

Capítulo 6. DISCUSIÓN

6.1 ESTUDIO SAR

Con base en los resultados obtenidos del estudio al farmacóforo realizado, es posible deducir que la afinidad y especificidad de los ligandos puede ser mejorada satisfaciendo las necesidades propias del sitio de unión de la MAP cinasa p38 α .

Nuestro estudio indica que las características de los ligandos están enfocadas principalmente a sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. Específicamente para la p38 α , los ligandos que puedan funcionar como inhibidores deben poseer las propiedades mínimas del farmacóforo ya reportado, esto involucra al anillo del imidazol, de la piridina y el fluorofenilo en sus respectivas posiciones. Las modificaciones que investigadores de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Tübingen realizaron a las moléculas, hacen evidentes las siguientes necesidades para los ligandos:

- En la posición 2 del anillo del imidazol se prefieren cadenas cortas para mejorar la afinidad (=S, -S-CH₃) . Pero a su vez, la presencia de cadenas largas con grupos aromáticos mejora de la misma manera la afinidad, esto es porque estos grupos funcionales tienen interacciones *stacking* con el aminoácido Tyr35, **ver Figura 6.1**

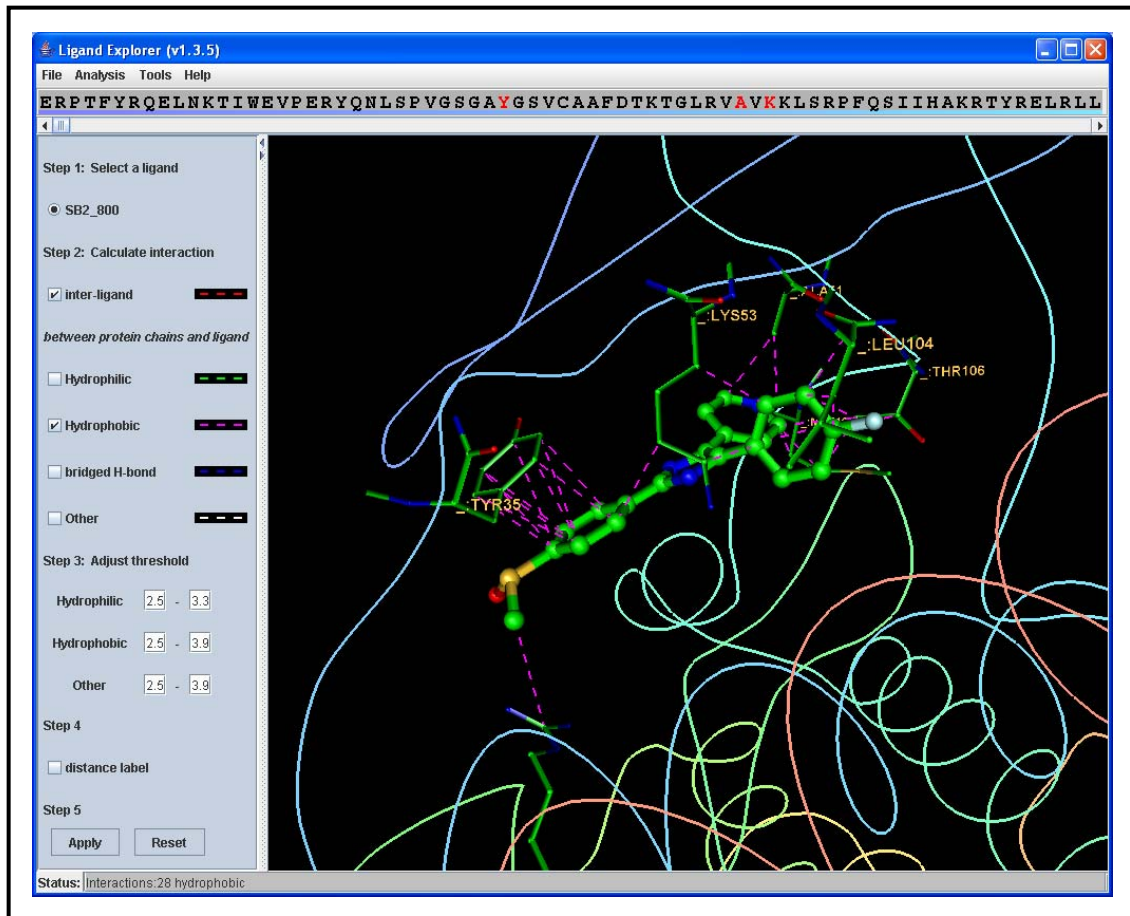


Figura 6.1. Interacciones de *stacking* en color morado con el aminoácido Tyr35 y el SB203580. Elaboración propia en pantalla de visualización de PDB.

- Por el contrario, en la posición 1 del imidazol se prefieren cadenas cortas. Sin embargo, se permiten si tiene sustituyentes de no más de cuatro carbonos, contienen un grupo metoxi al extremo y deben ser son flexibles.
- La molécula no debe tener en su estructura el grupo morfolina ni tampoco acetamida, ya que disminuye la actividad biológica.

- Se prefieren sustituyentes grandes lipofílicos y flexibles en la posición 2 de la piridina, para mejorar la actividad. En la **Figura 6.2** se puede observar la posible interacción que habría de los sustituyentes en esta posición con los aminoácidos (Ala157, Lys165, Ile166, Leu167) que son hidrofóbicos; necesitan ser flexibles para poder acomodarse e interactuar de una mejor manera que no desestabilice a toda la molécula.

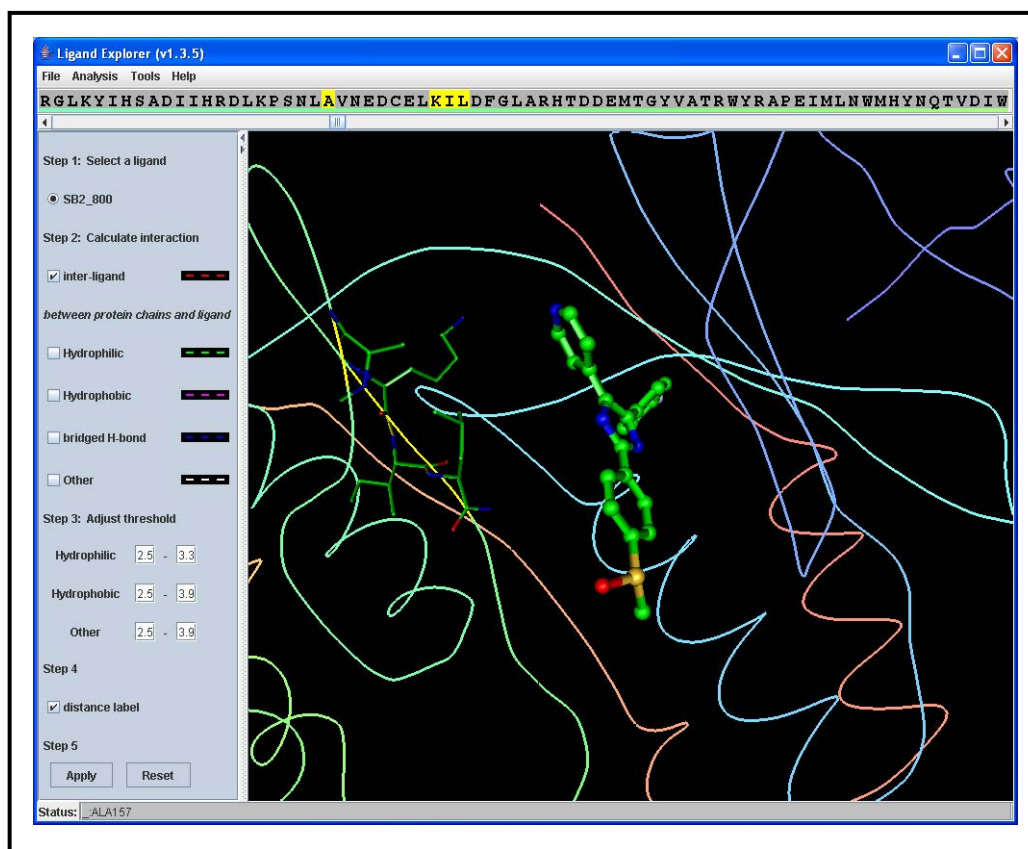


Figura 6.2 Interacción del ligando SB203580 con aminoácidos hidrofóbicos en el lado izquierdo. Elaboración propia en pantalla de visualización de PDB.

6.2 ESTUDIO QSAR

Según lo reportado por Scior en el año 2000, la cantidad de descriptores utilizados no deberá exceder 1/3 la cantidad de ligandos analizados. Es por esto que al utilizar 39 ligandos, excluyendo los 4 para la validación, se eligieron 13 descriptores. Es importante considerar el valor de R^2 ya que es el principal indicador de la precisión del modelo.

Utilizar el número máximo de descriptores, 13, y obtener el máximo valor de R^2 es trabajo fundamental del estudio QSAR.

La selección se hizo con base al estudio SAR definiendo las características más importantes de los ligandos; estos fueron la hidrofobicidad, la flexibilidad, el tamaño y posición de la moléculas, y la polaridad y cargas. Los descriptores elegidos detallan estas características.

Con base al estudio SAR se observó que muchos de los grupos que variaban entre los ligandos tenían átomos de oxígeno o nitrógeno, estos elementos influyen en los valores de pka de las moléculas, de tal manera que considerar el pka de las moléculas como descriptor es muy importante. Mientras realizábamos el estudio nos percatamos que al no considerar el pka, nuestro valor de R^2 disminuía hasta un valor de 0.58 lo que nos indica la gran influencia del descriptor y su importancia para incluirlo en el modelo predictivo final.

Como ya se mencionó, el número de átomos de oxígeno y de nitrógeno son importantes, sin embargo su conteo directo no representan una característica fundamental, mientras que el conteo de átomos de azufre si lo es.

Los ligandos varían mucho en sus dimensiones y con los resultados del estudio SAR realizado, descubrimos que la flexibilidad de estos grupos grandes, y la posición que puedan adoptar mejoran significativamente los valores de pIC₅₀, ver Anexo 1 con valores de pIC₅₀, por lo que descriptores que involucren la flexibilidad y el tamaño, como Kierflex, std_dim2 y chill_C, son importantes y están incluidos en el modelo predictivo final.

Las estructuras planares de los ligandos reflejaban que además de descriptores de tamaño era necesario evaluar el área de interacción entre el receptor y el ligando, y con más detalle el área polar de los ligandos. Los artículos reportados, como el de Wagner y Laufer de 2005, describen la importancia de mantener grupos hidrofóbicos en determinadas posiciones, mismas que fueron analizadas en el estudio SAR, por lo que la polaridad es importante bajo estos términos. De igual manera, interacciones con aminoácidos como el reportado en el mismo artículo, Met109, forma puentes de hidrógeno que evidentemente mejoran la especificidad del ligando con la MAPk p38 α .

La energía de solvatación es importante así como sus valores de pka, al no incluirlos en el modelo los valores de R² disminuyen drásticamente. Una vez determinada la importancia de utilizar a la polaridad como descriptor, se decidió utilizar polararea, que utiliza matrices matemáticas específicas para el cálculo de la relación distancia y polaridad.

El valor de R² obtenido (0.70078), indica que los descriptores utilizados determinan en un 70% la actividad inhibitoria de los ligandos. La validación confirmará la confiabilidad del modelo.

1.3 VALIDACIÓN

En el análisis de *Cross Validation* se aprecia que los valores calculados de pIC₅₀ mediante la ecuación, son semejantes a los obtenidos experimentalmente en Tübingen, ver Figura 5.1. Sin embargo es necesario realizar estudios que de manera cuantitativa nos indiquen si el modelo es válido o no.

Para tal efecto, los estudios de *Z Score* y χ^2 son útiles. El primero evalúa de la manera requerida el método *Cross Validation*, calculando valores de Z de los 39 ligandos involucrados en el modelo predictivo. El programa indica que no deben presentarse valores superiores a 2.5 ya que un valor mayor a éste se encuentra fuera del nivel de confianza del 90%. Es importante recordar que el porcentaje de nivel de confianza representa el área bajo la curva según tablas estadísticas establecida. Nuestros ligandos se encuentran en este rango. El segundo método, χ^2 , analiza los residuales es decir la diferencia entre el valor de pIC₅₀ obtenido experimentalmente en Tübingen y el valor de pIC₅₀ calculado con la ecuación. El valor de $\chi^2 = 0.2344382$ es un valor que encaja muy bien en el nivel de confianza de χ^2 de 95% con tres grados de libertad que tiene un intervalo de -7.81 a +7.8, por lo que los valores de las residuales parecen ser aceptables.

El análisis *Leave One Out* nos muestra gráficamente, ver Gráfico 5.3, los valores de pIC₅₀ obtenido experimentalmente en Tübingen y el valor de pIC₅₀ calculado con la ecuación para los 4 ligandos excluidos al azar por el método de sobres cerrados.

Se hizo un modelo con los 43 ligandos, incluyendo los mismo descriptores utilizados en el modelo final, para conocer la influencia de los 4 ligandos excluidos. El resultado fue un decremento en el valor de la R^2 , por que uno de estos ligandos se salía del rango establecido por el método de *Z Score*, es decir superaba el valor de 2.5 **ver Anexo 5**.