

Análisis *in silico* de los metabolitos secundarios del ajo y sus propuestas de modificación como potenciales antagonistas de los receptores muscarínicos M3

In silico analysis of garlic secondary metabolites and their proposed modifications as potential antagonists of muscarinic M3 receptors

Walter MONTERROSO^{1,*} & Felipe RAMÍREZ¹

¹Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala

*Correspondencia: Walter Monterroso: (mon18358@uvg.edu.gt)

Recibido: 22/IX/2024; Aceptado: 24/IV/2025

Resumen: El ajo se ha utilizado en diferentes culturas para aliviar los síntomas del asma. Este contiene metabolitos secundarios como el ajoeno, aliina y alicina que han demostrado ser antagonistas efectivos de los receptores muscarínicos M3. Estos receptores juegan un papel clave en la patología del asma y han sido previamente modelados mediante herramientas computacionales para su estudio. Proponemos nuevos antagonistas modificando los grupos funcionales de las moléculas de ajoeno, aliina y alicina que sean más eficientes utilizando métodos computacionales. Los modificamos tomando como referencia los antagonistas muscarínicos farmacológicos conocidos: atropina, ipratropio y tiotropio. Realizamos un análisis de anclaje molecular usando la interfaz de UCSF Chimera y comparamos los resultados con los antagonistas conocidos. Finalmente, demostramos que tres de estas modificaciones son los mejores candidatos para usarse como antagonistas del receptor muscarínico M3 debido a las afinidades obtenidas y a sus propiedades farmacológicas. Nuestros hallazgos sugieren que los metabolitos del ajo, particularmente ajoeno, aliina, alicina y sus respectivas modificaciones, tienen un gran potencial terapéutico como antagonistas del receptor muscarínico M3, lo que explicaría el uso tradicional del ajo en el tratamiento del asma. Asimismo, proponemos nuevos antagonistas que podrían ser estudiados para el desarrollo de futuros tratamientos que sean económicos y disponibles al ser provenientes de productos vegetales.

Palabras clave: Acoplamiento molecular, ajo, interacción ligando-receptor, receptor muscarínico M3, UCSF Chimera.

Abstract: Garlic has been used across various cultures to help alleviate asthma symptoms. It contains secondary metabolites - such as ajoene, alliin, and allicin - that have demonstrated effectiveness as antagonists of muscarinic M3 receptors. These receptors play a key role in the pathology of asthma and have been previously modeled using computational tools for their study. Here, we propose novel antagonists by modifying the functional groups of the ajoene, alliin, and allicin molecules to enhance their efficiency using computational approaches. The modifications were designed using known pharmacological muscarinic antagonists - atropine, ipratropium, and tiotropium - which served as reference compounds. We performed molecular docking analysis using the UCSF Chimera interface, and the results were compared with those of known antagonists. Finally, our results identified three of these modified compounds as the most promising candidates as muscarinic M3 receptor antagonists, based on their binding affinities and pharmacological properties. Our findings suggest that garlic metabolites - particularly ajoene, alliin, and allicin - and their respective modifications hold significant therapeutic potential as muscarinic M3 receptor antagonists, supporting the traditional use of garlic in asthma treatment. Furthermore, we propose new antagonists that warrant further investigation for the development of future treatments that are both cost-effective and accessible due to their plant-based origin.

Keywords: Garlic, ligand-receptor interaction, molecular docking, muscarinic M3 receptors, UCSF Chimera.

INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad que afecta tanto a la población joven como adulta, la cual causa sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho y tos durante la noche o por la mañana (Waizel & Waizel 2009; Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [CDC] 2024). Esta es ocasionada por la inflamación de las vías respiratorias y la tensión de los músculos que las rodean, reduciendo así la cantidad de aire que puede pasar por estas (CDC 2024). En Guatemala, el asma afecta principalmente a los menores de 15 años residentes en los cascos urbanos del país (Melgar Toledo 2001; Instituto Guatemalteco de Seguridad Social [IGSS] 2007; Maldonado 2012; Isern III 2017), los cuales son tratados de manera recurrente ya que vuelven a ingresar poco después de recibir atención médica en hospitales (Maldonado 2012). La prevalencia del asma en Guatemala ha incrementado en las últimas décadas y se prevé que este aumento continúe en los años siguientes a causa de la contaminación y factores como el incremento en la incidencia de infecciones respiratorias virales de establecimiento temprano por lo que se verán más casos de pacientes con dichos síntomas en un futuro (Maldonado 2012).

Para tratar este padecimiento, se han investigado múltiples tipos de fármacos y tratamientos, entre los que se encuentran los antagonistas muscarínicos. Esto se debe a que los receptores muscarínicos M3 presentan un rol dominante en la contracción del músculo liso de los pulmones, la tráquea y los bronquios, pudiendo así provocar broncoconstricción, constricción de las vías respiratorias y el aumento de la producción de mucosa, los cuales son síntomas del asma (Casarosa *et al.* 2010; Buels & Fryer 2012; Kramer 2016; Cazzola *et al.* 2021). Entre los fármacos más utilizados para este fin, podemos encontrar la atropina, el tiotropio y el ipratropio, los cuales son utilizados actualmente como complemento para el tratamiento del asma mediado por los agonistas β_2 (Moulton & Fryer 2011; Buels & Fryer 2012). La eficacia de estos depende mayormente de la dosis y vía de administración, siendo el tiotropio el más efectivo pues se administra una vez al día y sus efectos pueden durar hasta 48 horas después de ser administrado, mientras que la atropina y el ipratropio se deben de administrar entre tres y cuatro veces al día. Con la dosis adecuada, estos han logrado una broncodilatación significativa en el asma ocasionado por virus, alergia, aire frío, el asma nocturna y el broncoespasmo inducido por el ejercicio (Buels & Fryer 2012).

El asma ha sido tratada de forma tradicional mediante el uso de plantas medicinales, siendo el ajo una de especial interés, pues se utiliza en tinturas para tratar estos síntomas (Waizel & Waizel 2009; Hernández & Rubio 2017). Los principales responsables de la actividad biológica y farmacológica de la planta son los compuestos organoazufrados (Córdova Betancourt 2010; Hernández & Rubio 2017). Entre estos metabolitos se encuentran la alicina, E-ajoeno, Z-ajoeno y

alliina, los cuales además se encuentran en una alta abundancia y han sido ampliamente estudiados a causa de los beneficios que representan para la salud (Ledeza & Apitz-Castro 2006; Córdova Betancourt 2010; Quintero-Fabian *et al.* 2013; Hernández & Rubio 2017). Estos metabolitos son estables en soluciones acuosas o etanólicas, pudiendo formarse al macerar el ajo. Las tinturas utilizadas para tratar de manera tradicional distintas afecciones respiratorias contienen estos compuestos (Waizel & Waizel 2009; Córdova Betancourt 2010; Sáez & Soto 2010; Hernández & Rubio 2017; Cedeño Reyes *et al.* 2020).

Una forma de analizar las propiedades químicas y farmacológicas de los metabolitos secundarios *in silico* es utilizando el anclaje, o “molecular docking”. Este es un método bioinformático que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de interacción entre un ligando y un blanco o receptor a partir de sus representaciones tridimensionales (Ballón & Grados 2019). Para estos análisis se pueden utilizar distintos softwares, como UCSF Chimera, BIOVIA Discovery Studio, Autodock Vina y ADMETLab 3.0, los cuales utilizamos en este estudio. Estos programas permiten realizar pruebas *in silico* entre receptores y ligandos (Trott & Olson 2010), teniendo como ventaja el no requerir sujetos de prueba, así como también el no requerir de reactivos o laboratorios, logrando así agilizar la investigación, reducir costos y disminuir el tiempo requerido para realizar el estudio. Uno de los parámetros utilizados en este tipo de estudios es la afinidad, la cual determina la fuerza de la interacción entre ligando y receptor (Trott & Olson 2010; Fadlan & Nusantoro 2021). Mientras más negativo sea el valor de esta, más fuerte será la interacción entre ligando y receptor y mejor será la predicción del anclaje molecular (Trott & Olson 2010; Fadlan & Nusantoro 2021). Con esta información, buscamos analizar y mejorar moléculas provenientes del ajo para proponer nuevos antagonistas para el receptor muscarínico M3 y analizamos sus propiedades *in silico*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Seleccionamos el modelo en formato Protein Data Bank (PDB) del receptor muscarínico de acetilcolina M3 (código PDB: 4DAJ) con el antagonista tiotropio (código PDB: 0HK) en la región de unión (Kruse *et al.* 2012). Asimismo, se obtuvieron los modelos de la atropina (código PDB: OIN), tiotropio (código PDB: 0HK) y el ipratropio (código PDB: X8M) en formato Structure Data File (SDF) los cuales se encuentran en la base de datos PDB (ver Cuadro 1). Por su parte, utilizamos el sitio web <https://molview.org/> para generar los modelos en formato MOL de las moléculas de ajoeno, aliina y alicina, los cuales fueron seleccionados debido a su reportada actividad biológica y farmacológica (ver Cuadro 2).

Como preparación para realizar el anclaje molecular, removimos el antagonista incluido en los modelos del receptor muscarínico

Cuadro 1. Antagonistas muscarínicos comerciales de uso farmacológico con su estructura molecular. El código asignado para las moléculas antagonistas es I.

Table 1. Commercial muscarinic antagonists for pharmacological use with their molecular structure. Code I was assigned for antagonist molecules.

Nombre del compuesto	Código asignado	Estructura
Tiotropio	I1	
Ipratropio	I2	
Atropina	I3	

M3 utilizando el programa UCSF Chimera. Posteriormente, se optimizó la estructura de los antagonistas muscarínicos atropina, tiotropio e ipratropio, así como la estructura del receptor muscarínico de acetilcolina M3 y de los metabolitos secundarios del ajo seleccionados mediante las herramientas *dock prep* y *minimize* del programa UCSF Chimera. Para esto, utilizamos los siguientes parámetros:

Minimize structure: (1) Steepest descent steps: 100; (2) Steepest descent step size (Å): 0.02; (3) Conjugate gradient steps: default 10; (4) Conjugate gradient step size (Å): default 0.02; (5) Update interval: 10; (6) Fixed atoms: none; (7) Protonation states for: Histidine; (8) Standard residues: AMBER ff14SB.

Dock prep: (1) Delete solvent; (2) If alternate locations, keep only highest occupancy: selenomethionine (MSE) to methionine (MET); bromo-UMP (5BU) to UMP (U); (3) Change: methylselenyl-dUMP (UMS) to UMP (U; methylselenyl-dCMP (CSL) to CMP (C); (4) Incomplete side chains: Replace using Dunbrack 2010 rotamer library; (5) Add hydrogens; (6) Add charges; (7) Protonation states for: Histidine; (8) Standard residues: AMBER ff14SB

Luego de optimizar los modelos, realizamos el anclaje molecular de la atropina, ipratropio, tiotropio, ajoeno, aliina y alicina en las cadenas A, B C, y D del receptor muscarínico M3 (código PDB: 4DAJ), utilizando AutoDock Vina en la interfaz de UCSF Chimera. Los anclajes obtenidos fueron posteriormente analizados utilizando el programa BIOVIA Discovery Studio para determinar las interacciones de las moléculas con los residuos de aminoácidos encontrados en el sitio de unión. A

Cuadro 2. Metabolitos secundarios del ajo utilizados en las pruebas de anclaje molecular y como base para los antagonistas propuestos. El código asignado para las moléculas del ajo es A.

Table 2. Secondary metabolites of garlic used in molecular docking tests and as a basis for the proposed antagonists. Code A was assigned for the garlic molecules.

Nombre del compuesto	Código asignado	Estructura
Alicina	A1	
(E)-Ajoeno	A2	
(Z)-Ajoeno	A3	
Aliina	A4	

partir de los resultados obtenidos, seleccionamos la cadena A y la cadena B para realizar duplicados en los siguientes anclajes moleculares.

Una vez realizados los anclajes de los antagonistas comerciales y los metabolitos secundarios del ajo, propusimos cuatro modificaciones para la alicina, aliina y el ajoeno, tomando como referencia los grupos funcionales del tiotropio, ipratropio y la atropina (ver Cuadro 3). Obtuvimos los modelos de las modificaciones propuestas en formato MOL mediante el sitio web <https://molview.org/> y las optimizamos mediante la herramienta *minimize* del programa UCSF Chimera con el campo de fuerza AMBER ff14SB para asignar las cargas de los modelos seleccionados. Luego de minimizar los modelos, realizamos el anclaje molecular de los 12 antagonistas propuestos en las cadenas A y B del receptor muscarínico M3 utilizando nuevamente AutoDock Vina en la interfaz de UCSF Chimera. Estos anclajes los analizamos utilizando el programa BIOVIA Discovery Studio para determinar los aminoácidos que se encontraban en la región de unión.

Al finalizar todos los anclajes moleculares, determinamos las propiedades farmacológicas de los antagonistas propuestos (AM1 a AM12) y las comparamos con las propiedades farmacológicas de la alicina, aliina y el ajoeno. Para esto utilizamos el sitio web <https://admetlab3.scbdd.com/> donde evaluamos si las moléculas cumplían con la regla de Lipinsky, la regla de Pfizer y el criterio Golden Triangle (Lipinski *et al.* 2001; Johnson *et al.* 2009). Obtuvimos además los valores de Caco-2 Permeability, Synthetic Accessibility score (SAscore) y Clearance (Xiong *et al.* 2021; Lobato-Tapia & Aguilar-Muñoz 2022). Finalmente, determinamos cuáles eran los mejores antagonistas propuestos a partir de los resultados obtenidos para las energías de unión y sus características farmacológicas.

Cuadro 3. Modificaciones propuestas a los metabolitos secundarios del ajo. El código asignado a las moléculas modificadas es AM.

Table 3. *Proposed modifications to the secondary metabolites of garlic. Code AM was assigned for the modified molecules.*

Molécula base	Código asignado	Estructura
Aliina	AM1	
	AM2	
	AM3	
	AM4	
(E)-Ajoeno	AM5	
	AM6	
	AM7	
	AM8	
Alicina	AM9	
	AM10	
	AM11	
	AM12	

RESULTADOS

Al promediar las afinidades obtenidas, observamos que el antagonista I1 obtuvo afinidades de -8.95 ± 0.58 Kcal/mol, mientras que los antagonistas I2 e I3 obtuvieron afinidades de -8.5 ± 1.04 Kcal/mol y -8.85 ± 0.14 Kcal/mol, respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Interacciones entre antagonistas y el receptor muscarínico M3. Las interacciones con los aminoácidos encontrados en el sitio de unión fueron clasificadas en enlaces hidrógeno (HB), interacciones hidrofóbicas (HI) o interacciones distintas a las HB y HI (otras).

Table 4. Interactions between antagonists and the muscarinic M3 receptor. The interactions with the amino acids found at the binding site were classified as hydrogen bonds (HB), hydrophobic interactions (HI), or interactions other than HB and HI (others).

Cadena	Antagonista	Afinidad (Kcal/mol)	HB	HI	Otras
A	I1	-9.3	ASN507	TYR148, TRP199, TRP503, TYR529	TYR148 <i>Pi-Cation</i> , TRP503 <i>Pi-Cation</i> , TYR529 <i>Pi-cation</i> , ASP147 <i>Pi-cation</i>
	I2	-8.0	N/A	CYS220, TYR529, TRP525	N/A
	I3	-8.8	TYR529, TYR148, LEU225	TYR529, SER226	THR231 <i>Unfavorable donor-donor</i>
B	I1	-8.2	ASN507	ALA238, ALA235, TRP503, TRP199, TYR529	TYR148 <i>Pi-Lone Pair</i> , TYR529 <i>Pi-cation</i> , ASP147 <i>Pi-Cation</i>
	I2	-9.8	N/A	THR234, TYR148, TYR529, ALA238, VAL155	TYR529 <i>Pi-cation</i> , ASP147 <i>Pi-Cation</i>
	I3	-8.9	ASN507	ASP147, ALA235	ASP147 <i>Pi-Cation</i> , TYR529 <i>Pi-Cation</i>
C	I1	-9.5	ASN507	ASP147, TRP503, TRP199, TYR529, ALA238, ALA235	TYR529 <i>Pi-cation</i> , ASP147 <i>Pi-Cation</i>
	I2	-7.4	ASN513	ASN526, THR231, LEU225, ILE222	N/A
	I3	-8.9	ASN152,	ALA235, ALA238, ASN507	ASP147 <i>Attractive Charge</i> ASP147
D	I1	-8.8	ASN507	SER151, ALA238, TRP199, TRP500, TYR148, TYR529	TYR148 <i>Pi-Pi</i> , TRP199 <i>Pi-Pi</i> , TYR529 <i>Pi-Cation</i> , ASP147 <i>Pi-Cation</i>
	I2	-8.8	N/A	TYR529, ALA238, TYR148, SER151	
	I3	-8.6	ASN507	ALA235, TYR148, TYR529, ASP147, SER151	TYR148 <i>Pi-Cation</i> , ASP147 <i>Pi-Cation</i>

Cuadro 5. Interacciones de los metabolitos secundarios del ajo con el receptor muscarínico M3. Las interacciones con los aminoácidos encontrados en el sitio de unión fueron clasificadas en enlaces hidrógeno (HB), interacciones hidrofóbicas (HI) o interacciones distintas a las HB y HI (otras).

Table 5. Interactions of garlic secondary metabolites with the muscarinic M3 receptor. The interactions with the amino acids found at the binding site were classified as hydrogen bonds (HB), hydrophobic interactions (HI), or interactions other than HB and HI (others).

Cadena	Compuesto	Afinidad (Kcal/mol)	HB	HI	Otras
A	A1	-4.4	SER151, TYR148	N/A	TYR148 <i>Pi-Cation</i>
	A2	-5.2	ASN507	TRP503, TYR148, TRP199, ALA238, ALA235	N/A
	A3	-5.5	ASN507	ALA238, VAL155, TRP199, TYR148, TRP503, CYS532	N/A
	A4	-5.2	SER151	TRP503, TYR506, CYS532, SER151, TYR529.	TYR148 <i>Salt Bridge</i> , ASP147 <i>Pi-cation</i>
B	A1	-4.6	SER151	ALA238, VAL155, TRP503, CYS532, TYR529, TYR506	N/A
	A2	-5.5	N/A	TRP503, TYR506, TYR148, TYR529, ALA238, VAL155	N/A
	A3	-5.1	TYR148, ASN507	TRP503, TYR533, CYS532, TRP199, ILE116, ALA238	N/A
	A4	-5.1	ALA238, ASN507	TYR506, TYR529, CYS532, SER151, ASN152	N/A
C	A1	-4.2	SER151 TYR148	N/A	TYR148 <i>Pi-Cation</i>
	A2	-5.3	ASN507	TYR148, ALA238, TRP199, ALA235, VAL510, CYS532, TYR529, TYR506	N/A
	A3	-5.4	N/A	TYR148, ALA238, VAL510, ALA235, TYR506, TYR529, CYS532	SER151 <i>Unfavorable Acceptor Acceptor</i>
	A4	-5.2	ASN507, ASN152, ALA238	CYS532, TYR506, TYR529, SER151, ASN152	N/A
D	A1	-4.5	ASN507	TYR506, CYS532, TYR529	TYR503 <i>Pi-Cation</i>
	A2	-5.3	TYR148	ALA238, PHE239, TRP503, CYS532, TYR533, ILE116	N/A
	A3	-5.1	N/A	ALA238, ALA235, TRP199, TYR148, TRP503, CYS532, TYR533	N/A
	A4	-5.1	ALA238, ASN152, TYR148	ASN152	N/A

Las moléculas A1, A2, A3 y A4 obtuvieron afinidades promediadas de -4.42 ± 0.17 Kcal/mol, -5.32 ± 0.13 Kcal/mol, -5.35 ± 0.21 Kcal/mol y -5.15 ± 0.06 Kcal/mol, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 6. Interacciones de las modificaciones propuestas con el receptor muscarínico M3. Las interacciones con los aminoácidos encontrados en el sitio de unión fueron clasificadas en enlaces hidrógeno (HB), interacciones hidrofóbicas (HI) o interacciones distintas a las HB y HI (otras).

Table 6. Interactions of the proposed modifications with the muscarinic M3 receptor. The interactions with the amino acids found at the binding site were classified as hydrogen bonds (HB), hydrophobic interactions (HI), or interactions other than HB and HI (others).

Cadena	Compuesto	Afinidad (Kcal/mol)	HB	HI	Otras
A	AM1	-5.4	ASN507, ALA238, SER151, TYR148	N/A	ASN152 <i>Unfavorable Acceptor-Acceptor</i> , TRP199, SER151 <i>Unfavorable Acceptor-Acceptor</i>
	AM2	-5.7	ASP147, SER151	ASP147, TYR529	TYR148 <i>Pi-Cation</i>
	AM3	-7.2	ASN507, SER151, ASP147	ALA235, ASP147	TYR148 <i>Pi-Pi</i> , TYR148 <i>Pi-Cation</i>
	AM4	-6.6	ASN152, SER151, TYR148	TRP503, TYR529, CYS532	TYR529 <i>Pi-Pi</i> , TRP503 <i>Pi-Cation</i>
	AM5	-6.0	TYR148, ASN507, SER151	ASN152	ASP147 <i>Salt bridge</i>
	AM6	-6.5	N/A	TRP503, TYR148, TRP199, TYR506, ALA235, CYS532, TYR529, ASN507	ASP147 <i>Pi-Anion</i>
	AM7	-5.8	ASN507	TYR506, TYR148, CYS532, ALA235	SER151 <i>Unfavorable Acceptor-Acceptor</i> , TYR529 <i>Pi-Pi</i> , TRP503 <i>Pi-Pi</i>
	AM8	-6.6	ASN507, CYS532	TRP503, TYR506, TYR148, ALA235	TYR148 <i>Pi-Pi</i>
	AM9	-5.5	TYR148, SER151, ASP147, ASN507	ASN152, TYR148, TRP503	ASP147 <i>Pi-Cation</i> , TYR148 <i>Pi-Cation</i> , TRP503 <i>Pi-Cation</i> , SER151 <i>Unfavorable Acceptor-Acceptor</i>
	AM10	-6.4	N/A	ALA235, TRP503, TYR148, CYS532, TYR529	TYR529 <i>Pi-Pi</i> , TRP503 <i>Pi-Pi</i>
	AM11	-7.0	SER151, ASN507, TYR148	ALA235,	TYR148 <i>Pi-Pi</i>
	AM12	-6.5	N/A	TY506, TRP503, ALA235, SER151, CYS532	TRP503 <i>Pi-Pi</i> , TYR148 <i>Pi-Pi</i> ,
B	AM1	-5.3	ASN507	ALA238	N/A
	AM2	-5.5	SER151, ASN507, ASN152	SER151, ASN152	TRP503 <i>Pi-Cation</i> , TYR506 <i>Pi-Cation</i>
	AM3	-7.0	ASN507, SER151, THR231	CYS532, THR234	TRP503 <i>Pi-Pi</i> , TYR148 <i>Pi-Pi</i> , TYR529 <i>Pi-Pi</i>
	AM4	-6.5	SER151	TRP503, TYR148, ALA235, ILE222, LEU225	SER151 <i>Unfavorable Acceptor-Acceptor</i>

Cadena	Antagonista	Afinidad (Kcal/mol)	HB	HI	Otras
B	AM5	-5.3	SER151, ASN507	TYR506	TYR148 <i>Pi-Cation</i> , ASP147 <i>Salt bridge</i>
	AM6	-7.9	ASN507, ASN152, SER151	CYS532, TRP503, PHE239, ALA238, TRP525, ALA235	TYR529 <i>Pi-Pi</i> , TYR148 <i>Pi-Pi</i> , TRP503 <i>Pi-Pi</i> , TRP525 <i>Pi-Pi</i>
	AM7	-6.9	TYR529, TYR148	ALA235, TYR506, LEU225, CYS532	TYR529 <i>Pi-Pi</i> , TYR506 <i>Pi-Pi</i>
	AM8	-6.5	SER151	ILE222, LEU225, ALA235, TYR148, TRP503	SER151 <i>Unfavorable</i> <i>Acceptor-Acceptor</i>
	AM9	-5.2	SER151, ASN507	ASN152, TRP503	ASP147 <i>Salt bridge</i>
	AM10	-6.2	ASN507	TYR506, TYR148, ALA235	TRP503 <i>Pi-Cation</i> , SER151 <i>Unfavorable</i> <i>Acceptor-Acceptor</i>
	AM11	-6.9	ASN507, ASP147	TYR148, ALA238, VAL155	SER151 <i>Unfavorable</i> <i>Acceptor-Acceptor</i> TRP503 <i>Pi-Cation</i> , TRP506 <i>Pi-Cation</i>
	AM12	-7.3	TYR506	CYS532, ILE222, LEU225	TYR529 <i>Pi-Pi</i> , TRP503 <i>Pi-Pi</i>

Cuadro 6 demuestra los resultados obtenidos a partir del anclaje molecular de las modificaciones realizadas a los metabolitos secundarios del ajo. Las modificaciones que obtuvieron los mejores puntajes de afinidad fueron las moléculas AM3 (-7.1 ± 0.14 Kcal/mol), AM4 (-6.55 ± 0.07 Kcal/mol), AM6 (-7.2 ± 0.99 Kcal/mol),

AM7 (-6.36 ± 0.78 Kcal/mol), AM8 (-6.55 ± 0.07 Kcal/mol), AM10 (-6.30 ± 0.14 Kcal/mol), AM11 (-6.95 ± 0.07 Kcal/mol), AM12 (-6.90 ± 0.57 Kcal/mol). Las modificaciones con al menos un anillo aromático, tiofeno o amina poseen mejores resultados al momento de realizar el anclaje molecular.

Cuadro 7. Parámetros farmacológicos de los antagonistas propuestos. El SA score (Synthetic Accessibility score), es el parámetro que mide la complejidad de sintetizar la molécula. El CL_{plasma} (plasma clearance) representa el volumen de fármaco eliminado de la sangre por unidad de tiempo.

Table 7. Pharmacological parameters of the proposed antagonists. The SA score (Synthetic Accessibility score) is a parameter that measures the complexity of synthesizing a molecule. CL_{plasma} (plasma clearance) is the volume of drug eliminated from the blood per unit of time.

Nombre	Regla de Lipinski	Golden Triangle	CL_{plasma} (ml/min/kg)	Permeabilidad Caco-2 (log cm/s)	SA score
I1	Aceptada	Aceptada	7.698	-5.210	5.0
I2	Aceptada	Aceptada	8.887	-5.012	4.0
I3	Aceptada	Aceptada	10.68	-4.707	3.0
AM1	Aceptada	Aceptada	2.558	-5.952	4.0
AM2	Aceptada	Aceptada	2.386	-5.993	4.0
AM3	Aceptada	Aceptada	3.646	-5.678	3.0
AM4	Aceptada	Aceptada	2.734	-5.685	4.0
AM5	Aceptada	Aceptada	4.195	-5.796	4.0
AM6	Aceptada	Aceptada	4.475	-5.531	4.0
AM7	Aceptada	Aceptada	10.14	-4.909	4.0
AM8	Aceptada	Aceptada	4.000	-5.714	4.0
AM9	Aceptada	Aceptada	3.596	-6.162	4.0
AM10	Aceptada	Aceptada	9.095	-5.109	5.0
AM11	Aceptada	Aceptada	5.486	-5.570	3.0
AM12	Aceptada	Aceptada	7.139	-5.062	3.0

Luego de analizar las propiedades farmacológicas de los antagonistas conocidos y de los metabolitos modificados, determinamos que todas las moléculas cumplen con la regla de Lipinski y el criterio de Golden Triangle. Asimismo, únicamente

las moléculas AM7, AM10, y AM12 cuentan con valores adecuados de depuración y de permeabilidad Caco-2. Finalmente, todas las moléculas obtuvieron valores menores a 5 para el SAScore, lo cual indica que poseen una baja dificultad para sintetizarse.

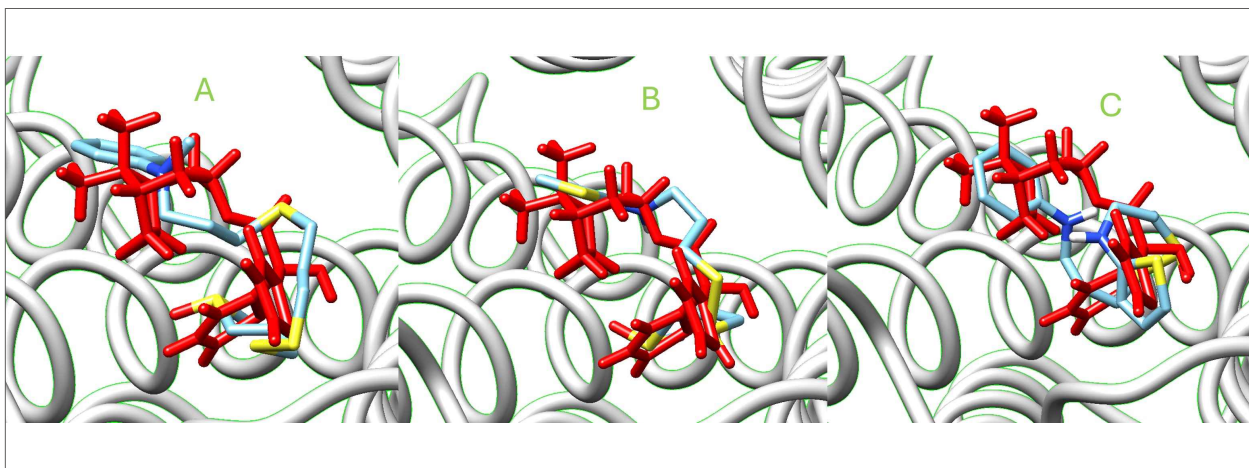


Figura 1. Superposición de las moléculas AM7, AM10 y AM12, sobre la molécula de tiotropio en la región de unión. El tiotropio está resaltado en rojo, para contrastar con las moléculas AM7 (A), AM10 (B) y AM12 (C).
Figure 1. Superposition of molecules AM7, AM10 and AM12, on the tiotropium molecule at the binding site. Tiotropium is highlighted in red, in order to contrast with molecules AM7 (A), AM10 (B) y AM12 (C).

DISCUSIÓN

Para llevar a cabo la metodología, utilizamos el modelo del receptor muscarínico de acetilcolina M3 propuesto por Kruse *et al.* (2012), con código PDB: 4DAJ. De acuerdo con Kruse *et al.* (2012) este modelo fue realizado a partir del receptor muscarínico M3 de *Rattus norvegicus*, el cual fue seleccionado debido a que cuenta con diferencias mínimas con respecto al receptor muscarínico M3 de los humanos y a que se le han realizado una mayor cantidad de estudios bioquímicos, mutagénicos y farmacológicos.

El modelo 4DAJ cuenta con cuatro cadenas (A, B, C y D) con modificaciones mínimas en su secuencia. A pesar de que Kruse *et al.* (2012) llevó a cabo sus estudios utilizando únicamente la cadena A, realizamos el anclaje molecular del tiotropio (I1), ipratropio (I2), atropina (I3), alicina (A1), E-Ajoeno (A2), Z-Ajoeno (A3) y Aliina (A4) con las cuatro cadenas encontradas en el modelo 4DAJ. De esta forma determinamos las afinidades de los compuestos seleccionados en las cuatro cadenas, permitiendo así seleccionar la cadena que se adecúe mejor a nuestras modificaciones.

Las interacciones con los aminoácidos encontrados en el sitio de unión fueron clasificadas según el tipo de enlace que forman, pudiendo ser enlaces hidrógeno (HB), interacciones hidrofóbicas (HI) o interacciones distintas a las HB y HI (otras). Es importante mencionar que las interacciones *Pi-alkyl*, *alkyl*, *Pi-sigma*, *Pi*

Pi y *Pi-Sulfur*, fueron clasificadas como interacciones HI (ver Cuadro 4-6), tal como sugieren Ibrahim *et al.* (2021) y Vinod *et al.* (2023).

El antagonista I1 obtuvo afinidades más bajas (-8.95 ± 0.58 Kcal/mol) que los antagonistas I2 (-8.5 ± 1.04 Kcal/mol) e I3 (-8.85 ± 0.14 Kcal/mol) (Cuadro 4 y 8). Esto puede deberse a que este compuesto presenta una mayor selectividad hacia el receptor muscarínico M3 en comparación a la que muestran los compuestos I2 e I3, lo cual se ha descrito previamente por Moulton & Fryer (2011) y por Buels & Fryer (2012).

A partir de los anclajes realizados con las moléculas I1, I2 e I3, logramos apreciar que aquellos con la mejor afinidad presentan interacciones con los aminoácidos TYR529 y/o ASP147, siendo ambas interacciones *Pi-Cation* (Cuadro 4). Probablemente las interacciones *Pi-Cation* juegan un rol importante en el anclaje de la acetilcolina (ver Gallivan & Dougherty 1999) siendo además que este tipo de interacciones han sido encontradas en anclajes de antagonistas muscarínicos con el receptor muscarínico M3 (ver Kim *et al.* 2024). Las moléculas A1, A2, A3 y A4 obtuvieron afinidades entre -4.42 ± 0.17 y -5.35 ± 0.21 Kcal/mol (Cuadro 5). Estas afinidades son menores a las obtenidas con las moléculas I1, I2 e I3, lo cual indica que los metabolitos secundarios del ajo forman complejos de menor estabilidad que los antagonistas comerciales.

Las afinidades obtenidas por las moléculas A1, A2, A3 y A4 muestran que estas moléculas tienen un alto potencial como antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina M3. Esto último puede explicar el por qué las tinturas de ajo son utilizadas tradicionalmente para tratar el asma (Cedeño Reyes *et al.* 2020), ya que los metabolitos azufrados del ajo podrían actuar como antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina M3, reduciendo a su vez los efectos de broncoconstricción, constricción de las vías respiratorias y el aumento de la producción de mucosa, ocasionados por la acción de dicho receptor. Estos anclajes mostraron que los metabolitos secundarios con los mejores resultados forman interacciones con los aminoácidos TYR148 y/o TRP503 (Cuadro 5). En el caso del aminoácido TYR148 se pudieron encontrar interacciones *Pi-Alkyl*, *Pi-Sulfur* y HB, teniendo afinidades más negativas cuando la interacción era del tipo *Pi-Alkyl*. Por otra parte, las interacciones formadas por el aminoácido TRP503 fueron del tipo *Pi-Sigma*, *Pi-Alkyl* o *Pi-Sulfur*, mostrando resultados similares para los tres tipos de interacción.

Al momento de proponer las modificaciones para los metabolitos secundarios del ajo (moléculas AM1 a AM12), tomamos en cuenta los distintos grupos funcionales de los antagonistas I1, I2, I3. Debido a esto, las modificaciones propuestas contienen aminas, anillos aromáticos, tiofenos y grupos funcionales oxigenados (Cuadro 1 y 3).

Mediante los resultados obtenidos en los anclajes de las moléculas AM1 a AM12 (Cuadro 6), se aprecia que las modificaciones con mejores resultados (superiores a -6 kcal/mol) tienen al menos un anillo aromático, tiofeno o amina, obteniendo mejores valores de afinidad cuando dos o más de estos grupos estaban presentes en las moléculas. Estas modificaciones contenían una combinación del grupo amino y aromático (AM3, AM7 y AM11), grupo amino y tiofeno (AM4, AM8 y AM10) o grupo amino, tiofeno y anillo aromático (AM6 y AM12). A partir de estos resultados y de los obtenidos a partir del anclaje de los antagonistas I1, I2 e I3, se observa que el receptor muscarínico de acetilcolina cuenta con una alta afinidad por los compuestos que cuentan con dobles enlaces conjugados, aminas y compuestos azufrados. Esto se explica debido a que los residuos del receptor muscarínico de acetilcolina tienen la capacidad de formar enlaces *Pi-Alkyl*, *Pi-Sulfur*, *Pi-sigma*, *Pi-Pi* y *Pi-Cation* con este tipo de moléculas (Gallivan & Dougherty 1999; Stornaiuolo *et al.* 2013; Kim *et al.* 2024).

Las modificaciones y los antagonistas conocidos cumplen con la regla de Lipinski y el criterio de Golden Triangle (Cuadro 7). Las moléculas que cumplen con la regla de Lipinski cuentan con una buena absorción o permeabilidad, mientras que las que cumplen con el parámetro Golden Triangle son permeables, metabólicamente estables y son fuertes candidatos para ser utilizados como fármacos (Lipinski *et al.* 2001; Johnson *et al.* 2009). Debido a esto, se infiere que las modificaciones realizadas podrían utilizarse para producir fármacos en un futuro.

Lobato-Tapia & Aguilar-Muñoz (2022) y Xiong *et al.* (2021) explican que los valores de depuración CL_{plasma} indican la exposición del fármaco en la circulación sistémica, el cual es un componente clave para determinar las dosis terapéuticas de un fármaco. Según Xiong *et al.* (2021) estos valores se clasifican en tres tipos: (1) depuración alta (mayor a 15 ml/min/kg), (2) depuración moderada (entre 5 y 15 ml/min/kg) y (3) depuración baja (menor a 5 ml/min/kg). Los resultados obtenidos indican que las modificaciones propuestas cuentan con una baja depuración, siendo las únicas excepciones las moléculas AM7, AM10, AM11 y AM12, las cuales cuentan con una depuración moderada (Cuadro 7). Asimismo, Xiong *et al.* (2021) indican que las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) se utilizan como alternativa al epitelio intestinal humano para estimar la permeabilidad de los fármacos in vivo, debido a que ambas comparten similitudes morfológicas y funcionales, permitiendo así que la permeabilidad de las células Caco-2 sea un parámetro relevante para el desarrollo de fármacos. De igual, Xiong *et al.* (2021) sugieren que el valor recomendado para este parámetro sea mayor a -5.15 log(cm/s), por lo cual es fácil apreciar que todas las modificaciones propuestas en el presente estudio cuentan con una baja permeabilidad Caco-2, siendo las únicas excepciones las moléculas AM12, AM10 y AM7.

Calculamos el valor del SAScore para las modificaciones propuestas, obteniendo valores menores a cinco para todas las moléculas, lo que indica que las modificaciones propuestas tienen una baja dificultad para sintetizarse, ya que solo se considera que una molécula es difícil de sintetizar si esta tiene una SAScore mayor a seis (Xiong *et al.* 2021). A partir de las afinidades obtenidas y las propiedades farmacológicas evaluadas, determinamos que las modificaciones que muestran un mayor potencial como fármaco antagonista del receptor muscarínico M3 son las moléculas AM7, AM10, y AM12 (Fig. 1). Estos fueron seleccionados debido a que presentan las mejores propiedades farmacológicas en comparación con el resto de las modificaciones de la misma molécula base; asimismo, las tres moléculas obtuvieron un resultado favorable al realizar el anclaje con el receptor muscarínico M3.

Finalmente, es importante recalcar que, a pesar de los múltiples beneficios que presentan los estudios computacionales, estos no reemplazan por completo los estudios *in vivo*, por lo que recomendamos realizar ambos tipos de estudio para determinar posibles efectos secundarios ocasionados por metabolitos derivados del fármaco (Zakharov & Lagunin 2014). Asimismo, se deben de tener en cuenta limitaciones como la potencia computacional requerida y la procedencia de las proteínas estudiadas, ya que en su mayoría estas son de procedencia animal, por lo que recomendamos realizar estudios *in vivo* para confirmar los resultados obtenidos mediante los ensayos computacionales (Zakharov & Lagunin 2014).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestras familias por apoyarnos siempre y contribuir activamente en nuestra formación profesional. Damos gracias especialmente a Saranelly Barenos, Lucía Barenos, Erik Torres y Guido Fernández, quienes fueron nuestra principal motivación para realizar este trabajo. Igualmente, agradecemos a la Universidad del Valle de Guatemala por ayudarnos a difundir nuestro estudio y a los colaboradores de la Revista UVG por su trabajo en la revisión del artículo.

REFERENCIAS

- Ballón, W. & Grados, R. (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.
- Buels, K. & Fryer, A. (2012). Muscarinic receptor antagonists: effects on pulmonary function. In: *Handbook of experimental pharmacology*, Fryer, A., Christopoulos, A. & Nathanson, N. (eds), Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, Vol. 208; pp. 317-341. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9_14
- Casarosa, P., Kiechle, T. & Bakker, R. (2010). Differential inverse agonism at the human muscarinic M3 receptor. *Methods in Enzymology* 485: 81-101. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381296-4.00005-1>
- Cazzola, M., Calzetta, L. & Matera, M. (2021). Long-acting muscarinic antagonists and small airways in asthma: Which link? *Allergy* 76(7): 1990-2001. <https://doi.org/10.1111/all.14766>
- Cedeño Reyes, A. C., Ortiz Sosa, M. R., Licea Illas, M., González Carrazana, Y. A. & Arias Molina, Y. (2020). Eficacia de la tintura de ajo al 20% en pacientes asmáticos. Policlínico 13 de marzo. 2018-2019. *Multimed* 24(5): 1140-1152.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (2024). Acerca del asma. [<https://www.cdc.gov/asthma/es/about/acerca-del-asma.html>]. Accesado: 12 de mayo 2025.
- Córdova Betancourt, M. A. (2010). *Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (Allium sativum L.): implicaciones analíticas*. Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de los recursos Naturales, Instituto Politécnico Nacional de México, México. [http://148.204.117.30/jspui/bitstream/LITER_CIIDIROAX/8/1/CÓRD_OVA%20BETANCOURT%20M%2C%202010.pdf] Accesado: 12 de mayo 2025.
- Fadlan, A. & Nusantoro, Y. (2021). The effect of energy minimization on the molecular docking of acetone-based oxindole derivatives. *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia* 6(1): 69-77. <https://doi.org/10.20961/jkpk.v6i1.45467>
- Gallivan, J. & Dougherty, D. (1999). Cation- π interactions in structural biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(17): 9459-9464. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9459>
- Hernández, D. & Rubio, A. (2017). *Efecto antimicótico del percolado de Allium sativum "ajo" in vitro, en cepas del género Aspergillus fumigatus*. Licenciatura, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada Antonio Guillermo Urrello, Perú. [https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UPAG_77b58ecb90c1c805a7a1e5f3246d0831]. Accesado: 22 de mayo 2025.
- Ibrahim, M., Uzairu, A., Shallangwa, G. & Uba, S. (2021). Molecular docking investigation and pharmacokinetic properties prediction of some anilinopyrimidines analogues as EGFR T790M tyrosine kinase inhibitors. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 8(1): 203-213. <https://doi.org/10.1080/2314808X.2021.1946650>
- Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS). (2007) Guía asma (niños). [https://www.igssgt.org/wp-content/uploads/images/gpc-be/pediatría/GPC-BE%2011%20Asma_en_Ninos.pdf]. Accesado: 12 de mayo 2025.
- Isern III, R. D. (2017). *Prevalencia de asma persistente en pacientes de 5 a 12 años con exacerbación asmática*. Hospital General San Juan de Dios, Guatemala, junio 2017. Licenciatura, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rafael Landívar, Guatemala. [<http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisortiz/2017/09/18/IsernIII-Raul.pdf>]. Accesado: 12 de mayo 2025.
- Johnson, T., Dress, K. & Edwards, M. (2009). Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19(19): 5560-5564. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.045>
- Kim, M. J., Ibrahim, M. & Jablonski, M. M. (2024). Shared binding modes of M3 muscarinic agonists and antagonists may incentivize development of novel IOP-reducing drugs: findings from in-silico assays. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 65(7): 3543.
- Kramer, I. (2016). *Cholinergic signaling and muscle contraction*. In: *Signal transduction*, Kramer, I. (ed.), Academic Press, 3ra ed.; pp. 263-327. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394803-8.00004-8>
- Kruse, A. C., Hu, J., Pan, A. C., Arlow, D. H., Rosenbaum, D. M., Rosemond, E., Green, H. F., Liu, T., Chae, P. S., Dror, R. O., Shaw, D. E., Weis, W. I., Wess, J. & Kobilka, B. K. (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482: 552-556. <https://doi.org/10.1038/nature10867>
- Ledezma, E. & Apitz-Castro, R. (2006). Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico. *Revista Iberoamericana de Micología* 23(2): 75-80. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(06\)70017-1](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(06)70017-1)
- 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* 23(1-3): 3-25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- Lobato-Tapia, C. A. & Aguilar-Muñoz, E. (2022). Análisis *in silico* de los compuestos de *Aloysia triphylla* con potencial actividad ansiolítica y predicción de sus propiedades farmacocinéticas. *eNeurobiología* 13(33): 131022.
- Maldonado, H. (2012). *Índice de predicción de riesgo de asma en niños menores de tres años que presentan sibilancias recurrentes*. Maestría en Pediatría, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/05/05_8888.pdf]. Accesado: 12 de mayo 2025.
- Melgar Toledo, M. A. (2001). *Asmas y alergias no diagnosticadas en niños: Estudio descriptivo transversal realizado con niños de 7 a 14 asistentes a la escuela rural mixta Rosibel Ordóñez Mayorga aldea Estancia de la virgen, municipio San Cristóbal AC, departamento El Progreso, mayo 2001*. Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/05/05_8407.pdf]. Accesado: 12 de mayo 2025.
- Moulton, B. C. & Fryer, A. D. (2011). Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. *British Journal of Pharmacology* 163(1): 44-52. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01190.x>
- Quintero-Fabián, S., Ortuño-Sahagún, D., Vázquez-Carrera, M. & López-Roa, R. I. (2013). Alliin, a garlic (*Allium sativum*) compound, prevents LPS-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Mediators of Inflammation* 2013: 381815. <https://doi.org/10.1155/2013/381815>

- Sáez, J. & Soto, J. (2010). Fitoquímica y valor ecológico del olor a ajo en los vegetales. *Medicina Naturista* 4(1): 15-23.
- Stornaiuolo, M., De Kloe, G. E., Rucktooa, P., Fish, A., van Elk, R., Edink, E. S., Bertrand, D., Smit, A. B., de Esch, I. J. P. & Sixma, T. K. (2013). Assembly of a π - π stack of ligands in the binding site of an acetylcholine-binding protein. *Nature Communications* 4(1): 1875. <https://doi.org/10.1038/ncomms2900>
- Trott, O. & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31(2): 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Vinod, S. M., Murugan Sreedevi, S., Krishnan, A., Ravichandran, K., Karthikeyan, P., Kotteswaran, B. & Rajendran, K. (2023). Complexity of the role of various site-specific and selective sudlow binding site drugs in the energetics and stability of the acridinedione dye-bovine serum albumin complex: A molecular docking approach. *ACS Omega*, 8(6):5634-5654. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07111>
- Waizel, H. S. & Waizel, B. J. (2009). Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *Anales de Otorrinolaringología Mexicana* 54(4): 145-171.
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T. & Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research* 49: W5-W14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>
- Zakharov, A. & Lagunin, A. (2014). Computational toxicology in drug discovery: Opportunities and limitations. In: *Application of computational techniques in pharmacy and medicine*. Gorb, L., Kuz'min, V. & Muratov, E. (eds), Springer Dordrecht Heidelberg New York, London; Challenges and Advances in Computational Techniques in Chemistry and Physics, Vol. 17; pp. 325-367. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9257-8_11