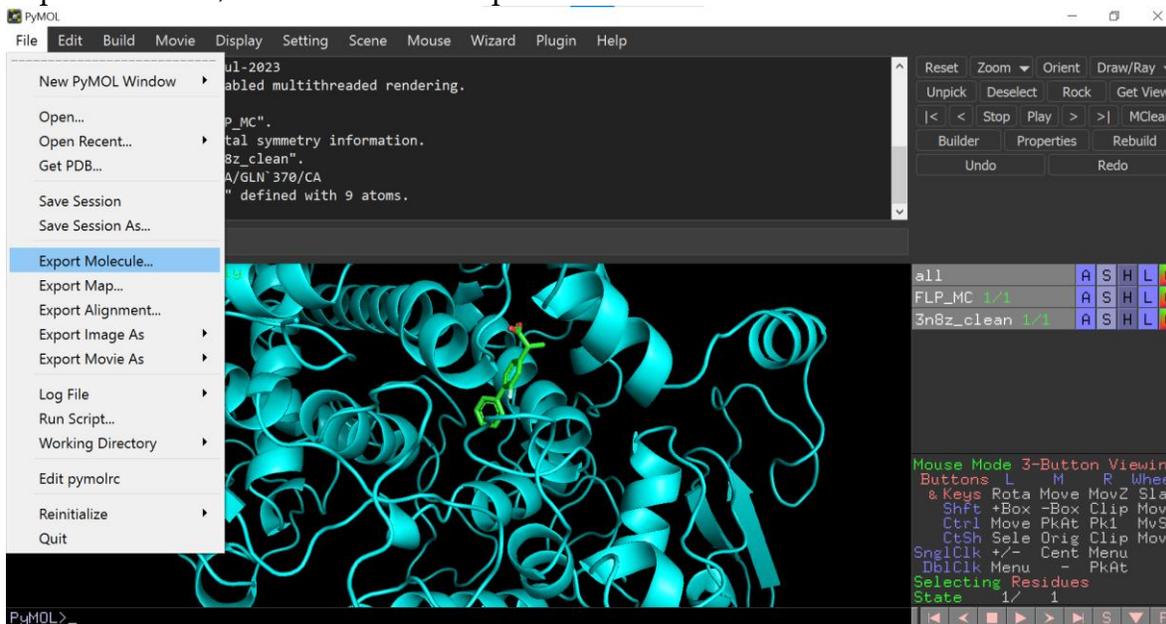


Observar que el archivo *3n8z\_clean.pdb* se encuentra en la carpeta *Docking* y no *Vina*, el que se encuentra en la carpeta *Vina* lleva por nombre *3n8z\_clean.pdbqt*, que cambia la terminación del archivo.

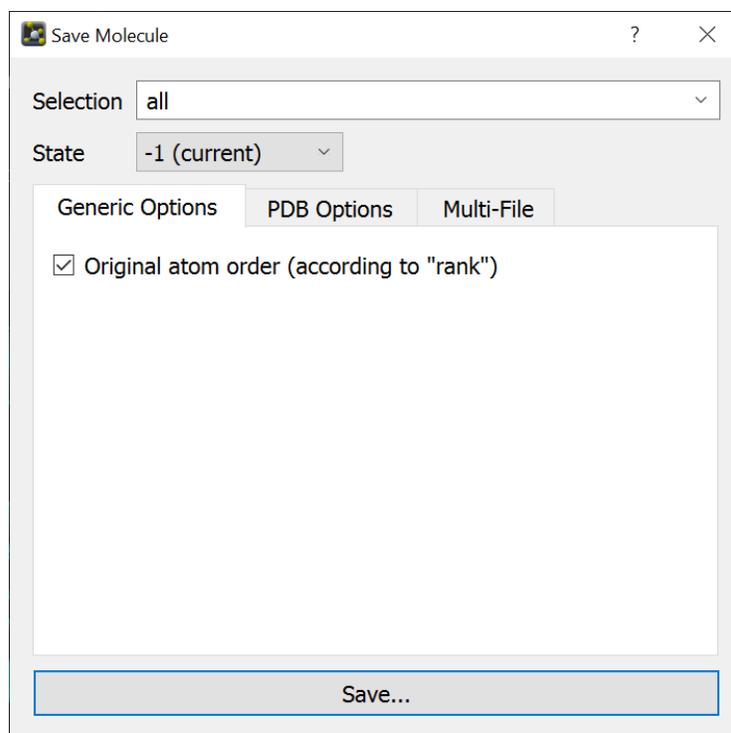
Observar que tanto el ligando como la proteína se encuentran en el mismo archivo:



2.4.9.9 Para proceder a juntar ambas moléculas y se tenga un solo archivo como en el punto 2.4.5.9, dar clic en **File>Export Molecule...**



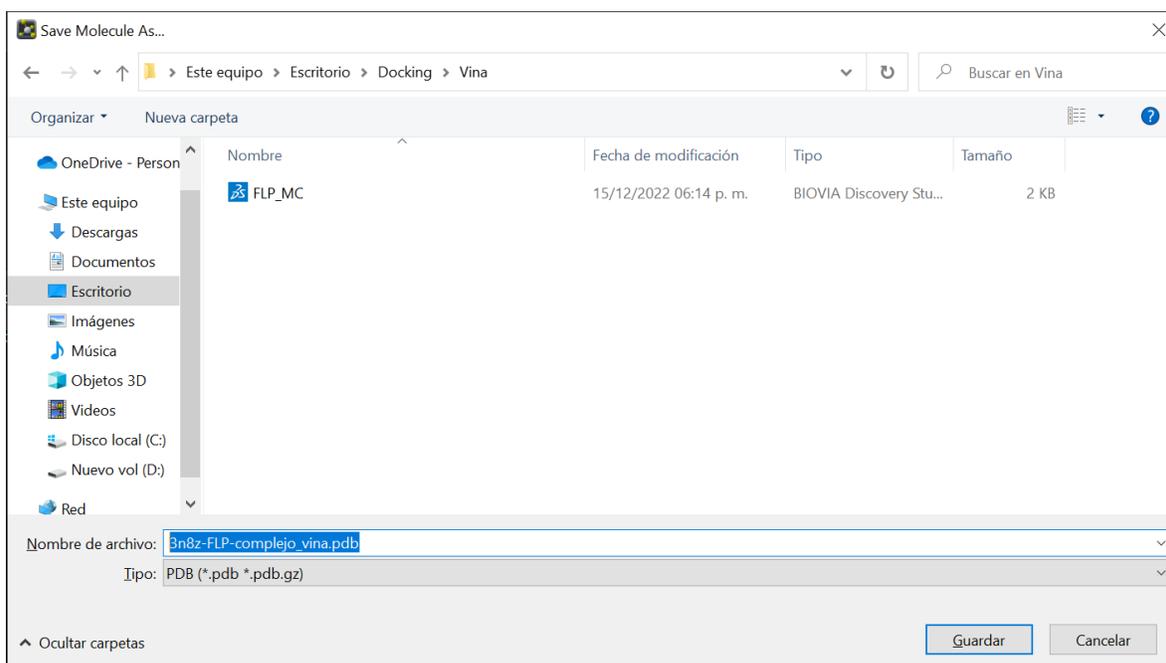
Aparecerá la siguiente ventana, en “Selection” buscar y seleccionar “all”, marcar la casilla “Original atom order (according to “rank”)” y dar clic en “Save...”:



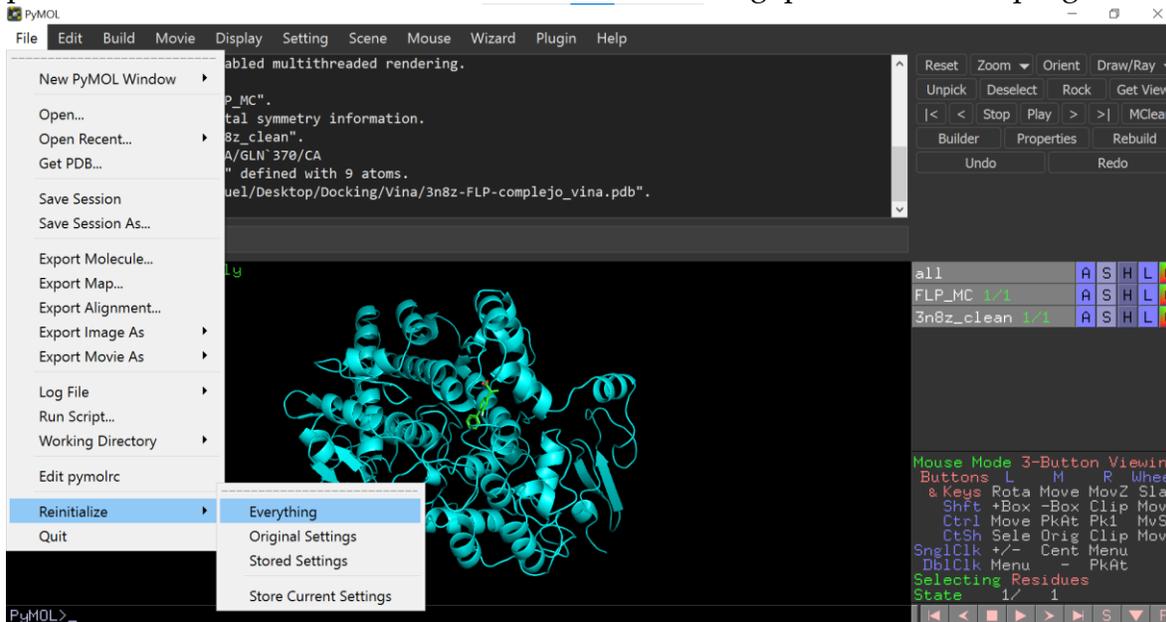
Guardar este complejo en la carpeta *Vina* con el siguiente nombre y después dar clic en “Guardar”:

3n8z-FLP-complejo\_vina.pdb

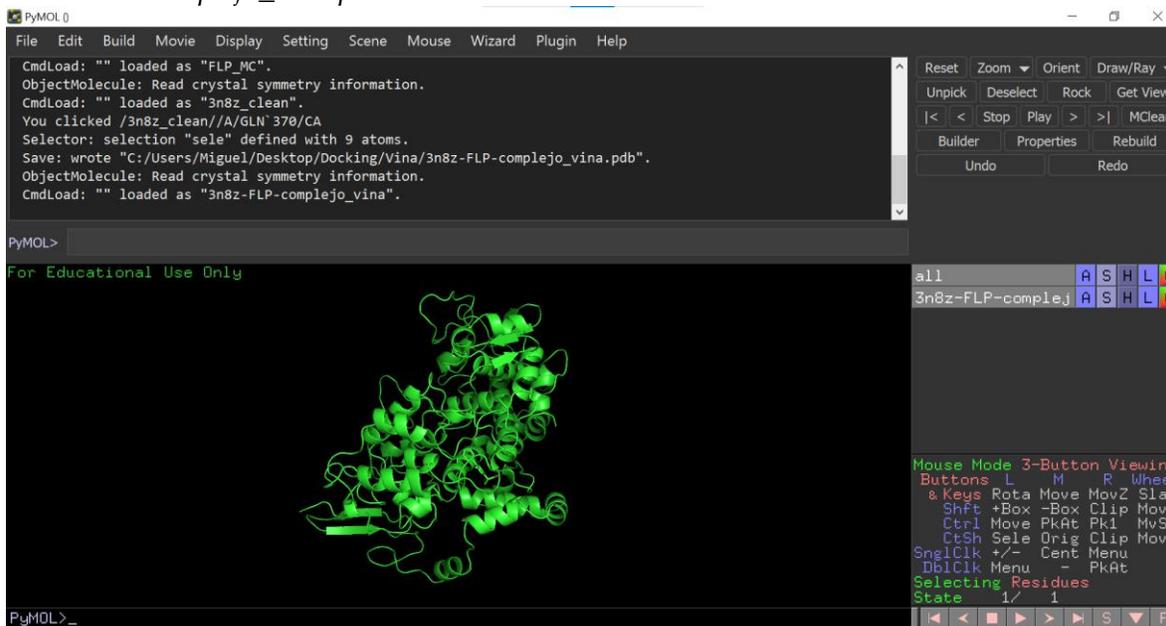
Tener activado en el apartado “Tipo” la opción “PDB” no confundir con “PDBx”.



**2.4.9.10** Guardado el complejo, comparar con el descargado y preparado del punto 2.4.5.10. Dar clic en File>Reinitialize>Everithing, para reiniciar el programa:

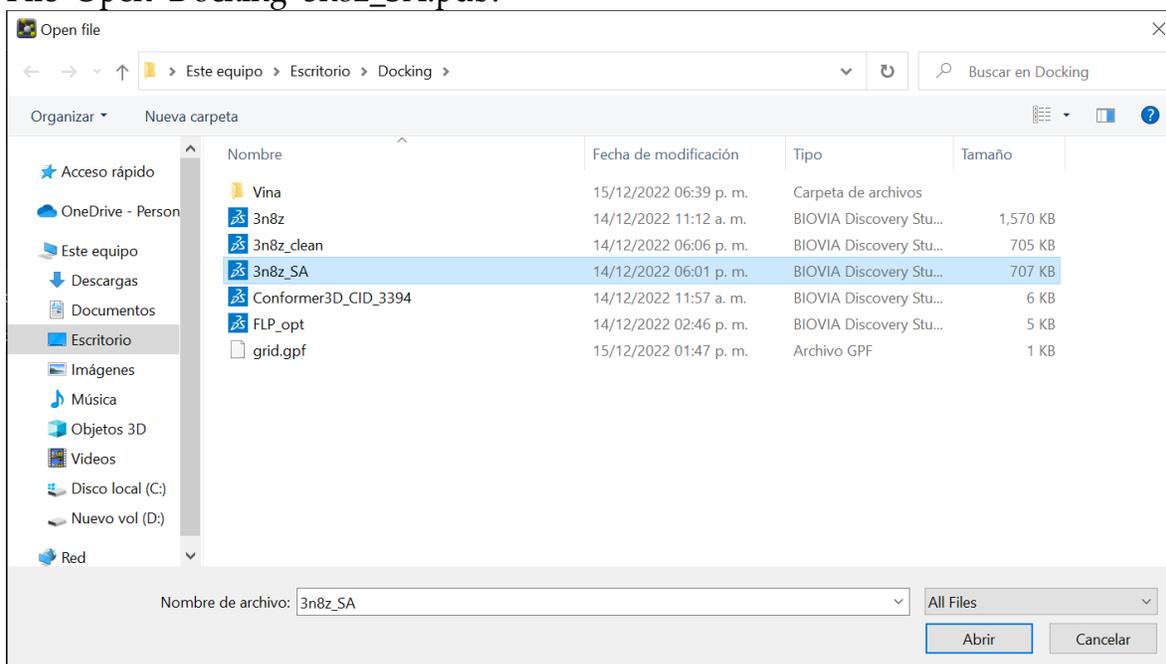


**2.4.9.11** Abrir el archivo guardado en el punto 2.4.9.9, el cual es el complejo resultado del docking molecular, encontrado en la carpeta *Vina* y lleva por nombre *3n8z-FLP-complejo\_vina.pdb*:

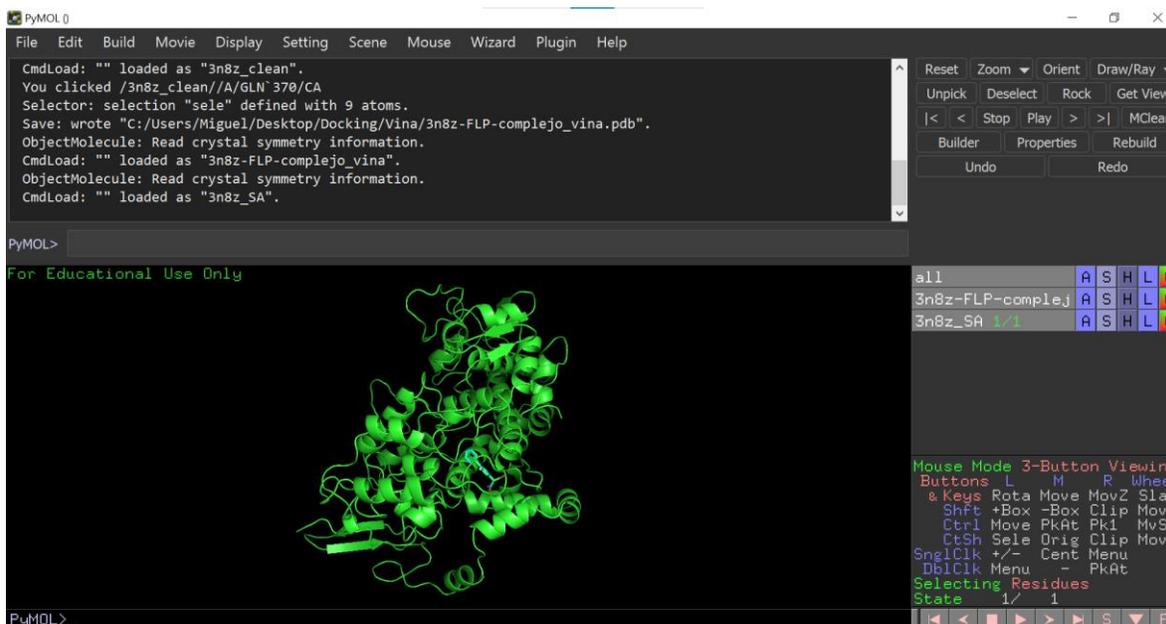


Observar en el panel de la derecha, no aparecen 2 archivos separados, solo aparecen los apartados "all" y "3n8z-FLP-complejo\_vina", y la molécula ahora se ilumina de color verde.

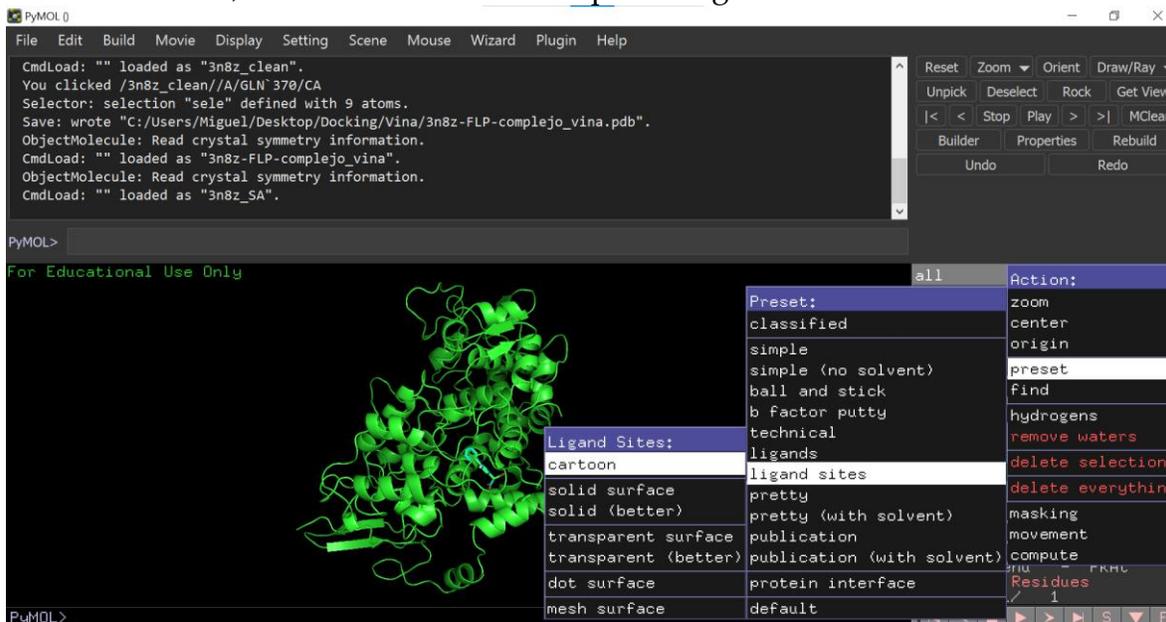
**2.4.9.12** Para comparar la molécula del punto 2.4.9.9 con la del punto 2.4.5.10 encontrada en la carpeta *Docking* que lleva por nombre *3n8z\_SA.pdb*, dar clic en *File>Open>Docking>3n8z\_SA.pdb*:



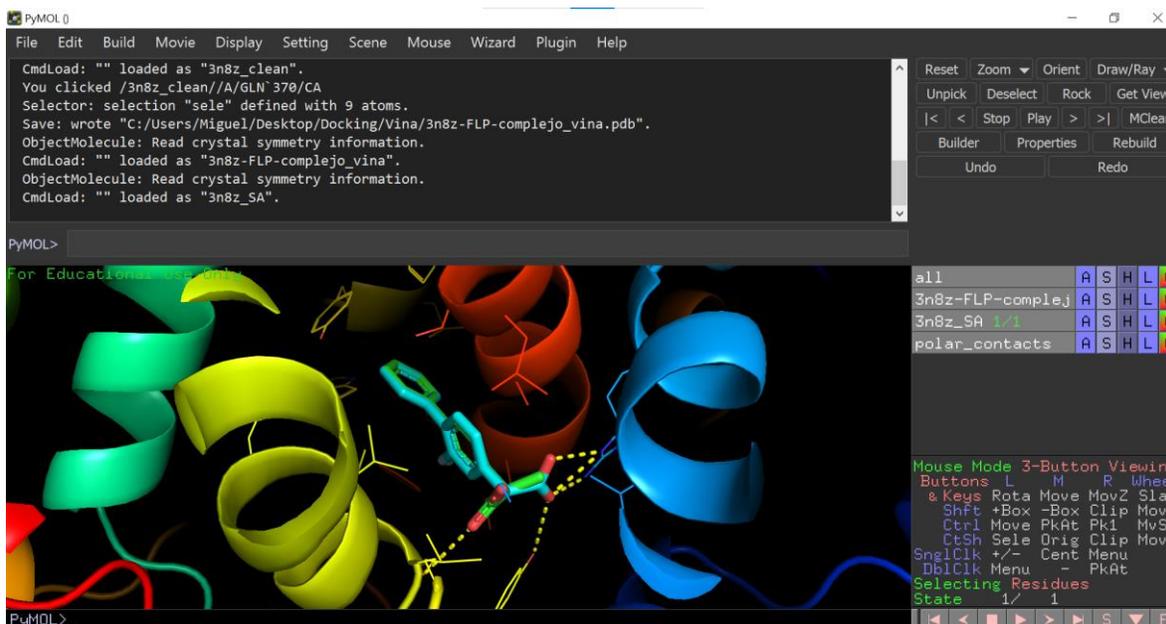
Observar que la proteína no cambió de lugar ni color, únicamente apareció otra molécula (color cian) en el lugar donde se encontraba la inicial (color verde), al igual que su nombre en el apartado de la derecha:



**2.4.9.13** Para tener una mejor visualización de ambas moléculas y la interacción con los residuos, dar clic en “A” de “all”>preset>ligand sites>cartoon:



Se tendrá una mejor vista de la interacción entre ambos. Comparar (visualmente) la conformación entre el resultado del docking molecular (punto 2.4.9.9) contra el resultado de la cristalización (punto 2.4.5.10), observar que son muy similares y casi sobrepuestas:

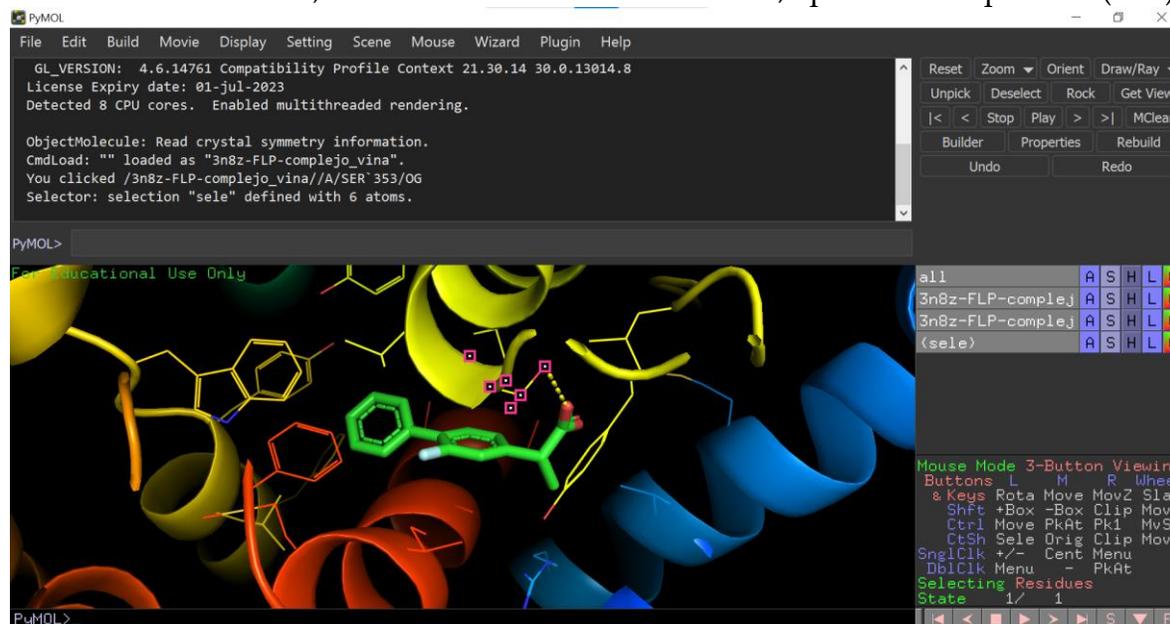


## 2.4.10 Presentación de resultados en 2D y 3D

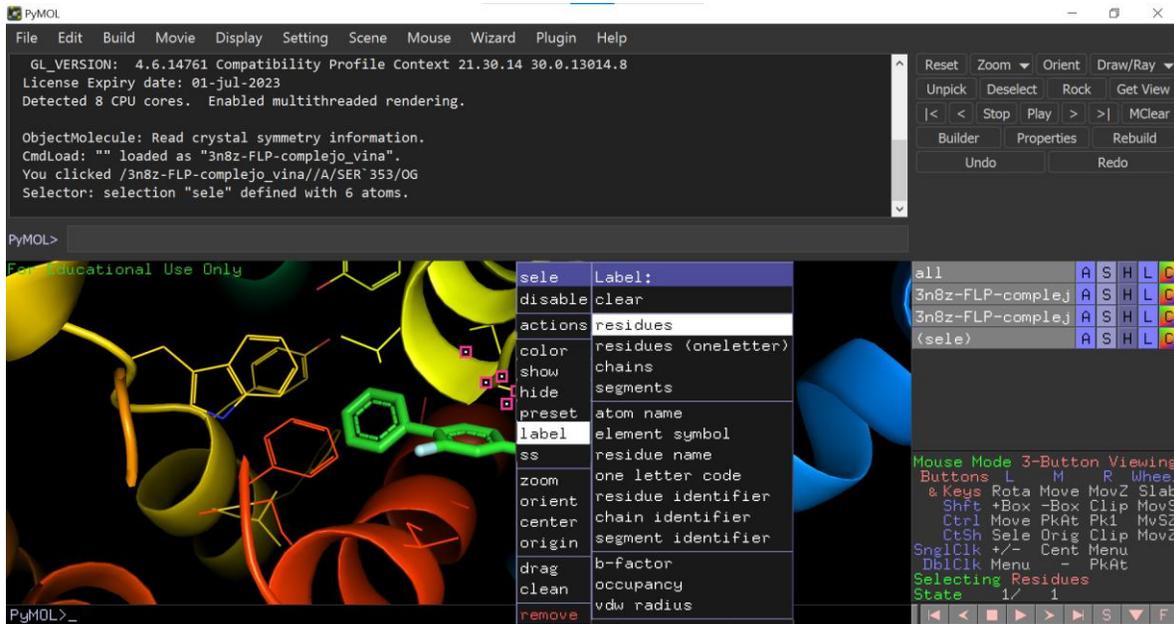
**2.4.10.1** Repetir los pasos del punto 2.4.9.10 para reiniciar el programa, abrir la molécula *3n8z-FLP-complejo\_vina.pdb* de la carpeta *Vina*.

Seguir los pasos del punto 2.4.9.13 para tener una vista mejor de la interacción entre la molécula y la proteína, dar clic en "A" de "all">preset>ligand sites>cartoon.

**2.4.10.2** Para nombrar a los residuos de aminoácidos que hacen interacción con la molécula de interés, dar clic en el residuo en cuestión, aparecerá el apartado (sele):



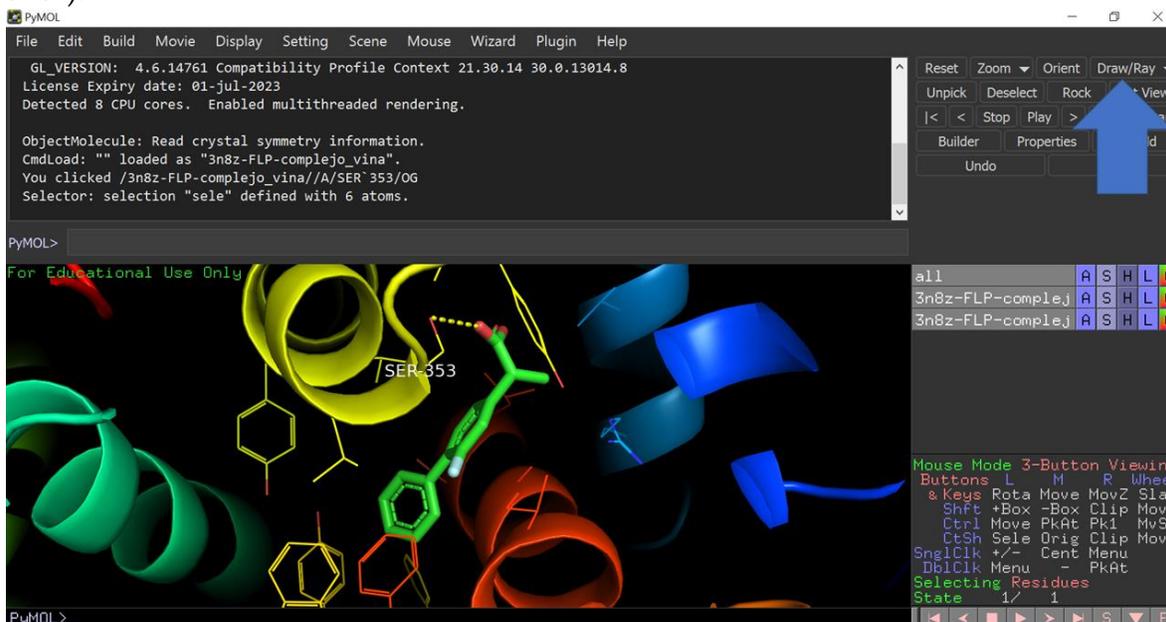
Dar clic derecho en cualquier cuadrado rojo que implica el aminoácido, desplegará unas opciones con respecto a éste, dar clic en label>residues, lo que mostrará las iniciales y el número del residuo correspondiente:



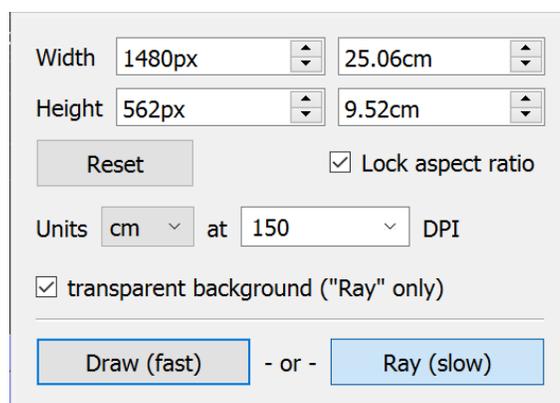
Para dejar de seleccionar ese residuo y poder elegir otro, dar clic en "A" de "(sele)" y "delete selection" (letras rojas), dejará el nombre del aminoácido, pero desaparecerá la selección de éste:



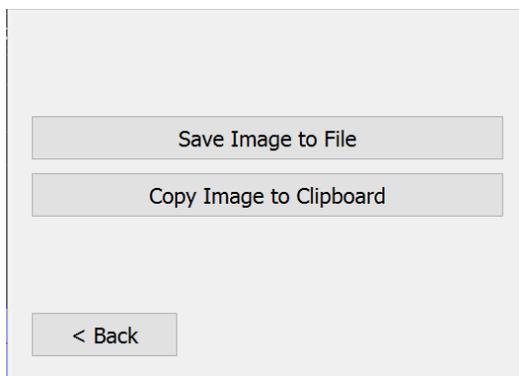
**2.4.10.3** Para guardar lo proyectado en la pantalla actual como imagen en 3D, dar clic en el apartado “Draw/Ray” ubicado en la esquina superior derecha (flecha azul):



Aparecerá una ventana que permite modificar las dimensiones de la imagen. Después de editarla a preferencia, dar clic en “Ray (slow)” (recuadro azul):



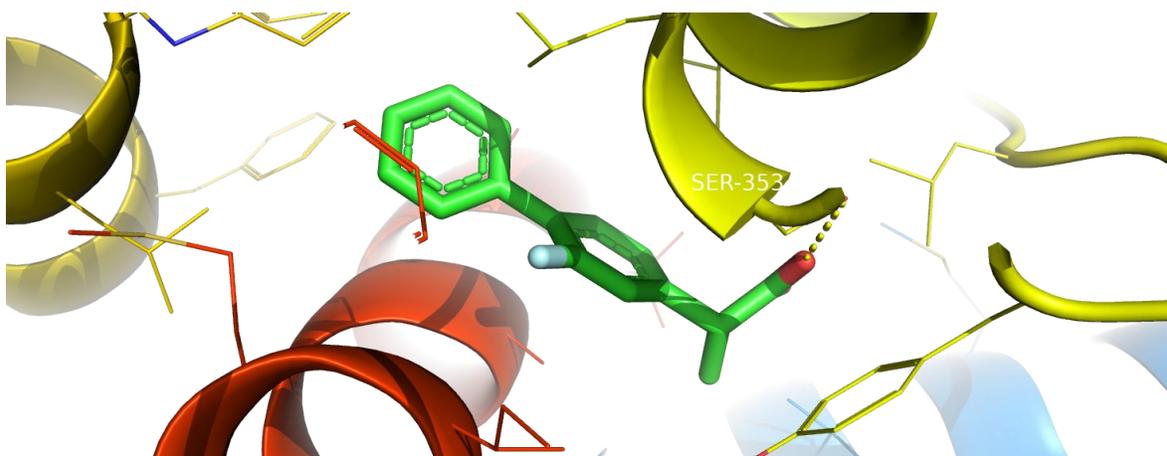
Aparecerá nuevamente una ventana, observar que el fondo negro se vuelve “cuadros”, esto es para que en la imagen no salga el fondo negro, dar clic en “Save Image to File”:



Guardar la imagen en la carpeta *Vina* con el nombre:

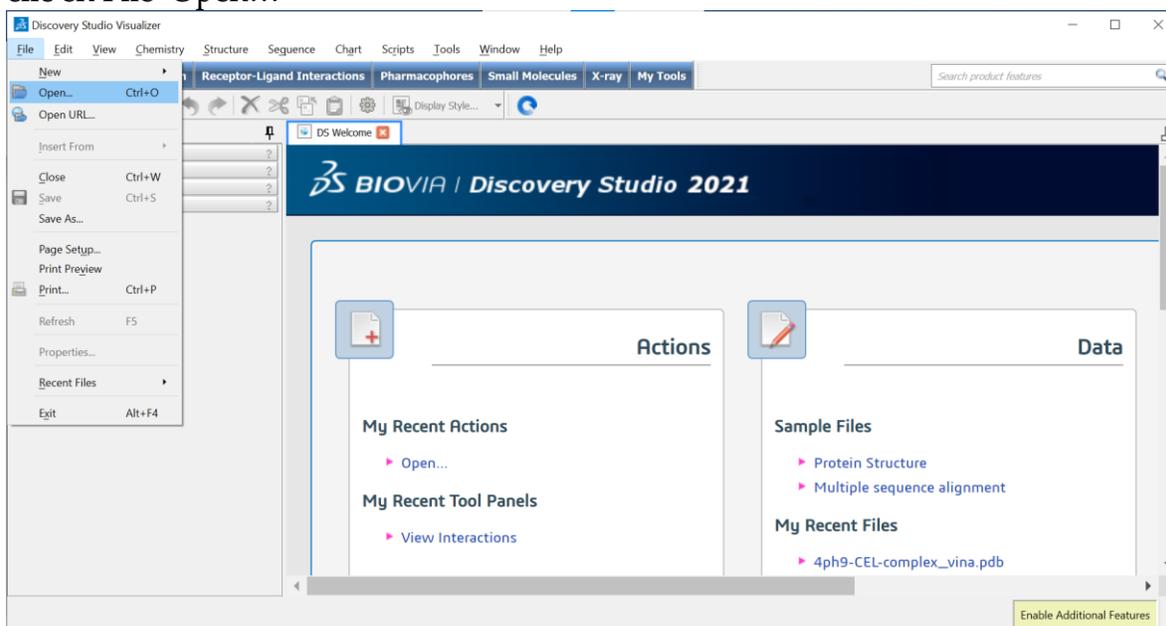
3n8z-FLP-3D

Quedará la imagen guardada de la siguiente manera:



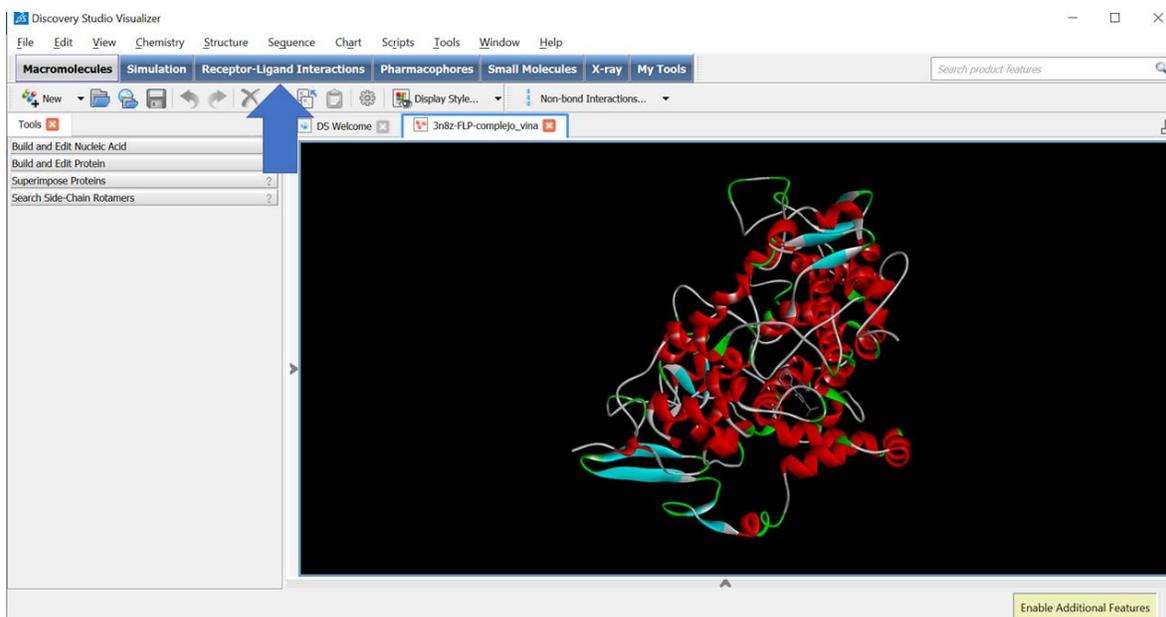
**2.4.10.4** Si por cuestión de licencia el programa menciona no poder utilizar la función de "Ray", dar clic en File>Export Image As...>PNG...>Save PNG image as...>Elegir el directorio del punto **2.4.10.3**.  
Cerrar el programa PyMOL.

**2.4.10.5** Para crear la imagen en 2D, abrir el programa Discovery Studio 2021 Client de acuerdo con los puntos 2.3.3.7 a 2.3.3.8. Una vez dentro del programa, dar clic en File>Open...

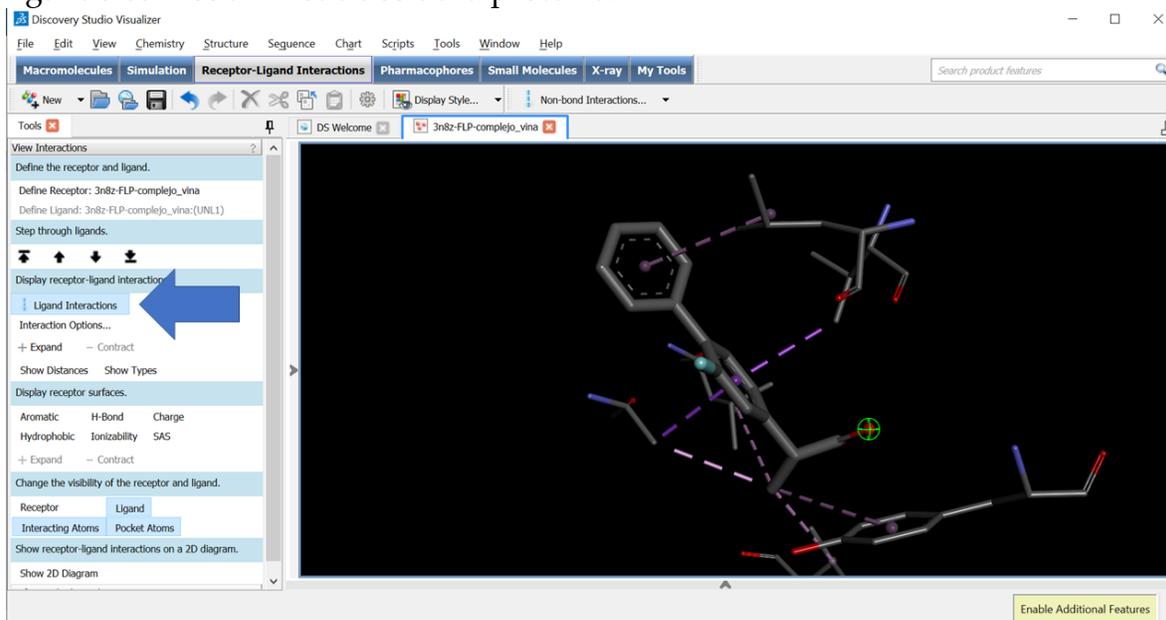


Buscar el archivo con nombre *3n8z-FLP-complejo\_vina.pdb* de la carpeta *Vina* y dar clic en “Abrir”.

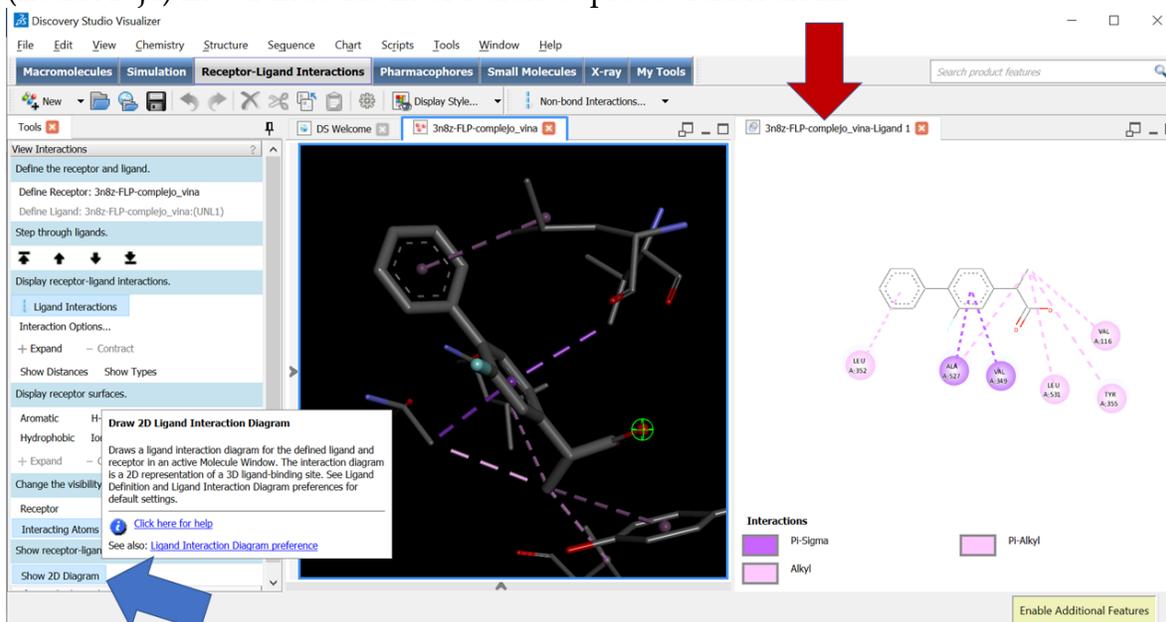
**2.4.10.6** La proteína se proyectará con fondo negro y diversas coloraciones. Dar clic en el apartado “Receptor-Ligand Interactions” (flecha azul) que se encuentra en las pestañas superiores:



**2.4.10.7** En el cuadrante izquierdo, localizar la opción “Ligand Interactions” (flecha azul). Al dar clic, observar que se centra en las interacciones que tiene el ligando con los aminoácidos de la proteína:



**2.4.10.8** Dar clic en el apartado “Show 2D Diagram” (flecha azul) encontrado debajo de las mismas opciones. Esto hará que se despliegue una nueva ventana (flecha roja) mostrando las interacciones que se tienen en 2D:

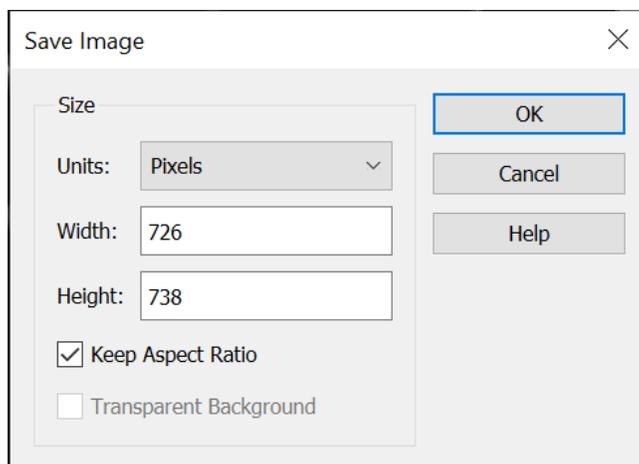


**2.4.10.9** Para guardar la imagen, dar clic en File>Save As... Elegir la carpeta *Vina* para guardar la imagen con el nombre:

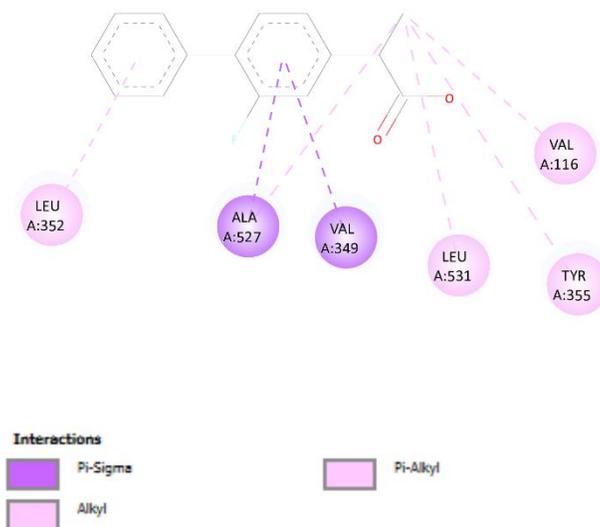
3n8z-FLP-complejo\_vina-Ligand 2D

Dar clic en “Guardar”.

Posteriormente, abrirá una ventana preguntando por las dimensiones de la imagen, por lo que una vez concluido, dar clic en “OK”:



Teniendo como resultado la siguiente imagen:



## 2.5 EJERCICIOS

1. El celecoxib es un inhibidor selectivo de COX-2 (DeWitt, 1999), desarrollado en el año 1997. En esta época la técnica de docking era muy nueva y recién se empezaban a utilizar métodos distintos alternativos a la farmacología clásica.

A un estudiante de QFB de la Universidad Autónoma Metropolitana le pidieron realizar un estudio con docking molecular para corroborar que el celecoxib es específico de la COX-2, empezando por demostrar su posible interacción con la COX-1, por lo que es necesario responder:

- a) ¿Cuál es el sitio activo de la COX-1?
  - b) ¿Cuál es el mecanismo de acción de celecoxib?
  - c) ¿Cuáles son los valores de Grid utilizados en su práctica para que pueda ser reproducible por alguien más?
  - d) ¿Qué afinidades se presentaron entre ligando-receptor y cuál sería la mejor?
  - e) ¿A qué aminoácidos se une el ligando y qué interacciones existen entre ellos?
- Puede utilizar la proteína utilizada en el ejemplo (3n8z) para la realización del docking en AutoDock Vina.

2. Resuelto lo anterior, realizar un estudio de docking en una enzima COX-2 y responder lo siguiente:

Para este ejercicio puede utilizar la enzima 5KIR.

- a) ¿Cuál es el sitio activo de la COX-2?
- b) ¿Cuáles son los valores de Grid utilizados en su práctica para que pueda ser reproducible por alguien más?
- c) ¿Qué afinidades se presentaron entre ligando-receptor y cuál sería la mejor?
- d) ¿A qué aminoácidos se une el ligando y qué interacciones existen entre ellos?
- e) ¿Existen diferencias significativas entre los valores antes dados con respecto a las afinidades presentadas en el ejercicio anterior? ¿Cómo las explicaría?

### BIBLIOGRAFÍA

- Abagyan, R., & Totrov, M. (2001). High-throughput docking for lead generation. *Curr Opin Chem Biol*, 5(4), 375-382. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00217-9](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00217-9)
- Andrews, L. B., & Barta, L. (2020). Simulation as a Tool to Illustrate Clinical Pharmacology Concepts to Healthcare Program Learners. *Current Pharmacology Reports*, 6(4), 182-191. <https://doi.org/10.1007/s40495-020-00221-w>
- Aronson, J. K. (2007). Concentration-effect and dose-response relations in clinical pharmacology [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.02871.x>]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 63(3), 255-257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.02871.x>
- Arunlakshana, O., & Schild, H. O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother*, 14(1), 48-58. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1959.tb00928.x>
- Badyal, D. K., & Desai, C. (2014). Animal use in pharmacology education and research: the changing scenario. *Indian journal of pharmacology*, 46(3), 257-265. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.132153>
- Balls, M. (1994). Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab Anim*, 28(3), 193-211. <https://doi.org/10.1258/002367794780681714>

- Bond, R. A., & Ijzerman, A. P. (2006). Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 27(2), 92-96. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.12.007>
- Burke, S. P., Stratton, K., & Baci, A. (2007). *The future of drug safety: promoting and protecting the health of the public*. The National Academies Press.
- Chen, C. (2010). COX-2's new role in inflammation. *Nature Chemical Biology*, 6(6), 401-402. <https://doi.org/10.1038/nchembio.375>
- Chen, Y. Z., & Zhi, D. G. (2001). Ligand-protein inverse docking and its potential use in the computer search of protein targets of a small molecule. *Proteins*, 43(2), 217-226. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010501\)43:2<217::aid-prot1032>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010501)43:2<217::aid-prot1032>3.0.co;2-g)
- Christopoulos, A. (2014). Advances in G protein-coupled receptor allostery: from function to structure. *Mol Pharmacol*, 86(5), 463-478. <https://doi.org/10.1124/mol.114.094342>
- Costa, M., Brookes, S. J. H., & Hennig, G. W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, 47(suppl 4), iv15. [https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl\\_4.iv15](https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv15)
- Costa, M., Brookes, S. J. H., Steeled, P. A., Gibbins, I., Burcher, E., & Kandiah, C. J. (1996). Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience*, 75(3), 949-967. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00275-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00275-8)
- Daeffler, L., & Landry, Y. (2000). Inverse agonism at heptahelical receptors: concept, experimental approach and therapeutic potential. *Fundam Clin Pharmacol*, 14(2), 73-87. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2000.tb00395.x>
- DeWitt, D. L. (1999). Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol*, 55(4), 625-631.
- DeWitt, D. L., & Smith, W. L. (1988). Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(5), 1412-1416. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.5.1412>
- Doke, S. K., & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J*, 23(3), 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>
- Ekins, S., Mestres, J., & Testa, B. (2007). In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol*, 152(1), 9-20. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707305>
- Elhajji, F. D., & Basheti, I. A. (2018). Animal use in pharmacy undergraduate pharmacology laboratories: Students' perceptions and need assessments. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(8), 1098-1105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.05.020>
- Ezeala, C. C., Ezeala, M. O., & Akapelwa, T. M. (2021). A Survey of Medical Students' Experiences with Online Practical Pharmacology Classes during Covid-19 Lockdown. *Medical Journal of Zambia*, 48 (1), 25-30.
- Festing, M. F. (1994). Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab Anim*, 28(3), 212-221. <https://doi.org/10.1258/002367794780681697>

- Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *Journal of anatomy*, 111(Pt 1), 69-97.
- Gaddum, J. H. (1937). The quantitative effects of antagonistic drugs. *J. physiol*, 89, 7P-9P.
- Gohlke, H., Hendlich, M., & Klebe, G. (2000). Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol*, 295(2), 337-356. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3371>
- Green, G. A. (2001). Understanding NSAIDs: from aspirin to COX-2. *Clin Cornerstone*, 3(5), 50-60. [https://doi.org/10.1016/s1098-3597\(01\)90069-9](https://doi.org/10.1016/s1098-3597(01)90069-9)
- Gupta, M., Sharma, R., & Kumar, A. (2018). Docking techniques in pharmacology: How much promising? *Computational Biology and Chemistry*, 76, 210-217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.06.005>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Hill, S. J., Young, J. M., & Marrian, D. H. (1977). Specific binding of 3H-mepyramine to histamine H<sub>1</sub> receptors in intestinal smooth muscle. *Nature*, 270(5635), 361-363. <https://doi.org/10.1038/270361a0>
- Kalgutkar, A. S., Crews, B. C., Rowlinson, S. W., Marnett, A. B., Kozak, K. R., Rimmel, R. P., & Marnett, L. J. (2000). Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 925-930. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.925>
- Kararli, T. T. (1995). Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals [<https://doi.org/10.1002/bdd.2510160502>]. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 16(5), 351-380. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bdd.2510160502>
- Kenakin, T., & Christopoulos, A. (2013). Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov*, 12(3), 205-216. <https://doi.org/10.1038/nrd3954>
- Kenakin, T., Watson, C., Muniz-Medina, V., Christopoulos, A., & Novick, S. (2012). A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci*, 3(3), 193-203. <https://doi.org/10.1021/cn200111m>
- Klebe, G. (2006). Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov Today*, 11(13-14), 580-594. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.05.012>
- Kurumbail, R. G., Kiefer, J. R., & Marnett, L. J. (2001). Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol*, 11(6), 752-760. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(01\)00277-9](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(01)00277-9)
- Landry, Y., & Gies, J. P. (2008). Drugs and their molecular targets: an updated overview. *Fundam Clin Pharmacol*, 22(1), 1-18. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2007.00548.x>

- Laneuville, O., Breuer, D. K., Dewitt, D. L., Hla, T., Funk, C. D., & Smith, W. L. (1994). Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 271(2), 927-934.
- Leach, A. R., Shoichet, B. K., & Peishoff, C. E. (2006). Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. *J Med Chem*, 49(20), 5851-5855. <https://doi.org/10.1021/jmo60999m>
- Lecomte, M., Laneuville, O., Ji, C., DeWitt, D. L., & Smith, W. L. (1994). Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J Biol Chem*, 269(18), 13207-13215.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46(1-3), 3-26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
- Loll, P. J., Picot, D., & Garavito, R. M. (1995). The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H<sub>2</sub> synthase. *Nature Structural Biology*, 2(8), 637-643. <https://doi.org/10.1038/nsbo895-637>
- Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., & Browner, M. F. (1996). Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol*, 3(11), 927-933. <https://doi.org/10.1038/nsb1196-927>
- Malkowski, M. G., Ginell, S. L., Smith, W. L., & Garavito, R. M. (2000). The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science*, 289(5486), 1933-1937. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1933>
- Nasser, Y., Ho, W., & Sharkey, K. A. (2006). Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat [<https://doi.org/10.1002/cne.20898>]. *Journal of Comparative Neurology*, 495(5), 529-553. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.20898>
- Picot, D., Loll, P. J., & Garavito, R. M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H<sub>2</sub> synthase-1. *Nature*, 367(6460), 243-249. <https://doi.org/10.1038/367243a0>
- Rouzer, C. A., & Marnett, L. J. (2009). Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res*, 50 Suppl(Suppl), S29-34. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800042-JLR200>
- Rowlinson, S. W., Crews, B. C., Lanzo, C. A., & Marnett, L. J. (1999). The Binding of Arachidonic Acid in the Cyclooxygenase Active Site of Mouse Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2 (COX-2): A PUTATIVE L-SHAPED BINDING CONFORMATION UTILIZING THE TOP CHANNEL REGION \*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 23305-23310. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23305>
- Rowlinson, S. W., Kiefer, J. R., Prusakiewicz, J. J., Pawlitz, J. L., Kozak, K. R., Kalgutkar, A. S., . . . Marnett, L. J. (2003). A Novel Mechanism of Cyclooxygenase-2 Inhibition Involving Interactions with Ser-530 and Tyr-385 \*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45763-45769. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305481200>
- Schaumann, W. (1956). Influence of Atropine and Morphine on the Liberation of Acetylcholine from the Guinea Pig's Intestine. *Nature*, 178(4542), 1121-1122. <https://doi.org/10.1038/1781121b0>

- Schild, H. O. (1947). pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 2(3), 189-206. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1947.tb00336.x>
- Shonberg, J., Lopez, L., Scammells, P. J., Christopoulos, A., Capuano, B., & Lane, J. R. (2014). Biased agonism at G protein-coupled receptors: the promise and the challenges--a medicinal chemistry perspective. *Med Res Rev*, 34(6), 1286-1330. <https://doi.org/10.1002/med.21318>
- Sidhu, R. S., Lee, J. Y., Yuan, C., & Smith, W. L. (2010). Comparison of Cyclooxygenase-1 Crystal Structures: Cross-Talk between Monomers Comprising Cyclooxygenase-1 Homodimers. *Biochemistry*, 49(33), 7069-7079. <https://doi.org/10.1021/bi1003298>
- Singh, V. P., Pratap, K., Sinha, J., Desiraju, K., Bahal, D., & Kukreti, R. (2016). Critical evaluation of challenges and future use of animals in experimentation for biomedical research. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 29(4), 551-561. <https://doi.org/10.1177/0394632016671728>
- Sivakrishnan, S., & Anbiah, S. V. (2021). Animals Used in Experimental Pharmacology and 3 Rs. *Pharmacophore*, 12(1), 1-7. <https://doi.org/10.51847/mixPbfZddp>
- Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. W., Jr. (2014). Computational methods in drug discovery. *Pharmacol Rev*, 66(1), 334-395. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>
- Smith, W. L., & Dewitt, D. L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol*, 62, 167-215. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60430-7](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60430-7)
- Smith, W. L., DeWitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69, 145-182. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>
- Smith, W. L., Garavito, R. M., & DeWitt, D. L. (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2 \*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33157-33160. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33157>
- Tallarida, R. J., Cowan, A., & Adler, M. W. (1979). pA<sub>2</sub> and receptor differentiation: A statistical analysis of competitive antagonism. *Life Sciences*, 25(8), 637-654. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0024-3205\(79\)90505-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0024-3205(79)90505-8)
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, 31(2), 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Ward, A., & Takemori, A. E. (1976). Studies on the narcotic receptor in the guinea-pig ileum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 199(1), 117.