



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

Reporte de Servicio Social

Cribado virtual por acoplamiento molecular de la quimioteca N015 sobre el
receptor GABA_A

Alumna

Rosa Itzel Alcántara Rivas

Matricula 2172029026

Asesores

Dr. Jaime Pérez Villanueva

Dra. Karen Rodríguez Villar

Enero 2023

Índice

1. Introducción	4
2. Antecedentes.....	5
2.1. Trastornos de ansiedad	5
2.1.1. Tratamiento.....	5
2.1.2. El ácido γ -aminobutírico (GABA) y el receptor GABA _A	6
2.1.3. Diseño de fármacos asistido por computadora.....	7
3. Planteamiento del problema	9
4. Objetivos.....	9
4.1. Objetivo general.....	9
4.2. Objetivos específicos	9
5. Material y métodos	10
5.1. Revisión bibliográfica sobre ansiolíticos asociados al receptor GABA _A	10
5.2. Preparación de la proteína y ligandos para acoplamiento molecular	10
5.2.1. Selección de la proteína	10
5.2.2. Preparación de los ligandos.....	10
5.3. Estudios de acoplamiento molecular.....	11
5.4. Selección de ligandos potencialmente activos sobre el receptor GABA _A	11
5.4.1. Análisis de interacciones ligado-receptor	12
5.4.2. Predicción de actividad biológica usando PASSonline	12
5.4.3. Predicción de perfil ADMET usando la plataforma SwissADME.....	12
5.5. Diseño y evaluación <i>in silico</i> de nuevos compuestos potencialmente activos sobre GABA _A	13
6. Resultados y discusión.....	14
6.1. Revisión bibliográfica sobre compuestos activos sobre GABA _A	14
6.2. Preparación de la proteína y ligandos para acoplamiento molecular	15
6.2.1. Selección y preparación de la proteína	15
6.3. Estudios de acoplamiento molecular.....	16
6.4. Selección de ligandos potencialmente activos sobre el receptor GABA _A	19
6.4.1. Análisis de interacciones ligado-receptor	20
6.4.2. Predicción de actividad biológica usando PASSonline.....	23
6.4.3. Predicción de perfil ADMET usando la plataforma SwissADME.....	24
6.5. Diseño y evaluación <i>in silico</i> de nuevos inhibidores de GABA _A	26
7. Conclusiones.....	29
8. Referencias	30
Anexo A	34

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales fármacos ansiolíticos con acción sobre GABA	14
Tabla 2. Diferentes versiones de la proteína cristalizada	15
Tabla 3. Resultados de acoplamiento molecular ciego sobre GABA _A	18
Tabla 4. Compuestos seleccionados por cribado virtual agrupados por quimiotipos.....	19
Tabla 5. Análisis de interacciones ligando-receptor GABA _A encontradas con los tres programas.....	22
Tabla 6. Predicción de actividad biológica de las moléculas selectas en PASSonline	23
Tabla 7. Perfil ADMET de los compuestos seleccionados por cribado virtual	25
Tabla 8. Interacciones ligando-receptor observadas para las moléculas propuestas.....	27
Tabla 9. Perfil ADME y toxicidad calculada para las moléculas propuestas	28
Tabla 10. Predicción de actividad biológica de las moléculas M1–10	28

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura representativa del receptor GABA _A	7
Figura 2. Gráficos de Ramachandran para la proteína procesada en Yasara, Chimera y sin procesar. ..	16
Figura 3. Sitios de unión del diazepam en el receptor GABA _A	17
Figura 4. Comparación de quimiotipos y núcleos. A Quimiotipo de benzodiazepinas; B Quimiotipo predominante en el estudio de acoplamiento molecular; C Zolpidem, fármaco modelo contra esquizofrenia.	20
Figura 5. Estructuras de los compuestos propuestos como inhibidores GABA _A	26

1. Introducción

Los trastornos de ansiedad contemplan varios padecimientos relacionados con la respuesta aumentada hacia una potencial amenaza. Esta enfermedad afecta a una fracción importante de la población mundial, teniendo un incremento en su prevalencia en los últimos años como consecuencia de la actual pandemia. Sus síntomas son variados, lo que dificulta su diagnóstico y tratamiento, el cual debe ser supervisado por personal de la salud mental.

El entendimiento de la enfermedad es crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos. Actualmente, el neurotransmisor GABA (ácido γ -aminobutírico) se sabe está relacionado con la ansiedad y su regulación. Por ello, el receptor GABA_A se ha identificado como el principal blanco terapéutico para tratar los trastornos de ansiedad, siendo las benzodiazepinas (BZD) el grupo de los fármacos más utilizados por su acción sobre el sistema nervioso central.

No obstante, la necesidad de encontrar nuevos y mejores fármacos ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias que mejoran el proceso de búsqueda y evaluación de compuestos bioactivos, tal es el caso del diseño de fármacos asistido por computadora. Esta estrategia ofrece la oportunidad de evaluar *in silico* una gran cantidad de moléculas para seleccionar aquellas con las mejores oportunidades de presentar la actividad deseada, reduciendo el tiempo y número de pruebas a realizar.

2. Antecedentes

2.1. Trastornos de ansiedad

La ansiedad se describe como la respuesta normal e innata ante lo que percibimos como una situación de peligro (Canadian Mental Health Association, BC Division, 2015), mientras que los trastornos de ansiedad se definen como la creciente sensación de miedo en respuesta a una señal de amenaza real o ficticia (Craske, et al., 2009). Por ello, estos últimos abarcan los trastornos de pánico, agorafobia, ansiedad generalizada, respuesta obsesivo-compulsivo y estrés traumático (Almokhtar, et al., 2019).

El diagnóstico de esta enfermedad es complejo al considerar múltiples síntomas, por tanto, para determinar un trastorno de ansiedad se consideran al menos tres de los siguientes síntomas durante seis meses o más: inquietud, nerviosismo, fatiga, dificultad para concentrarse, irritabilidad, tensión muscular y trastornos del sueño (Munir, et al., 2019).

De acuerdo con las cifras oficiales, el 14.3 % de la población mexicana ha padecido algún trastorno de ansiedad, convirtiéndola en la enfermedad mental de mayor prevalencia. Además, se observó que en el 50 % de los casos los síntomas comienzan antes de los 25 años (Boletín del Senado de la República, 2017). Sin embargo, estas cifras incrementaron drásticamente en 2020, con un aumento de los servicios de psicoterapia y orientación terapéutica relacionado con la pandemia por COVID-19, en al menos 60% de los países (OMS, 2020).

2.1.1. Tratamiento

Las benzodiazepinas (BDZ) son una familia de fármacos que actúan como moduladores alostéricos del canal selectivo para iones cloruro GABA_A. Estas favorecen la activación del receptor GABA_A, generando un aumento en la frecuencia de apertura que favorece la hiperpolarización de la neurona, haciéndola menos excitable (Rosas-Gutiérrez, et al., 2013).

Este grupo de fármacos surgió en la década de 1960 como una alternativa a los barbitúricos, teniendo mejores resultados terapéuticos y un mejor perfil de seguridad. De hecho, las BDZ fueron los primeros fármacos en tener una amplia brecha entre el efecto sedante y el efecto ansiolítico. Sin embargo, su efectividad se ve comprometida en tratamientos prolongados, debido a la aparición de tolerancia farmacológica tras cuatro semanas de tratamiento; por ello, su uso se limita a periodos de tres meses y en casos especiales se puede extender el tratamiento (Charney et al., 2007; Campagne & García-Campayo, 2005; Rosas-Gutiérrez et al., 2013; Farach et al., 2012).

2.1.2. El ácido γ -aminobutírico (GABA) y el receptor GABA_A

Las BZD tienen como diana farmacológica uno de los receptores del neurotransmisor GABA (ácido γ -aminobutírico), por tanto, son útiles en el tratamiento de distintas condiciones como el trastorno de ansiedad, epilepsia, insomnio, espasticidad, entre otras enfermedades fisiopatológicas (Rosas-Gutiérrez et al., 2013). Además, GABA es el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central relacionado con la ansiedad y su regulación, teniendo como receptores al canal ionotrópico GABA_A y el metabotrópico GABA_B (Jembrek & Vlainic, 2015).

El canal de cloruro dependiente de ligando, GABA_A, es un receptor pentamérico de naturaleza proteica formado por dos dominios: uno extracelular y uno intracelular. Este canal se encuentra conformado por 5 subunidades y su composición puede variar según la isoforma, siendo la más abundante aquella con dos subunidades α 1, dos β 2 y una γ 2, dispuestas de forma casi simétrica alrededor de un canal central, Figura 1 (Jansen, 2019). No obstante, en humanos se conocen al menos seis tipos de subunidades α (α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α 6), tres subunidades β (β 1, β 2, β 3), tres subunidades γ (γ 1, γ 2, γ 3), una δ , una ϵ , una π y una θ (Martin et al., 2019).

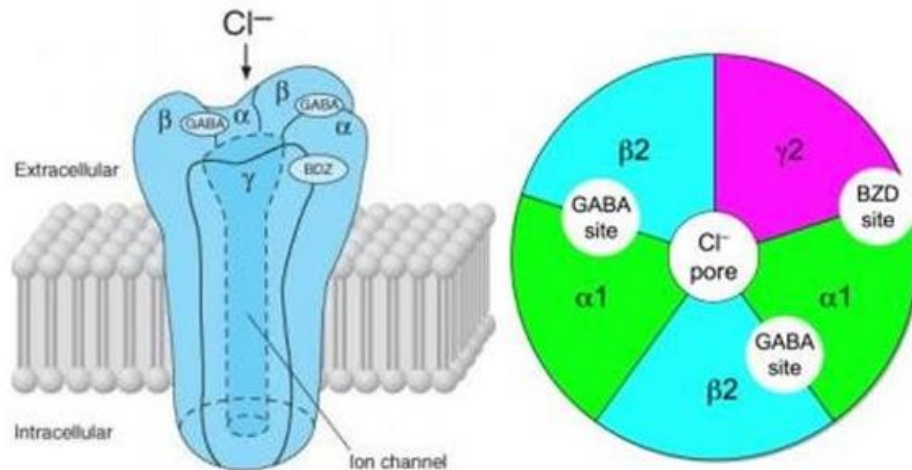


Figura 1. Estructura representativa del receptor GABA_A.
 Recuperado de: García Alonso, P. & Simón Velasco, M., 2016.

Cuando el receptor GABA_A es activado la conductancia de cloruro aumenta, inhibiendo la neurona y generando una disminución de la respuesta ante estímulos de excitación (Gauthier & Nuss, 2015). Sin embargo, las propiedades farmacológicas del receptor GABA_A parecen depender de la subunidad α presente en la isoforma, representando un reto farmacológico, pues los ligandos difícilmente presentan alta selectividad por esta subunidad (Navarro, 2010). Por ello, es indispensable la búsqueda de nuevas moléculas útiles en el tratamiento de los trastornos de ansiedad que posean buenos perfiles de seguridad, así como mayor potencia y selectividad por el receptor GABA_A.

2.1.3. Diseño de fármacos asistido por computadora

El diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC) es una estrategia que integra múltiples metodologías para diseñar, identificar y optimizar nuevos compuestos bioactivos, cuyo objetivo es mejorar el proceso de descubrimiento de fármacos. Estas estrategias llevaban a la identificación de compuestos líderes y/o candidatos a fármacos en menor tiempo, reduciendo de manera importante el tiempo de investigación y número de ensayos biológicos a realizar. Sin embargo, es importante recalcar que el DiFAC no sustituye a los ensayos biológicos, sino que requiere de la información experimental para validar la información generada (Saldívar-González et al., 2017).

Uno de los métodos computacionales más empleados es el cribado virtual, el cual permite filtrar extensas bases de datos, denominadas quimiotecas; las cuales sirven como material de partida para la búsqueda de candidatos para realizar pruebas experimentales. Este método integra el conocimiento de la estructura 3D del blanco farmacológico de interés y los compuestos bioactivos para realizar pruebas *in silico* para identificar a los mejores candidatos.

Una de las metodologías más ampliamente usadas en el cribado virtual es el acoplamiento molecular, el cual permite generar modelos de unión entre el ligando y el receptor. Este predice el modo de unión más favorable y asigna un valor (función de puntuación) que mide la interacción entre un ligando y el blanco farmacológico (Saldívar-González, et al., 2017; Ballón Paucara, & Grados Torrez, 2019; Velásquez, et al., 2013; Prieto Martínez & Medina-Franco, 2018).

Es importante mencionar que el cribado virtual requiere de un post procesamiento de los datos, donde se aplican filtros que ayudan a clasificar los compuestos según los requerimientos del estudio, por ejemplo, las energías de unión en los estudios de acoplamiento molecular. Al término, se seleccionan los compuestos que mantengan interacciones conocidas y relacionadas con la actividad biológica de interés, y por lo tanto tengan la mayor probabilidad de éxito (Cuanalo-Contreras et al., 2011; Prieto Martínez & Medina-Franco 2018).

3. Planteamiento del problema

Las benzodiazepinas (BZD) son los fármacos más representativos dirigidos al receptor GABA_A, actuando como moduladores alostéricos. Sin embargo, estas representan un riesgo a la salud por las múltiples reacciones adversas reportadas, siendo una de las más preocupantes la dependencia que pueden causar a largo plazo (Rosas-Gutiérrez, et al., 2013). Además, la mala dosificación o tratamientos prolongados pueden causar actitudes paranoicas o agresivas, la pérdida de memoria y del estado de alerta, el sueño excesivo, la depresión, el síndrome de dependencia, la ansiedad y en los peores casos coma o la muerte. (Campagne & García-Campayo, 2005).

Por lo anterior, es de suma importancia encontrar nuevos fármacos que tengan como blanco el receptor GABA_A y ofrezcan un mejor perfil de seguridad a largo plazo. Una alternativa para la búsqueda de nuevas moléculas como potenciales fármacos es el cribado virtual (Saldívar-González, et al., 2017), que permite evaluar y clasificar las quimiotecas según su energía de unión (función de puntuación) y predecir la forma de interacción más favorecida. Lo anterior permitirá seleccionar solo aquellos compuestos donde la actividad sea probable, disminuyendo el número de ensayos biológicos y en consecuencia una reducción de costo y tiempo de investigación. Además de permitir el reposicionamiento de fármacos (Prieto Martínez & Medina-Franco, 2018).

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Identificar compuestos potencialmente activos sobre el receptor GABA_A a partir del cribado virtual de la base de datos N015.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar una revisión bibliográfica sobre ansiolíticos asociados al receptor GABA_A
- Preparar la proteína y los ligandos para el acoplamiento molecular usando diferentes programas computacionales.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular sobre el blanco seleccionado empleando los programas *Autodock vina*, *Autodock 4.2* y *GOLD*.
- Identificar y seleccionar compuestos potencialmente activos sobre GABA_A.
- Proponer una serie de estructuras novedosas potencialmente activas sobre GABA_A.

5. Material y métodos

5.1. Revisión bibliográfica sobre ansiolíticos asociados al receptor GABA_A

Se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos *ProteinDataBank* de diferentes receptores relacionados con ansiolíticos con la finalidad de seleccionar un blanco de relevancia clínica (Berman, 2000). Una vez seleccionado el blanco terapéutico, se usó la base de datos pública ChEMBL para recabar información acerca de los ligandos que actúan sobre el receptor (Papadatos & Overington, 2014).

5.2. Preparación de la proteína y ligandos para acoplamiento molecular

5.2.1. Selección de la proteína

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica de las distintas versiones de la proteína cristalizada disponibles en *ProteinDataBank*, tomando como criterios de selección la resolución (Read et al., 2011) y el fármaco aprobado como ligante (Charney, et al., 2007).

La proteína seleccionada (PDB: 6X3X) se curó y minimizó usando dos programas: *Chimera* obteniendo un archivo de salida en formato *pdb, y la plataforma online *YASARA* con un archivo de salida *sce. La selección de la estructura 3D de la proteína para los posteriores estudios de acoplamiento molecular se realizó por comparación entre las dos estructuras minimizadas y la proteína original (cruda) usando el diagrama de Ramachandran. Este gráfico permitió verificar la disposición espacial de los aminoácidos dentro de la estructura 3D y si se encuentran en zonas favorables (Carugo & Djinić-Carugo, 2013).

5.2.2. Preparación de los ligandos

Los compuestos de la quimioteca N015 se construyeron en el programa *ChemSketch* a partir de los códigos SMILES de cada molécula (formato *mol) y fueron optimizados en el programa *Avogadro* (Hanwell et al., 2012), usando el campo de fuerza MMFF94s y el algoritmo *steepest descent* (Avogadro, 2018). Los archivos se guardaron en formato *pdb.

Finalmente, los archivos de la proteína y los ligandos en formato *pdb fueron convertidos a *pdbqt utilizando el programa *Pyrx* v0.8, para continuar con el análisis de acoplamiento molecular (Alamri, 2019).

5.3. Estudios de acoplamiento molecular

El cribado de las moléculas de la quimioteca N015 sobre el receptor GABA_A se llevó a cabo por acoplamiento molecular usando tres programas: *Autodock vina*, *Autodock 4.2* y *GOLD*. De manera particular, para los programas *Autodock vina*, *Autodock 4.2* se utilizó la interfaz del software *Pyrx* para ejecutar los programas y establecer las condiciones del estudio (Alamri, 2019). El *grid box* se centró sobre el sitio de unión del ligante cristalizado (Jabbarzadeh et al., 2018) con coordenadas en x: 90.7543177836, y: 126.225677764, z: 115.180619839 y dimensiones de 25.0 Å para cada lado.

La visualización de las conformaciones obtenidas se realizó en los programas *AutoDockTools*, *Pymol* y *Discovery Studio* (Seeliger & de Groot, 2010., Osman et al., 2021; Jabbarzadeh et al., 2018). Los resultados de acoplamiento molecular para las moléculas de la quimioteca N015 se evaluaron usando los valores de energía de unión (ΔG) para *Autodock vina* y *Autodock 4.2*, y los valores de GOLD PLP para GOLD. En el primer caso, una mayor afinidad ligando-receptor se expresa con energías de unión negativas, mientras que GOLD PLP con valores cercanos a 100 indicaría mayor afinidad ligando-receptor (Tanwar et al., 2014).

El método para cada programa se validó con un estudio de docking del ligando cristalizado, en el que se comparó con su posición original en la estructura cristalográfica. El ligante acoplado fue procesado igual que la quimioteca y la comparación se realizó usando como criterio el valor de $RMSD \leq 2$ Å, el cual se calculó en el programa *AutoDockTools 1.5.7rc1* (Osman et al., 2021., Rabelo, 2018). Adicionalmente, se realizó un estudio de acoplamiento molecular sobre los distintos sitios de unión para establecer: el número de repeticiones (25, 50, 100 o 250) y el sitio de unión más probable, usando el valor de RMSD como criterio de selección. Se eligió aquel ciclo con el valor de RMSD más pequeño y el sitio en el que se encontró un mayor número de conformaciones.

5.4. Selección de ligandos potencialmente activos sobre el receptor GABA_A

Con el objetivo de encontrar potenciales compuestos activos se realizó un consenso entre los resultados obtenidos en los tres programas. Para ello se normalizaron los valores de energía de unión y GOLD PLP calculados para cada molécula en el programa Excel® usando la Ecuación 1 y 2 (Dodge et al., 2006)

$$\text{Ec. 1 } \frac{\Delta G - \Delta G \text{ min}}{\Delta G \text{ max} - \Delta G \text{ min}}$$

$$\text{Ec. 2 } \frac{\text{GOLD PLP} - \text{GOLD PLP min}}{\text{GOLD PLP max} - \text{GOLD PLP min}}$$

Finalmente, se seleccionaron las moléculas con los mejores valores en los tres programas a partir de un gráfico en 3D, en el cual cada eje representa los resultados de un programa, usando como el mismo valor de cohorte en cada eje (López-López et al., 2019).

5.4.1. Análisis de interacciones ligado-receptor

Se llevó a cabo el análisis de interacciones ligando-receptor de las moléculas con mejores valores de afinidad y el ligante cristalizado (diazepam), identificando el número y tipo de interacción, así como los aminoácidos involucrados. Los gráficos en 2D y 3D fueron generados en el programa *Discovery Studio* (Afriza et al., 2018).

5.4.2. Predicción de actividad biológica usando PASSonline

Con la finalidad de conocer potenciales actividades relacionadas y/o indeseadas de las moléculas encontradas por cribado virtual, se llevó a cabo un análisis en la plataforma *PASSonline* (Lagunin et al., 2000). Se analizaron los resultados con probabilidad de actividad (P_a) > 0.500 y Probabilidad de inactividad (P_i) < 0.100. Los datos para cada molécula se resumen en tablas individuales, enlistando aquellas actividades e inactividades útiles para los trastornos de ansiedad o relacionadas con el receptor.

5.4.3. Predicción de perfil ADMET usando la plataforma SwissADME

Se generaron predicciones del perfil ADMET para cada molécula seleccionada, a partir del código SMILES usando la plataforma *SwissADME*. En esta plataforma se calcularon distintos descriptores moleculares, relacionados con propiedades fisicoquímicas y farmacológicas como lipófila, solubilidad, permeabilidad en la barrera hematoencefálica. Además de alertas estructurales que hablan de la probabilidad de toxicidad (Sulfahri et al., 2019).

5.5. Diseño y evaluación *in silico* de nuevos compuestos potencialmente activos sobre GABA_A

Se diseñaron diez nuevas moléculas potencialmente activas a partir de los resultados del cribado virtual. El diseño se realizó a partir del análisis de quimiotipos y la combinación de grupos funcionales de los compuestos identificados por cribado virtual. Finalmente, se realizó el acoplamiento molecular de las moléculas propuestas sobre el receptor GABA_A usando *autodock vina*, bajo las mismas condiciones descritas previamente. Adicionalmente se realizó la predicción de actividades y propiedades farmacológicas en *PASSonline* y *SwissADME*.

6. Resultados y discusión

6.1. Revisión bibliográfica sobre compuestos activos sobre GABA_A

La revisión bibliográfica permitió identificar los distintos sitios activos dentro del receptor GABA_A, así mismo los principales ligandos, su función, mecanismo de acción y sitio de unión, los cuales se detallan en la Tabla 1 (Instituto Europeo de Bioinformática, 2018). De manera general, se observó que los ligandos actúan como moduladores alostéricos y el sitio de unión más frecuente se encuentra entre las subunidades α y β .

Tabla 1. Principales fármacos ansiolíticos con acción sobre GABA

Nombre	Función	Mecanismo	Sitio de union
Fenobarbital	Ansiolítico, sedante y anticonvulsivo	Modulador alostérico positivo	$\alpha\beta$ $\gamma\beta$
Etomidato	Anestésico	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$
Propofol	Anestésico	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$
Flumazenil	Revierde sobredosis de benzodiazepinas	Antagonista alostérico	$\alpha\gamma$
Diazepam	Ansiedad, epilepsia e insomnio, sedante y anestésico	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$ $\gamma\beta$
Eszopiclona	Apnea del sueño, insomnio y adicciones	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$ $\gamma\beta$
Zolpidem	Síndrome de abstinencia, trastorno de atención, hiperactividad, ansiedad, insomnio, trastornos depresivos, esquizofrenia y demencia	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$ $\gamma\beta$
Brexanolona	Alzheimer, alcoholismo, depresión y epilepsia	Modulador alostérico positivo	
Nitrazepam	Epilepsia, ansiedad, depresión, esquizofrenia e insomnio	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$ $\gamma\beta$
Halazepam	Ansiedad	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$ $\gamma\beta$
Temazepam	Insomnio, esquizofrenia, depresión, demencia, ansiedad y enfermedad obstructiva crónica	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$ $\gamma\beta$
Clordiazepoxido	Alcoholismo, síndrome de abstinencia, ansiedad y depresión	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$ $\gamma\beta$
Zaleplon	Esquizofrenia, demencia, ansiedad, depresión e insomnio	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$ $\gamma\beta$
Triazolam	Depresión, ansiedad, esquizofrenia, demencia y abuso de sustancias	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$ $\gamma\beta$
Alprazolam	Esquizofrenia, depresión, demencia, ansiedad y epilepsia	Modulador alostérico positivo	$\beta\alpha$ $\gamma\beta$

6.2. Preparación de la proteína y ligandos para acoplamiento molecular

6.2.1. Selección y preparación de la proteína

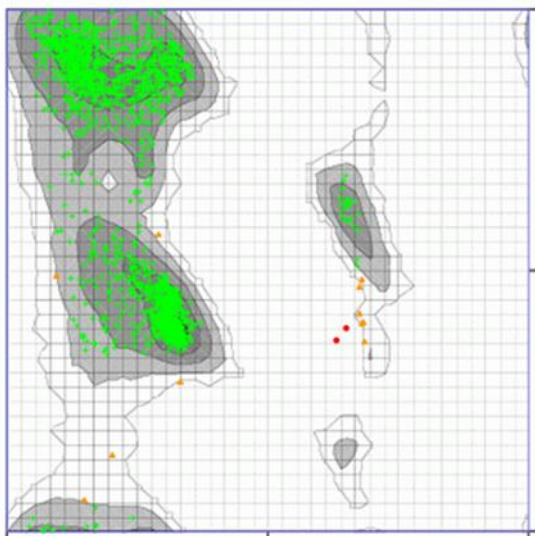
En la Tabla 2 se enlistan los códigos de las estructuras 3D del receptor GABA_A reportadas en *ProteinDataBank*, así como el ligando cocristalizado y la resolución de la estructura (Berman, 2000). Se observó que las proteínas reportadas, en su mayoría, no contienen la totalidad del receptor y al tratarse de una estructura muy grande la resolución suele ser superior a los 3 Å. No obstante, la estructura 6X3X tiene la mejor resolución y contiene la totalidad del receptor; además de que se encuentra cristalizada con el fármaco de referencia diazepam, siendo la mejor alternativa para realizar los estudios de acoplamiento molecular.

Tabla 2. Diferentes versiones de la proteína cristalizada

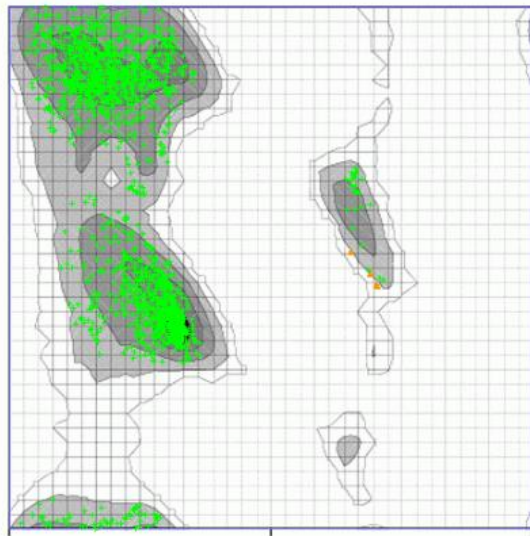
Código	Ligando	Cadena	Resolución
6D6U	Flumazenil	D	3.92
6D6T	Flumazenil	D	3.86
6HUK	Bicuculina	A, E	3.69
6HUP	Diazepam	B, D, E	3.58
6X3U	Flumazenil	D	3.50
6X3W	Fenobarbital	C, E	3.30
6HUO	Alprazolam	D	3.26
6HUG	Picrotoxina	C	3.10
6HUJ	Picrotoxina	A	3.04
6X3X	Diazepam	A, B, C, D, E	2.92
6X40	Picrotoxina	D	2.86
6X3T	Propofol	B, D	2.55

La proteína seleccionada (PDB: 6X3X) fue minimizada usando dos programas y se seleccionó la estructura generada con *Chimera*. En la Figura 2 se muestran los gráficos de Ramachandran para las estructuras minimizadas y la proteína original. Donde se puede comprobar que la estructura elegida no contiene aminoácidos (aa) en zonas desfavorables (rojo), 4 aa se encuentran en zonas medianamente favorables (naranja) y el resto de aa están en zonas permitidas (verde). Lo anterior indica que la estructura es óptima para los posteriores estudios de acoplamiento molecular.

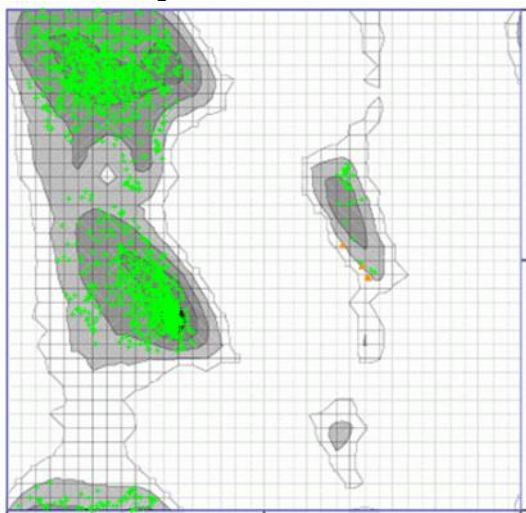
A Yasara



B Chimera



C Proteína original



Distribución de aa

Proteína minimizada con Yasara

Highly Preferred observations shown as GREEN Crosses: 1893 (99.318%)
Preferred observations shown as BROWN Triangles: 11 (0.577%)
Questionable observations shown as RED Circles: 2 (0.105%)

Proteína minimizada con Chimera

Highly Preferred observations shown as GREEN Crosses: 1902 (99.790%)
Preferred observations shown as BROWN Triangles: 4 (0.210%)
Questionable observations shown as RED Circles: 0 (0.000%)

Proteína original

Highly Preferred observations shown as GREEN Crosses: 1902 (99.790%)
Preferred observations shown as BROWN Triangles: 4 (0.210%)
Questionable observations shown as RED Circles: 0 (0.000%)

Figura 2. Gráficos de Ramachandran para la proteína procesada en Yasara (**A**), Chimera (**B**) y sin procesar (**C**).

6.3. Estudios de acoplamiento molecular

El complejo cristalizado GABA_A-diazepam reporta cuatro posibles sitios de unión: el sitio extracelular α - γ y tres sitios transmembranales, dos entre β - α y uno más en γ - β , como se observa en la Figura 3. Esto se debe a la estructura pentamérica del receptor GABA_A y al ligando no selectivo entre subunidades.

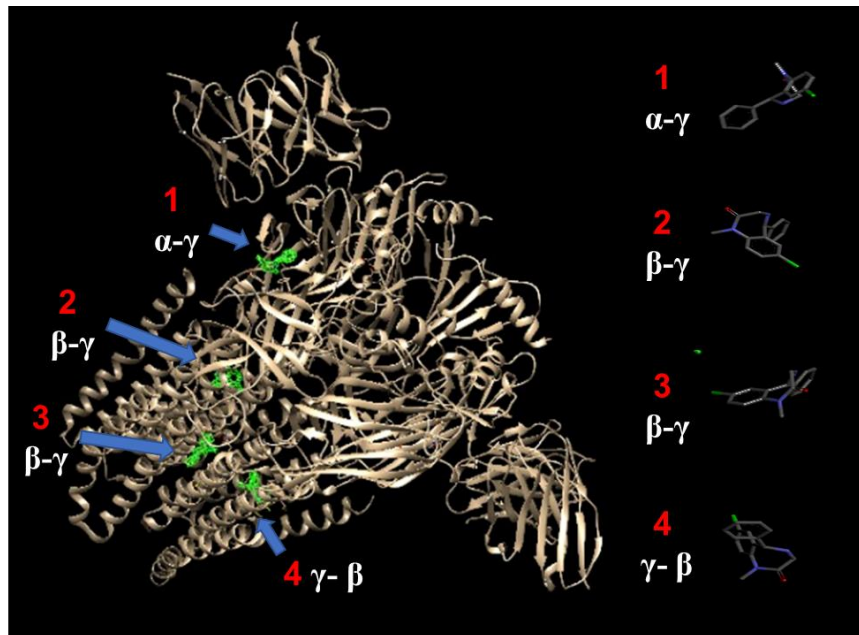


Figura 3. Sitios de unión del diazepam en el receptor GABA_A.

Por lo anterior, fue necesario realizar un estudio “ciego” de acoplamiento molecular, para identificar el sitio de unión más probable, usando *autodock vina* variando el número de exhaustivos. Como resultado se generaron múltiples conformaciones que fueron agrupadas según el sitio de unión, valor de RMSD (acoplado vs cristalizado) y energía de unión (ΔG).

Los resultados de acoplamiento “ciego” se describen en la Tabla 3, donde se puede observar que los sitios 1 (α - γ) y 4 (γ - β) tuvieron el mayor número de conformaciones, pero el sitio 1 (α - γ) fue el más frecuente para el ligando diazepam. Por otro lado, un estudio previo reporta la unión del fenobarbital y otras benzodiazepinas al sitio 4 (γ - β) identificándolo a este como un sitio que contribuye a la estabilidad del dominio transmembranal y favorece la unión de benzodiazepinas a su sitio clásico (Kim et al., 2020). No obstante, se seleccionó el sitio 1 para realizar los estudios posteriores dado que se reconoce como el sitio principal de las benzodiazepinas.

Tabla 3. Resultados de acoplamiento molecular ciego sobre GABA_A

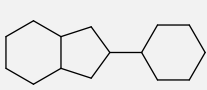
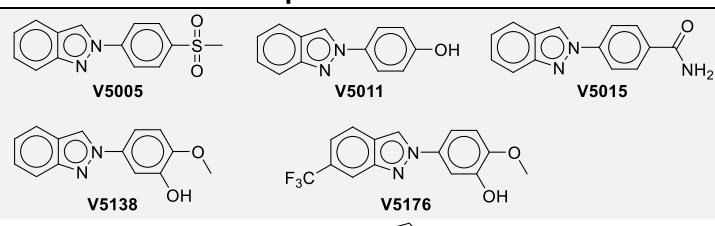
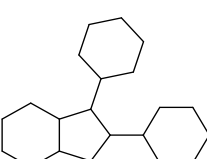
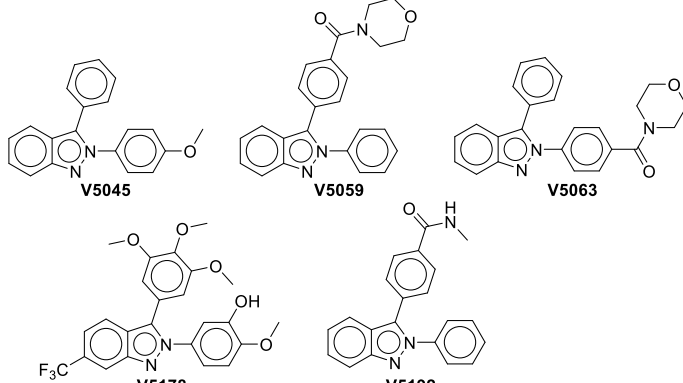
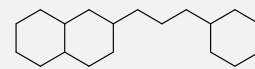
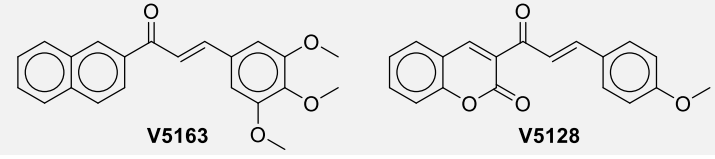
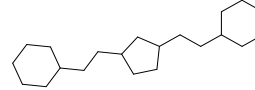
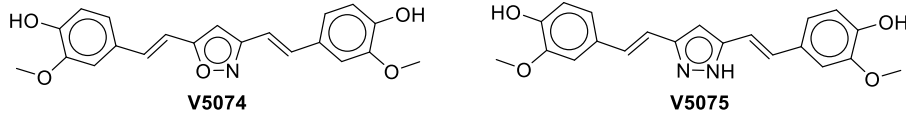
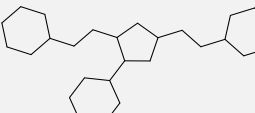
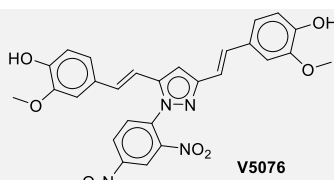
Sitio de union	Ciclos	Modo de union	RMSD	Energía de union (ΔG)
Sitio 1 (α - γ)	8	1	0.574	-9.6
	25	1	0.530	-10.3
		2	1.947	-8.5
	50	1	0.528	-10.3
		2	0.674	-10.2
		3	1.249	-9.5
		4	2.107	-8.3
	100	1	1.181	-10.3
		2	0.643	-10.2
		3	1.823	-9.0
250	1	1.253	-10.3	
	2	0.648	-10.3	
		3	1.465	-9.3
Sitio 2 (β - γ)	8	1	0.937	-9.6
	25	1	0.958	-9.6
	50	1	0.926	-9.6
	100	1	0.955	-9.6
	250	1	0.935	-9.6
Sitio 3 (β - γ)	8	-	-	-
	25	-	-	-
	50	-	-	-
	100	-	-	-
	250	-	-	-
Sitio 4 (γ - β)	8	1	0.577	-9.9
	25	2	0.757	-8.8
		1	0.337	-9.9
	50	1	0.329	-9.9
		2	1.155	-9.8
	100	6	2.163	-7.6
		1	0.331	-9.9
		1	0.358	-9.9
250	2	1.165	-9.8	
	3	0.681	-9.8	

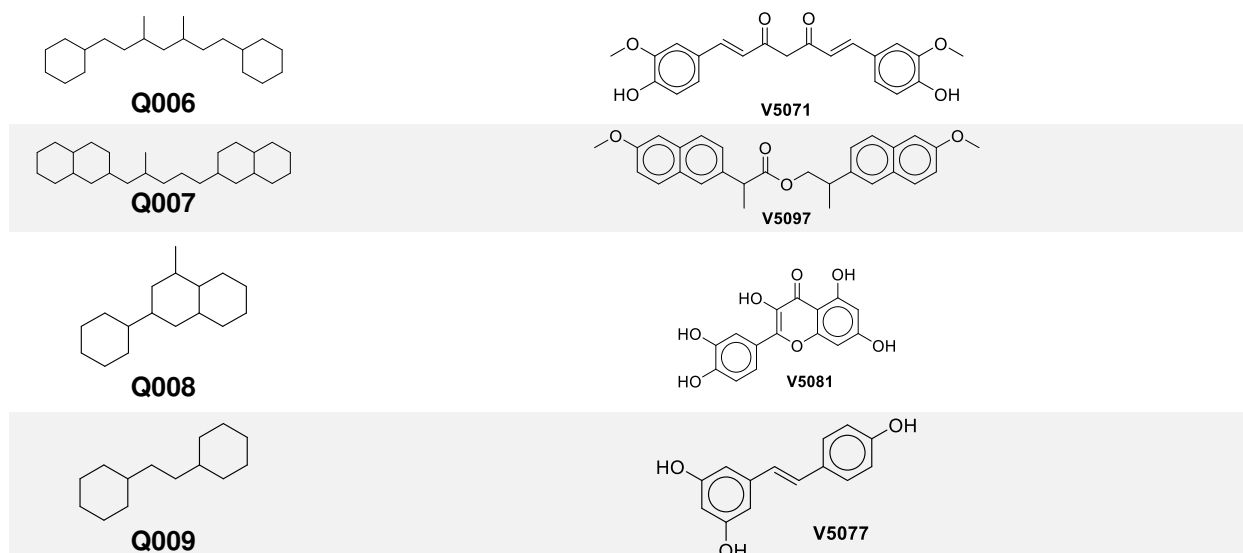
Finalmente, para establecer las condiciones de análisis se analizaron los resultados de acoplamiento para el ligante cristalizado variando el número de repeticiones y se calculó el valor de RMSD (sitio 1, Tabla 3). Particularmente, se observó un incremento en el valor de RMSD a mayor número de ciclos, y el mejor resultado se observó a 50 ciclos (RMSD 0.528). Mientras que las energías de unión se mantienen casi constantes (-10.3 kcal/mol). De acuerdo, con estos datos se estableció el número de exhaustivos en 50 para estudios posteriores. Cabe resaltar que para *autodock* 4.2 y GOLD se usaron las condiciones estándar de cada programa.

6.4. Selección de ligandos potencialmente activos sobre el receptor GABA_A

Se analizaron las 208 moléculas de la quimioteca y se recuperó el modo de unión con mejor puntaje de cada molécula. Posteriormente, se realizó el consenso de los resultados obtenidos, previa una normalización de los datos, y posterior filtrado para identificar las moléculas con mejores puntajes en los tres programas. De este procesamiento se identificaron 19 compuestos como potenciales inhibidores de GABA_A (valores normalizados en la Tabla 1A, Anexo). En la Tabla 4 se detallan las estructuras de los compuestos seleccionados, los cuales fueron agrupados según su quimiotipo.

Tabla 4. Compuestos seleccionados por cribado virtual agrupados por quimiotipos

Quimiotipo	Compuestos selectos
 <p>Q001</p>	 <p>V5005 V5011 V5015 V5138 V5176</p>
 <p>Q002</p>	 <p>V5045 V5059 V5063 V5178 V5192</p>
 <p>Q003</p>	 <p>V5163 V5128</p>
 <p>Q004</p>	 <p>V5074 V5075</p>
 <p>Q005</p>	 <p>V5076</p>



A partir del análisis de las moléculas seleccionadas y sus quimiotipos (esqueleto), se encontró que el quimiotipo **Q001** fue el más frecuente y este tiene similitud con el quimiotipo de las benzodiazepinas (Figura 4A y 4B). Por otro lado, en un estudio clínico en fase 2, se evaluó la modulación selectiva del receptor GABA_A usando el fármaco Zolpidem (Figura 4C) con resultados positivos en el tratamiento de la esquizofrenia (Lewis et al., 2008). Este fármaco posee un núcleo imidazo[1,2-*a*]piridina, el cual es un isómero de indazol y es el núcleo predominante en los compuestos seleccionados por cribado virtual. Esto podría ser un indicio del potencial efecto sobre GABA_A por el principio de similitud-propiedad.

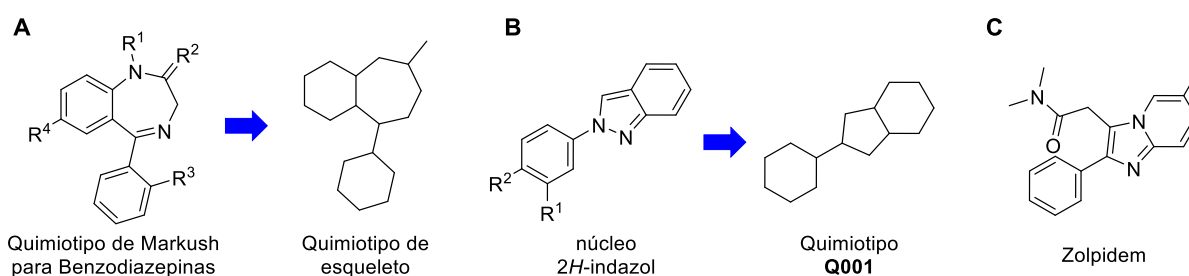


Figura 4. Comparación de quimiotipos y núcleos. **A** Quimiotipo de benzodiazepinas; **B** Quimiotipo predominante en el estudio de acoplamiento molecular; **C** Zolpidem, fármaco modelo contra esquizofrenia.

6.4.1. Análisis de interacciones ligando-receptor

Se realizó un análisis de las interacciones observadas entre la benzodiazepina cristalizada (BZP) y el receptor GABA en el sitio de unión. Las interacciones observadas y descritas en la literatura fueron tomadas como referencia para evaluar a los ligandos

seleccionados por cribado virtual, con la finalidad de conocer si estos compuestos presentan interacciones similares al fármaco de referencia, en cuanto a número y tipo de interacción pese a tener núcleos distintos.

En la Tabla 5 se muestran las interacciones ligando-receptor observadas para BZP y los compuestos seleccionados en los tres programas. De manera particular, para BZP se encontró un patrón de interacción similar en los tres programas, observando un total de 13 interacciones, donde predominan las interacciones de Van der Waals, interacciones π - π e interacciones π -alquil.

Por su parte, los compuestos evaluados presentaron la mayoría de las interacciones encontradas para BZP y se observaron hasta 17 interacciones adicionales predominando las interacciones de Van der Waals y π -alquil. El análisis de las interacciones reveló que la gran mayoría de los compuestos tienen alta similitud en el patrón de interacciones; particularmente los compuestos **V5015**, **V5059**, **V5074**, **V5075** y **V5097** presentaron 11 de las 13 interacciones observadas para BZP y 6 interacciones adicionales, teniendo un total de 17 interacciones en el sitio de unión (2 de 3 coincidencias para considerarse interacción). En contraste los compuestos **V5076**, **V5063** y **V5192** presentaron el menor número de interacciones con 8 de 13 interacciones posibles para BZP. Cabe destacar, que algunas estructuras interactuaron de manera similar al ligando BZD y al comparar las energías de unión, que si bien son energías altas, algunas de ellas provenían de interacciones completamente distintas a las observadas para la referencia.

6.4.2. Predicción de actividad biológica usando *PASSonline*

Se determinaron por predicción *in silico* las potenciales actividades relacionadas con trastornos de ansiedad y/o actividades indeseadas de las moléculas seleccionadas por cribado virtual. Para ello, se sometieron a un análisis en la plataforma *PASSonline*, la cual realizó una búsqueda por similitud de las moléculas con reportes en la literatura y determinó la probabilidad de actividad o inactividad sobre distintas dianas de interés clínico. En la Tabla 6 se resumen los resultados de la predicción de actividad para las moléculas seleccionadas.

Tabla 6. Predicción de actividad biológica de las moléculas selectas en *PASSonline*

ID	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	Actividad biológica
V5015	0.732	0.062	Tratamiento de los desórdenes fóbicos
V5059	0.738	0.059	Tratamiento de trastornos fóbicos
	0.555	0.021	Tratamiento contra las enfermedades neurodegenerativas
V5063	0.738	0.059	Tratamiento de trastornos fóbicos
	0.555	0.021	Tratamiento contra las enfermedades neurodegenerativas
V5076	0.585	0.043	Tratamiento de trastornos neurológicos agudos
V5192	0.788	0.038	Tratamiento de los trastornos fóbicos
	0.624	0.063	Antineurótico

De acuerdo con lo anterior, las moléculas **V5015**, **V5059**, **V5063**, **V5192** tienen una alta probabilidad de actividad como tratamiento a los trastornos fóbicos ($P_a > 0.7$), por lo que podrían ser buenos fármacos contra los trastornos de ansiedad. Ya que como ha sido descrito en este mismo trabajo, los trastornos fóbicos son también trastornos de ansiedad. Además, se ha evidenciado que en enfermedades neurodegenerativas los altos niveles de ansiedad son un síntoma (Ahunca Velásquez, 2017) y su tratamiento forma parte de la terapia farmacológica, por lo que los ansiolíticos y en general los antipsicóticos son usados en el tratamiento de este grupo de enfermedades. En ningún caso se presentó una predicción alta para actividades relacionadas con alta toxicidad. Finalmente, para los compuestos **V5074**, **V5075** y **V5097** no se encontró probabilidad de actividades relacionadas con trastornos de ansiedad.

Los resultados anteriores indican que las moléculas con núcleo 2-fenil-2*H*-indazol tienen una alta probabilidad de presentar actividad como antipsicóticos, lo cual es consistente

con lo reportado por Ji y colaboradores (Ji, et al., 2019) quienes remplazaron el núcleo indol en moléculas probadas sobre los receptores cannabinoides (CB), por un núcleo indazol y entre los hallazgos reportaron cambios en la selectividad y potencia, aumentando significativamente la selectividad. Además, se ha descrito la importancia de los receptores CB1 como reguladores en la liberación de neurotransmisores como GABA y glutamina, ambos con una clara implicación en las respuestas ansiogénicas y ansiolíticas (Rey et al., 2012).

6.4.3. Predicción de perfil ADMET usando la plataforma SwissADME

Continuando con los ensayos *in silico*, se determinó el perfil ADME y toxicidad de las moléculas seleccionadas, empleando diversos criterios como las reglas de Lipinski, Benk, PAINS, entre otros. Estos criterios sirven de como referencia para conocer el potencial de estas moléculas como fármacos.

Una de las reglas más utilizadas son las denominadas reglas de Lipinski, que constan de cuatro criterios que permiten clasificar a las moléculas como buenos candidatos a fármaco administrados por vía oral, según el cumplimiento de estos criterios, comúnmente se considera óptimo hasta dos incumplimientos (Lipinski et al., 2001). Los cuatro criterios son:

1. No tener más de cinco donadores de enlaces por puentes de hidrógeno
2. No contener más de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno
3. Masa molecular inferior a 500 g/mol
4. Log P inferior a 5

Por otro lado, las alertas PAINS y Brenk son alertas estructurales que estos ayudan a la identificación de compuestos que contienen fragmentos identificados como inestables, tóxicos o con farmacocinética deficiente (Baell & Holloway, 2010; Brenk, 2008). Finalmente, el parámetro de *leadlikeness* se refiere al parecido con los fármacos líderes. Este se define por límites fisicoquímicos de una estructura que al ser modificada estructuralmente podría resultar en una estructura optimizada. Para ello emplea tres parámetros: peso molecular < 350 uma, Log P ≤ 3.5 y enlaces rotables < 7 (Teague, 1999).

En la Tabla 7 se describen los parámetros determinados para los compuestos seleccionados por cribado virtual. De manera general, la mayoría de los compuestos cumplen con los criterios utilizados y podrían considerarse compuestos con buen perfil farmacológico. No obstante, el compuesto **V5076** es la única molécula que posee dos violaciones a la regla de Lipinski (peso molecular > 500 uma y un exceso de átomos aceptores de puentes de hidrógeno), posee dos alertas de Break y tres violaciones a los parámetros de *leadlikeness*, por lo que no sería un buen candidato a fármaco. Adicionalmente, las moléculas **V5097** y **V5081** también presentaron algunas violaciones y alertas; sin embargo, no se descartan como buenos prospectos a fármacos.

Tabla 7. Perfil ADMET de los compuestos seleccionados por cribado virtual

ID	Lipófila Log P	Solubilidad Log S	Absorción GI	Permeabilidad BBB	Sustrato PGP	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	Log K _p (cm/s)	Lipinski	Alerta PAINS	Alerta Brenk	Leadlikeness	Complejidad sintética
V5005	2.46	-3.54	+	+	-	+	+	-	-	-	-6.21	+	0	0	+	2.05
V5011	2.41	-3.58	+	+	-	+	+	-	-	-	-5.54	+	0	0	1	1.69
V5015	1.95	-3.12	+	+	-	+	-	-	-	-	-6.52	+	0	0	1	1.63
V5045	2.84	-3.75	+	+	-	+	+	-	-	-	-5.19	+	0	0	1	1.58
V5059	3.66	-5.00	+	+	+	+	+	+	+	+	-5.81	+	0	0	2	2.79
V5063	2.98	-5.00	+	+	+	+	+	+	+	+	-5.81	+	0	0	2	2.77
V5071	3.03	-3.94	+	-	-	-	-	+	-	+	-6.28	+	0	2	2	2.97
V5074	3.60	-4.83	+	-	-	-	-	+	-	-	-5.54	+	0	0	2	3.53
V5075	3.60	-4.83	+	-	-	-	-	+	-	-	-5.54	+	0	0	2	3.53
V5076	3.17	-6.37	-	-	-	-	+	+	-	+	-5.71	2	0	2	3	4.11
V5077	2.48	-3.62	+	+	-	+	-	+	-	+	-5.47	+	0	1	1	2.02
V5081	1.23	-3.16	+	-	-	+	-	-	+	+	-7.05	+	1	1	+	3.23
V5097	5.84	-6.62	+	-	+	-	+	-	+	+	-4.19	1	0	0	3	3.52
V5128	3.40	-4.42	+	+	-	+	+	+	-	-	-5.43	+	0	2	1	3.3
V5138	2.45	-3.61	+	+	-	+	+	-	+	+	-5.74	+	0	0	1	2
V5163	4.27	-5.11	+	+	-	+	+	+	-	+	-4.98	+	0	1	1	3.04
V5176	3.49	-4.41	+	+	-	+	+	-	+	-	-5.53	+	0	0	1	2.12
V5178	4.47	-6.12	-	-	-	+	+	+	+	-	-5.42	+	0	0	2	3.31
V5192	3.68	-4.85	+	+	-	+	+	+	+	+	5.34	+	0	0	1	2.41
V5196	2.03	-2.96	+	+	-	+	-	-	-	-	-6.04	+	0	0	1	1.77

Por otro lado, es importante mencionar que las moléculas seleccionadas tienen alta probabilidad de cruzar barrera gastrointestinal (GI) e incluso algunas de ellas barrera hematoencefálica (BBB), lo cual es prometedor dado la utilidad que estamos

proponiendo. En cuanto a su metabolismo, se identificaron solo algunas como inhibidores de los citocromos P450 (CYP) y sustrato de la glicoproteína-P (PGP).

6.5. Diseño y evaluación *in silico* de nuevos inhibidores de GABA_A

A partir de las estructuras de las moléculas seleccionadas por cribado virtual y las benzodiazepinas se propusieron siete nuevas estructuras como inhibidores de GABA_A, sus estructuras se muestran en la Figura 5, a las cuales se les realizaron estudios de acoplamiento molecular en *autodock vina*.

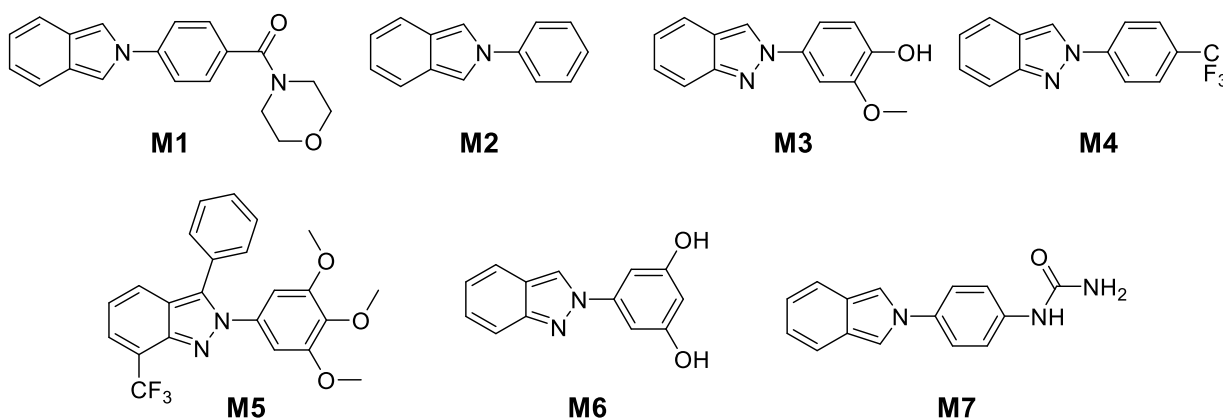














Figura 5. Estructuras de los compuestos propuestos como inhibidores GABA_A.

En la Tabla 8 se resumen los resultados de los estudios de acoplamiento, en los que podemos observar energías de unión en su mayoría superiores a la obtenida para BDZ. Adicionalmente, se realizó el análisis de interacciones ligando-receptor para los compuestos **M1–7** encontrando que estos presentan interacciones con los aminoácidos del sitio de unión entre 9–12 de las 13 interacciones descritas para DBZ, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en los estudios de acoplamiento molecular. De manera particular, la molécula **M5** presenta el mayor número de interacciones (12 de las 13 posibles), y obtuvo la mejor energía de unión, siendo la mejor candidata para obtenerla por síntesis química.

Tabla 8. Interacciones ligando-receptor observadas para las moléculas propuestas

Ligando	DZP	DZP V	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
E de unión vina	-8.5	-10.3	-10	-8.5	-8.6	-9.2	-10.1	-8.5	-9.7
PHE 100									
PHE 77									
TYR 160									
TYR 210									
VAL 203									
SER 159									
ALA 161									
ASN 60									
SER 206									
TYR 58									
GLN 204									
SER 205									
HIS 102									
MET 130									
THR 142									
THR 207									
LYS 156									
ASP 192									

Código de color

	Van de Waals		Pi-Pi		Pi catión
	Puentes de hidrógeno		Pi- Alquil		Donante-Donante
	Carbono-Hidrógeno		Pi Sulfuro		Par Pi
	Halógeno		Pi sigma		No interacción

En cuanto al perfil farmacológico, se determinaron distintos descriptores de interés farmacéutico en la plataforma *swissADME*. En la Tabla 9 resumen los resultados para las moléculas **M1–7**, en esta se puede observar que ninguna de las moléculas propuestas viola los criterios de Lipinski o alguna alerta estructural. Además, todas presentan un buen perfil farmacocinético teniendo buena absorción gastrointestinal (GI) y cruce de la barrera hematoencefálica (BBB), lo cual sería favorecedor dado el efecto buscado; solo el compuesto **M5** no cumple con el perfil deseado, lo que lo hace un mal candidato. Por otro lado, las moléculas propuestas se muestran como potenciales inhibidores de los distintos CYP450 y algunos de ellos como sustrato de la proteína G (PGP). Finalmente, todos los compuestos muestran factibilidad sintética al obtener una puntuación de 3.22 o menor.

Tabla 9. Perfil ADME y toxicidad calculada para las moléculas propuestas

ID	Lipófila Log P	Solubilidad Log S	Absorción GI	Permeabilidad BBB	Sustrato PGP	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	Log K _p (cm/s)	Lipinski	Alerta PAINS	Alerta Brenk	Leadlikeness	Complejidad sintética
M1	2.7	-3.7	+	+	+	+	+	+	+	+	-6.28	+	0	0	+	1.95
M2	2.43	-3.29	+	+	+	+	+	-	+	+	-5.71	+	0	0	1	1.52
M3	2.42	-3.61	+	+	-	+	+	-	+	+	-5.74	+	0	0	1	2.1
M4	3.88	-4.51	+	+	-	+	+	-	-	-	-4.98	+	0	0	1	1.7
M5	5.05	-6.19	-	-	+	+	+	+	+	+	-4.87	+	0	0	2	3.22
M6	2	-3.42	+	+	-	+	-	-	+	-	-5.89	+	0	0	1	1.88
M7	1.74	-2.94	+	+	+	+	-	-	-	-	-6.54	+	0	0	+	1.84

Adicionalmente, se analizaron las potenciales blancos terapéuticos en la plataforma *PASSonline* para las moléculas propuestas (Tabla 10), encontrando buenos resultados al encontrar coincidencias sobre blancos relacionados teniendo probabilidades (P_a) mayores al 0.543, además, no se encontró ninguna potencial actividad indeseada.

Tabla 10. Predicción de actividad biológica de las moléculas **M1–10**.

ID	P_a	P_i	Actividad biológica
M1	0.743	0.037	Tratamiento de los desórdenes fóbicos
M2	0.555	0.059	Tratamiento de trastornos fóbicos
M4	0.543	0.020	Tratamiento de los trastornos fóbicos
	0.555	0.018	Tratamiento contra las enfermedades neurodegenerativas
M6	0.735	0.043	Tratamiento de los trastornos fóbicos
M7	0.631	0.023	Tratamiento de los trastornos fóbicos

Finalmente, al analizar las moléculas propuestas, encontramos que M1, M2, M4, M6 y M7 tienen probabilidad de actividad como tratamiento a los trastornos fóbicos, por lo que podrían ser buenos fármacos contra los trastornos de ansiedad

7. Conclusiones

Mediante el uso de los programas *autodock 4.2*, *autodock vina* y *Gold* se realizaron estudios de acoplamiento molecular, obteniendo resultados similares entre *autodock 4.2* y *autodock vina*, que en conjunto con el análisis de las interacciones ligando-receptor permitieron seleccionar 19 compuestos de la quimioteca N018, destacando **V5015**, **V5059**, **V5063** y **V5192**, como los mejores candidatos para presentar actividad inhibitoria sobre GABA_A. Cabe resaltar, que el núcleo 2-fenil-2*H*-indazol está presente en siete de las ocho moléculas candidato, lo que sugiere ampliar el estudio de esta estructura y algunos posibles derivados como inhibidores de GABA_A.

El diseño de nuevos inhibidores de GABA_A por hibridación y su evaluación *in silico* permitió identificar al compuesto **M6** como candidato prometedor para ser sintetizado y evaluado *in vitro*.

8. Referencias

- Afriza, D., Suriyah, W. H., & Ichwan, S. J. A. (2018). In silico analysis of molecular interactions between the anti-apoptotic protein survivin and dentatin, nordentatin, and quercetin. *Journal of Physics: Conference Series*, 1073, 032001. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1073/3/032001>
- Ahunca Velásquez, L. F. (2017). Más allá del deterioro cognitivo: síntomas neuropsiquiátricos en demencias neurodegenerativas. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 46, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.rcp.2017.05.006>
- Alamri, M. A. (2019). Pharmacophore and docking-based sequential virtual screening for the identification of novel Sigma 1 receptor ligands. *Bioinformation*, 15(8), 586–595. <https://doi.org/10.6026/97320630015586>
- Almokhtar, A., Jbireal, J. M., & Elsayed, A. (2019). Anxiety: Insights into Signs, Symptoms, Etiology, Pathophysiology, and Treatment. *East African Scholars Journal of Medical Sciences*, 2(10), 580–591.
- Baell, J. B., & Holloway, G. A. (2010). New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(7), 2719–2740. <https://doi.org/10.1021/jm901137j>
- Ballón Paucara, W. G., & Grados Torrez, R. E. (2019). Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista Con-Ciencia*, 7(2), 55-72.
- Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I., Frearson, J., & Wyatt, P. (2008). Lessons Learnt from Assembling Screening Libraries for Drug Discovery for Neglected Diseases. *ChemMedChem*, 3(3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>
- Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chen, L., Crichlow, G. V., Christie, C. H., Dalenberg, K., di Costanzo, L., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Ganesan, S., Goodsell, D. S., Ghosh, S., Green, R. K., Guranović, V., Guzenko, D., Hudson, B. P., Zhuravleva, M. (2020). RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D437-D451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1038>
- Campagne, D. M., & García Campayo, J. (2005). El inadecuado uso de las benzodiazepinas. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 31(7), 319-324.
- Canadian Mental Health Association, BC Division. (2015). *What's the difference between anxiety and an anxiety disorder?* Disponible en: <https://www.heretohelp.bc.ca/q-and-a/whats-the-difference-between-anxiety-and-an-anxiety-disorder>
- Carugo, O., & Djinović-Carugo, K. (2013). Half a century of Ramachandran plots. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 69(8), 1333–1341. <https://doi.org/10.1107/s090744491301158x>
- Charney, D., Mihic, S., & Harris, R. (2007). Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica. En Capítulo 17: Hipnóticos y sedantes (11.a ed., pp. 823-844). CDMX, México: McGRAW HILL.
- Craske, M. G., Rauch, S. L., Ursano, R., Prenoveau, J., Pine, D. S., & Zinbarg, R. E. (2009). What is an anxiety disorder? *Depression and Anxiety*, 26(12), 1066–1085. <https://doi.org/10.1002/da.20633>
- Cuanalo Contreras, L. K., Merino Contreras, S. A., & Scior, T. (2011). ¿Qué sabe Ud. acerca de Cribado Virtual? *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42(2), 54-55.

Davies M, Nowotka M, Papadatos G, Dedman N, Gaulton A, Atkinson F, Bellis L, Overington J. P. (2015) ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic Acids Research*; 43(W1), W612-20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv352>

Dodge, Y., Cox, D., Commenges, D., Davison, A., Solomon, P., & Wilson, S. (2006). *The Oxford Dictionary of Statistical Terms* (6th ed.). Oxford University Press, USA.

Farach, F. J., Pruitt, L. D., Jun, J. J., Jerud, A. B., Zoellner, L. A., & Roy-Byrne, P. P. (2012). Pharmacological treatment of anxiety disorders: Current treatments and future directions. *Journal of Anxiety Disorders*, 26(8), 833–843. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2012.07.009>

Gauthier, I., & Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 165. <https://doi.org/10.2147/ndt.s58841>

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). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>

Jabbarzadeh, P., Ismail, P., & Ling, K. H. (2018). Molecular Docking - An easy protocol v1 [online]. *protocols.io*. Disponible en: <https://doi.org/10.17504/protocols.io.m2dc8a6>

Jansen, M. (2019). An in-depth structural view of a GABAA brain receptor. *Nature*, 565(7740), 436-438.

Jembrek, M., & Vlainic, J. (2015). GABA Receptors: Pharmacological Potential and Pitfalls. *Current Pharmaceutical Design*, 21(34), 4943-4959.

Ji, Y. Y., Wang, Z. L., Pei, F. N., Shi, J. J., Li, J. J., Gunosewoyo, H., Yang, F., Tang, J., Xie, X., & Yu, L. F. (2019). Introducing nitrogen atoms to amidoalkylindoles: potent and selective cannabinoid type 2 receptor agonists with improved aqueous solubility. *MedChemComm*, 10(12), 2131–2139. <https://doi.org/10.1039/c9md00411d>

Kim, J. J., Gharpure, A., Teng, J., Zhuang, Y., Howard, R. J., Zhu, S., Noviello, C. M., Walsh, R. M., Lindahl, E., & Hibbs, R. E. (2020). Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature*, 585(7824), 303–308. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2654-5>

Lagunin, A., Stepanchikova, A., Filimonov, D., & Poroikov, V. (2000). PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. *Bioinformatics*, 16(8), 747–748. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.8.747>

Lewis, D. A., Cho, R. Y., Carter, C. S., Eklund, K., Forster, S., Kelly, M. A., & Montrose, D. (2008). Subunit-Selective Modulation of GABA Type A Receptor Neurotransmission and Cognition in Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 165(12), 1585–1593. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.08030395>

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. *Advanced Drug Delivery Reviews* 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)

López-López, E., Naveja, J. J., & Medina-Franco, J. L. (2019). DataWarrior: an evaluation of the open-source drug discovery tool. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(4), 335–341. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1581170>

Martin, M. L., G. Bowery, N., & M.J. Dunn, S. (2019). GABA Receptors. Disponible en: <https://resources.tocris.com/pdfs/literature/reviews/gaba-review-2019-web>

Munir, S., Gondal, A. Z., & Takov, V. (2019). Generalized anxiety disorder. *StatPearls*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441870/>

Navarro, J. F. (2010). Papel de las subunidades alfa del receptor gaba-a en la regulación de la conducta agresiva. Disponible en <http://psiqu.com/1-938>.

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2020). *Los servicios de salud mental se están viendo perturbados por la COVID-19 en la mayoría de los países, según un estudio de la OMS*. Acceso: 28 de septiembre de 2021. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/05-10-2020-covid-19-disrupting-mental-health-services-in-most-countries-who-survey>

Osman, D. A., Macías, M. A., Al-Wahaibi, L. H., Al-Shaalan, N. H., Zondag, L. S., Joubert, J., Garcia-Granda, S., & El-Emam, A. A. (2021). Structural Insights and Docking Analysis of Adamantane-Linked 1,2,4-Triazole Derivatives as Potential 11 β -HSD1 Inhibitors. *Molecules*, 26(17), 5335. <https://doi.org/10.3390/molecules26175335>

Papadatos, G., & Overington, J. P. (2014). The ChEMBL database: a taster for medicinal chemists. *Future Medicinal Chemistry*, 6(4), 361–364. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.8>

Prieto Martínez, F., & Medina-Franco, J. L. (2018). Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2), 125–134. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.6>

Prieto-Martínez, F., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2018). Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>

Rabelo, V. (2018). Re: How to calculate RMSD value in molecular docking?. Retrieved from: https://www.researchgate.net/post/How_to_calculate_RMSD_value_in_molecular_docking/5bfe82226611235a7e3a1d2d/citation/download.

Read, R., Adams, P., Arendall, W., Brunger, A., Emsley, P., Joosten, R., Kleywegt, G., Krissinel, E., Lütke, T., Otwinowski, Z., Perrakis, A., Richardson, J., Sheffler, W., Smith, J., Tickle, I., Vriend, G., & Zwart, P. (2011). A New Generation of Crystallographic Validation Tools for the Protein Data Bank. *Structure*, 19(10), 1395–1412. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.08.006>

Rey, A. A., Purrio, M., Viveros, M. P., & Lutz, B. (2012). Biphasic Effects of Cannabinoids in Anxiety Responses: CB1 and GABAB Receptors in the Balance of GABAergic and Glutamatergic Neurotransmission. *Neuropsychopharmacology*, 37(12), 2624–2634. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.123>

Rosas-Gutiérrez, I., Simón-Arceo, K., & Mercado, F. (2013). Mecanismo celular y molecular de la adicción a benzodiazepinas. *Salud Mental*, 36(4), 325. <https://doi.org/10.17711/sm.0185-3325.2013.039>

Saldívar-González, F., Prieto Martínez, F. D., & Medina Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 28(1), 51-58.

Santos, C. B. R. D., Lobato, C. C., de Sousa, M. A. C., Macêdo, W. J. D. C., & Carvalho, J. C. T. (2014). Molecular Modeling: Origin, Fundamental Concepts and Applications Using Structure-Activity Relationship and Quantitative Structure-Activity Relationship. *Reviews in Theoretical Science*, 2(2), 91–115. <https://doi.org/10.1166/rits.2014.1016>

Seeliger, D., & de Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24(5), 417–422. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9352-6>

Boletín del Senado de la Republica. (2017). *14.3% de la población mexicana padece trastornos de ansiedad*. Gobierno de México. Disponible en: <http://comunicacion.senado.gob.mx/index.php/informacion/boletines/39699-14-3-de-la-poblacion-mexicana-padece-trastornos-de-ansiedad.html>

Sulfahri, A. R., Iskandar, I. W., & Wardhani, R. (2019). In silico approach of antidiabetic compounds from Caesalpinia crista seed through docking analysis and ADMET predictions. *Journal of Physics: Conference Series*, 1341(2), 022001. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1341/2/022001>

Tanwar, O., Deora, G. S., Tanwar, L., Kumar, G., Janardhan, S., Alam, M. M., Shaquiquzzaman, M., & Akhter, M. (2014). Novel hydrazine derivatives as selective DPP-IV inhibitors: findings from virtual screening and validation through molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Modeling*, 20(4). <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2118-7>

Teague, S.J., Davis, A.M., Leeson, P.D. and Oprea, T. (1999). The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(24), 3743-3748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19991216\)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U)

Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J., & Vivas Reyes, R. (2013). Método acoplado Autodock–PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Revista Colombiana de Química*. 42(1), 101-124. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v42n1/v42n1a07>.

Anexo A

Tabla 1A. Funciones de puntuación para las 20 moléculas seleccionadas por cribado virtual

ID	Vina	Autodock 4.2	Gold	Smiles
V5005	0.62962963	0.64906103	0.51791591	<chem>CS(c(cc1)ccc1-n1nc(cccc2)c2c1)(=O)=O</chem>
V5011	0.59259259	0.55399061	0.56449022	<chem>Oc(cc1)ccc1-n1nc(cccc2)c2c1</chem>
V5015	0.7037037	0.70539906	0.44024939	<chem>NC(c(cc1)ccc1-n1nc(cccc2)c2c1)=O</chem>
V5045	0.62962963	0.78051643	0.46944204	<chem>c1c(cccc2)c2nn1-c1cccc1</chem>
V5059	0.72222222	0.91079812	0.84579668	<chem>O=C(c(cc1)ccc1-c1c(cccc2)c2nn1-c1cccc1)N1CCOCC1</chem>
V5063	0.68518519	0.78873239	0.44013252	<chem>O=C(c(cc1)ccc1-n1nc(cccc2)c2c1-c1cccc1)N1CCOCC1</chem>
V5071	0.53703704	0.70422535	0.74283308	<chem>COc(cc(/C=C/C(CC(/C=C/c(cc1)cc(OC)c1O)=O)=O)cc1)c1O</chem>
V5074	0.7037037	0.63615024	0.81819008	<chem>COc(cc(/C=C/c1noc(/C=C/c(cc2)cc(OC)c2O)c1)cc1)c1O</chem>
V5075	0.72222222	0.46244132	0.95989419	<chem>COc(cc(/C=C/c1noc(/C=C/c(cc2)cc(OC)c2O)c1)cc1)c1O</chem>
V5076	0.87037037	0.93779343	0.82201887	<chem>COc(cc(/C=C/c1cc(/C=C/c(cc2)cc(OC)c2O)nn1-c(ccc([N+])([O-])=O)c1)c1[N+])([O-])=O)cc1)c1O</chem>
V5077	0.62962963	0.67018779	0.72871628	<chem>Oc1ccc(/C=C/c2cc(O)cc(O)c2)cc1</chem>
V5081	0.61111111	0.71830986	0.51374765	<chem>Oc(cc1O)cc(OC(c(cc2)cc(O)c2O)=C2O)c1C2=O</chem>
V5097	0.90740741	0.92723005	1	<chem>CC(COC(C(C)c(ccc1c2)cc1ccc2OC)=O)c(ccc1c2)cc1ccc2OC</chem>
V5128	0.7037037	0.81807512	0.65714169	<chem>COc1ccc(/C=C/C(C2=Cc(cccc3)c3OC2=O)=O)cc1</chem>
V5138	0.57407407	0.60798122	0.61074546	<chem>COc(ccc(-n1nc(cccc2)c2c1)c1)c1O</chem>
V5163	0.74074074	0.78051643	0.66786007	<chem>COc1cc(/C=C/C(c2cc3cccc3cc2)=O)cc(OC)c1OC</chem>
V5176	0.72222222	0.54107981	0.62618676	<chem>COc(ccc(-n1nc(cc(C(F)(F)F)cc2)c2c1)c1)c1O</chem>
V5178	0.66666667	0.78638498	0.54530176	<chem>COc(ccc(-n1nc(cc(C(F)(F)F)cc2)c2c1-c(cc1OC)cc(OC)c1OC)c1)c1O</chem>
V5192	0.72222222	0.85328639	0.57530135	<chem>CNC(c(cc1)ccc1-c1c(cccc2)c2nn1-c1cccc1)=O</chem>
V5196	0.48148148	0.60798122	0.43604032	<chem>Cc1cc(C)nn1-c(cc1)ccc1C(O)=O</chem>