



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**Evaluación computacional de análogos de flurbiprofeno
con posibilidad de actuar sobre los péptidos β -amiloide.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALEJANDRO ÁLVAREZ HERNÁNDEZ



CDMX 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JORGE MARTÍN DEL CAMPO RAMÍREZ
VOCAL: LAURA DOMÍNGUEZ DUEÑAS
SECRETARIO: MARIA EUGENIA MENDOZA JASSO
1er SUPLENTE: ALBERTO HERNÁNDEZ LEÓN
2do SUPLENTE: CHRISTY HERNÁNDEZ SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CUBÍCULO 230, EDIFICIO F, DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LAURA DOMÍNGUEZ DUEÑAS

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. RODRIGO AGUAYO ORTIZ

SUSTENTANTE:

ALEJANDRO ÁLVAREZ HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la formación académica, personal y oportunidades brindadas.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA201118) por la beca otorgada.

A la Dirección de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) de la UNAM, por el apoyo recibido para el uso de la supercomputadora HP Cluster Platform 3000SL "Miztli" (LANCAD-UNAM-DGTIC-306).

A la Dra. Laura Domínguez Dueñas, por haberme permitido ingresar a su grupo de investigación, brindarme su apoyo, confianza, paciencia y por otorgarme todas las oportunidades para mi crecimiento profesional.

Al Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz, por otorgarme su paciencia, conocimiento, recomendaciones y su apoyo durante la estancia en el cubículo y realización de este trabajo.

A mis compañeros del cubículo Alejandra, Rodrigo Aguayo, Augusto González, Guillermo Goode, Dulce Guzmán, Humberto Flores, Víctor Calvo, por los consejos, los buenos momentos, sugerencias, enseñanzas y su amistad que me brindaron.

A Coahui Karla por el apoyo, amor, consejos, paciencia, compañía y risas que me han llenado y me han hecho seguir adelante.

A mi familia Genaro Hernández, Alejandra Hernández, Paula Hernández, Javier Samano, Javier Samano Hernández, David Hernández, Rosa Rodríguez, Vanea Hernández, Luisa Hernández, Teófila Hernández, por apoyarme durante toda mi estancia en la

Facultad, ya que, sin su cariño, enseñanzas, paciencia, palabras de aliento, regaños no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

A Elsa Mendoza por su gran apoyo y sabiduría, que me ayudaron a seguir adelante durante diversas etapas dentro de la Facultad.

A Daniel Favila por su apoyo y los buenos momentos.

A mis grandes amigos de carrera Claudia Mosqueda, Martin Rosales, Omar Jarquin, Angélica Hernández, Estefany Mendoza, gracias a su compañía y apoyo pase muchos buenos momentos durante la estancia dentro y fuera de la universidad.

A mis amigos de inicio carrera Luis López, Oscar Hermosillo, Esteban, Francisco Huerta, Fernando Palma, Jorge Cruz.

A mi jurado por su tiempo y correcciones para el presente trabajo.

*A mi familia y
Karla*

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	2
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Demencia	6
2.2. Enfermedad de Alzheimer	6
2.3. Etiología	8
2.3.1. Ovillos neurofibrilares	8
2.3.2. Placas seniles e hipótesis amiloidogénica	9
2.4. γ -Secretasa	10
2.5. Inhibidores de γ -Secretasa	12
2.6. Moduladores de γ -Secretasa	12
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	15
6. METODOLOGÍA	16
6.1. Construcción de moléculas	16
6.2. Relación cuantitativa estructura-actividad	18
6.3. Simulación de dinámica molecular de C99 ₁₅₋₅₅	19
6.3.1. Preparación de los sistemas	19
6.3.2. Dinámica molecular	20
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
7.1. Relación cuantitativa estructura-actividad	21
7.2. Dinámica Molecular de C99 ₁₅₋₅₅ con ligandos	25
8. CONCLUSIONES	32
9. PERSPECTIVAS	32
10. REFERENCIAS	33
11. ANEXO I	42
12. ANEXO II	48
12.1. Análisis de dinámica molecular	48

ABREVIATURAS O ACRÓNIMOS

A β	Del inglés: <i>β-amyloid peptide</i>
AATS7 _v	Del inglés: <i>Broto-Moreau Average Autocorrelation of a Topological Structure - lag 7 weighted by Van der Waals volumen</i>
AICD	Del inglés: <i>Amyloid precursor protein Intracellular Domain</i>
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
APH-1	Del inglés: <i>Anterior Pharynx-Defective 1</i>
APP	Del inglés: <i>Amyloid Precursor Protein</i>
ATSe6	Del inglés: <i>Broto-Moreau Autocorrelation of a Topological Structure - lag 6 weighted by atomic Sanderson electronegativity</i>
BACE-1	Del inglés: <i>β-site APP Cleaving Enzyme 1</i>
CHARMM	Campo de fuerza CHARMM (del inglés: <i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i>)
C99	Fragmento C-terminal intramembranal de 99 aminoácidos
C99 ₁₅₋₅₅	Dominio transmembranal de 15 a 55 aminoácidos del péptido C99
di	Residuales estandarizados
ECD	Del inglés: <i>Extracellular Domain</i>
F	Estadístico F de Fisher
GSIIs	Del inglés: <i>γ-Secretase Inhibitors</i>
GSMs	Del inglés: <i>γ-Secretase Modulators</i>
K	Kelvin
logP	Logaritmo de la constante de reparto
μ s	Microsegundos
NCT	Nicastrin
NPT	Ensamble isobárico-isotérmico
ns	Nanosegundos
nm	Nanometros
NVT	Ensamble isocórico-isotérmico

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

OPM	Del inglés: <i>Orientation of Proteins in Membrane</i>
PDB	Del inglés: <i>Protein Data Bank</i>
PEN-2	Del inglés: <i>Presenilin Enhancer 2</i>
PME	Partícula en la Malla de Ewald
POPC	Del inglés: <i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
PS	Presenilin
QSAR	Del inglés: <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
q^2_{int}	Estadístico de validación interna
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
r	Coefficiente de correlación de Pearson
r^2	Coefficiente de determinación
r^2_{adj}	Coefficiente de determinación ajustado
sAPP β	Del inglés: <i>Soluble APPβ</i>
SD	Del inglés: <i>Steepest Descent</i>
TMs	Del inglés: <i>Transmembrane</i>
VR1_Dzp	Del inglés: <i>Randic-like eigenvector-based index from Barysz matrix weighted by polarizability</i>

Aminoácidos

Nombre	Abreviatura	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lis	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es la causa más frecuente de demencia en la población, se caracteriza por la pérdida de la memoria inmediata y de otras capacidades cognitivas. Los agregados de placas seniles en el cerebro de los pacientes con la enfermedad son las causas principales a las que se asocia su desarrollo. Las placas seniles son agregados de péptido $A\beta_{42}$ en el espacio interneuronal. Estos agregados pueden generarse debido a se modifica el patrón de escisión de C99 por γ -secretasa, y pueden ser causados por mutaciones en la proteína precursora amiloide (del inglés: APP) o γ -secretasa, cambios en la composición de la membrana y/o agentes externos que modifiquen el patrón de escisión de C99.

La búsqueda de compuestos que puedan modificar la producción de $A\beta_{42}$ para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer ha generado el desarrollo de inhibidores y moduladores de γ -secretasa; siendo los moduladores aquellos que tienen mejor perfil de seguridad. Sin embargo, no se conoce el sitio de unión de estas moléculas, el cual es importante para el desarrollo de nuevas moléculas que puedan ser utilizadas para el tratamiento de la enfermedad.

En el presente trabajo se caracterizaron las interacciones de análogos de flurbiprofeno con el péptido C99₁₅₋₅₅ mediante el uso de herramientas computacionales. En la primera etapa de este trabajo se compiló información sobre la estructura y la actividad biológica de moléculas análogas al flurbiprofeno para generar modelos de relaciones cuantitativas estructura-actividad. En la segunda etapa, se estudió el mecanismo de acción o el modo de unión más probable de dichas moléculas, mediante estudios de dinámica molecular de los complejos proteína ligando.

2. ANTECEDENTES

2.1. Demencia

La demencia es un síndrome que se caracteriza por el deterioro progresivo de las funciones cognitivas relacionado, principalmente con la pérdida de comunicación y muerte de células cerebrales (neuronas). La enfermedad de Alzheimer es la causa más frecuente de demencia, alcanzando entre un 60 y 70% del total de los casos reportados.¹ Con base en las estadísticas recientes, se estima que el número de personas que padecerán la enfermedad de Alzheimer u otra demencia alcanzará los 75 millones en 2030 y 132 millones en 2050; en la **Figura 2.1** se muestra la cantidad de personas afectadas por una demencia en cada continente y en el mundo.

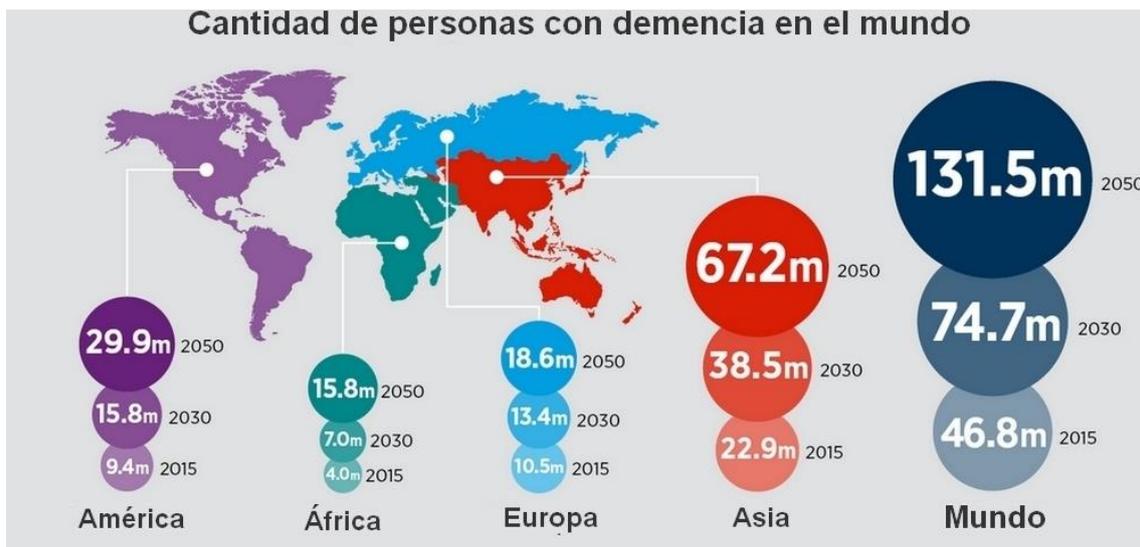


Figura 2.1. Número de personas con enfermedad de Alzheimer y otras demencias a nivel mundial en el año 2015, y estimado para los años 2030 y 2050.²

2.2. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es el tipo de demencia más común en la población, la cual se relaciona con problemas de memoria, pensamiento cognitivo y comportamiento. Este padecimiento se caracteriza por una pérdida de la memoria inmediata y otras capacidades cognitivas, a medida que mueren neuronas y se atrofian diferentes zonas del cerebro, por ejemplo: en la **Figura 2.2** se muestra la reducción de la corteza cerebral, encogimiento del hipocampo y

aumento del tamaño de los ventrículos, comparándolo con él un cerebro de persona sana.

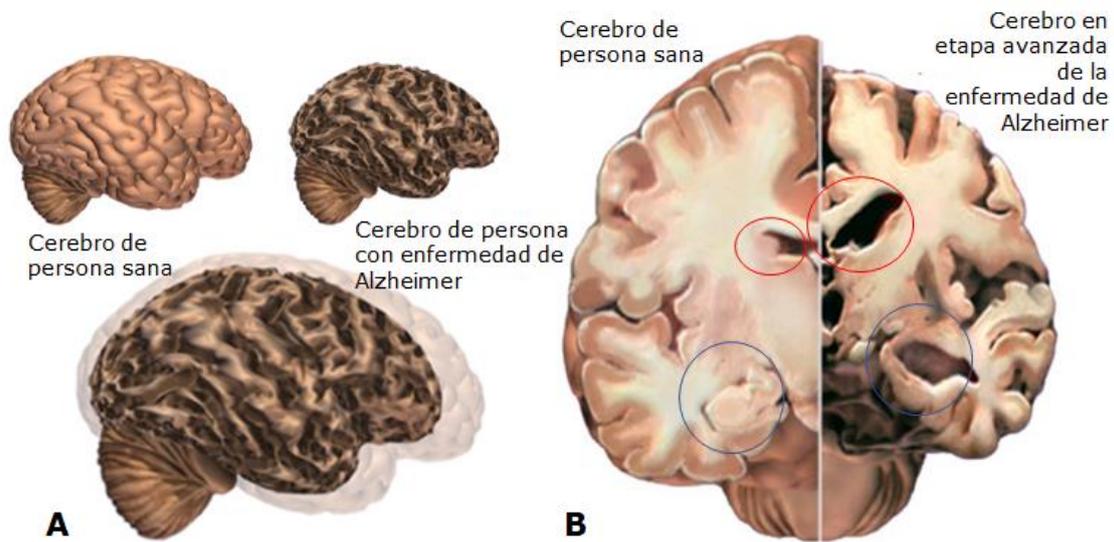


Figura 2.2. Esquema del cerebro A) Comparación de la pérdida del tamaño debido al padecimiento, B) en rojo comparación de aumento del tamaño de ventrículos, en azul reducción del hipocampo.³

Los signos y síntomas de la enfermedad de Alzheimer se pueden dividir en tres etapas:¹

- **Etapa temprana:** normalmente pasa desapercibida debido al inicio paulatino, la persona tiene tendencia a olvidar cosas, perder la noción del tiempo y puede tener desubicación espacial incluso en lugares conocidos.
- **Etapa intermedia:** los signos y síntomas se vuelven más evidentes y limitadores, la persona empieza a olvidar acontecimientos recientes, puede estar desubicada incluso dentro de su propia casa, tiene problemas para comunicarse y comienza a sufrir cambios de comportamiento.
- **Etapa tardía o avanzada:** las alteraciones de la memoria son graves, la dependencia e inactividad son casi totales, la persona tiene problemas para reconocer familiares, tiene dificultad para caminar, creciente desubicación en el tiempo y espacio y tienen alteraciones en el comportamiento que pueden desembocar en agresiones.

2.3. Etiología

Se han propuesto diversos factores de riesgo involucrados en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, como son: la edad, factores genéticos, diabetes mellitus y problemas cerebrovasculares.⁴ Por su parte, el déficit del neurotransmisor acetilcolina, los agregados de ovillos neurofibrilares y los agregados de placas seniles en el cerebro de los pacientes son las causas principales a las que se asocia el desarrollo de la enfermedad.^{3,5}

2.3.1. Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares son agregados de proteínas tau hiperfosforiladas que promueven la desestabilización y despolimerización de microtúbulos, como se muestra en la **Figura 2.3.A**. Estos últimos son estructuras que forman parte del citoesqueleto de la célula y participan en el ciclo celular.⁶ La proteína tau hiperfosforilada se autoensambla en una forma de filamentos helicoidales pareados, cuya agregación conlleva a la formación de los ovillos neurofibrilares en el citoplasma de las neuronas, provocando su muerte, ejemplificado en la **Figura 2.3.B**).^{5,7,8}

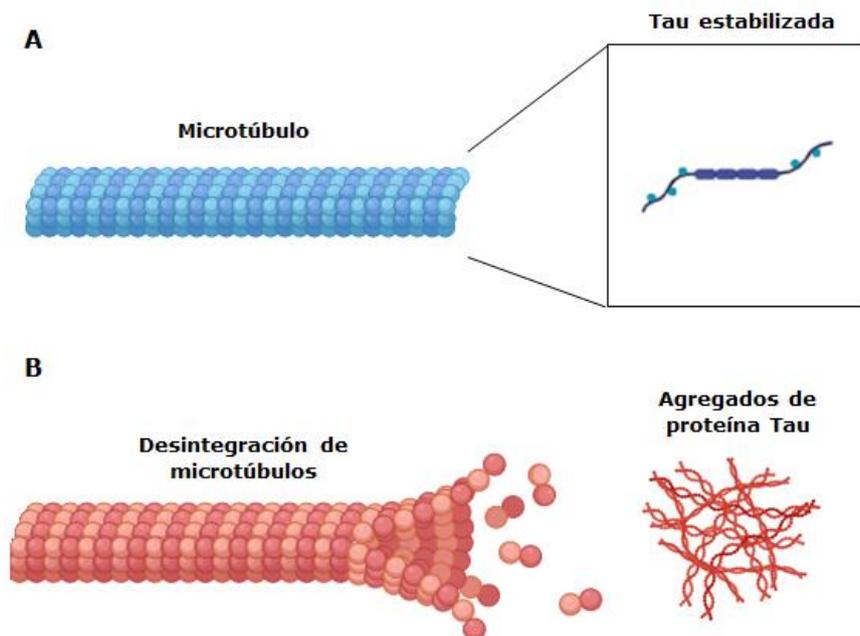


Figura 2.3. A) Neurona sana, microtúbulos estabilizados por tau fosforilada. B) Tau hiperfosforilada provocando la desestabilización y desintegración de los microtúbulos, dando lugar a los agregados de proteína Tau denominados ovillos neurofibrilares. (Figura modificada de Alzheimer-riese.it.)⁹

2.3.2. Placas seniles e hipótesis amiloidogénica

Las placas seniles son agregados de péptido β -amiloide ($A\beta$) en el espacio interneuronal. La producción del péptido $A\beta$ se origina a partir del corte de la proteína precursora amiloide (*Amyloid Precursor Protein*, APP) por la enzima β -secretasa (*Beta-site APP cleaving enzyme 1*, BACE1), produciendo un fragmento N-terminal soluble (sAPP β) y un fragmento C-terminal intramembranal de 99 aminoácidos (C99), mostrándose en la **Figura 2.4.A**, el fragmento azul corresponde a sAPP β y C99 es el fragmento que permanece en la membrana. Posteriormente, C99 es procesado por la enzima γ -secretasa en su región transmembranal, generando el péptido $A\beta$ y un dominio intracelular de APP (AICD, por sus siglas en inglés) que funciona como mediador de señalización a nivel del núcleo celular. La enzima γ -secretasa tiene tres sitios diferentes de corte en C99 mostrados en la **Figura 2.4.A**: ϵ , ζ , γ . El primero ocurre en el sitio ϵ localizado entre los aminoácidos Leu49 y Val50, dando lugar al péptido $A\beta_{49}$ y al fragmento AICD. Un segundo corte se lleva a cabo en el sitio ζ entre los aminoácidos Val46 e Ile47, produciendo el péptido $A\beta_{46}$. Por último, el péptido $A\beta_{46}$ es cortado en el sitio γ para liberar al péptido $A\beta_{43}$ o $A\beta_{40}$. Sin embargo, la presencia de mutaciones en APP o γ -secretasa, cambios en la composición de la membrana lipídica y/o la interacción de agentes externos modifican el patrón de escisión de C99, llevando a la formación de las isoformas $A\beta_{38}$ y $A\beta_{42}$, mostrados como fragmentos alternos en la **Figura 2.4.A**.¹⁰⁻¹² Se sabe que el péptido $A\beta_{42}$ se forma de manera normal en personas sanas, sin embargo, cuando la proporción de $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ aumenta es cuando se desarrolla la enfermedad de Alzheimer. El péptido $A\beta_{42}$ se agrega más fácilmente, debido a los aminoácidos Alanina e Isoleucina (aminoácidos hidrofóbicos) que favorecen la formación de láminas- β y agregados (placas seniles).¹³

Se ha propuesto que los agregados de A β perturban la sinapsis neuronal por unión a receptores, canales iónicos o por la formación de canales de calcio, irrumpiendo en la comunicación entre neuronas y llevando a la muerte celular; en la **Figura 2.4.B** se muestra un ejemplo de la perturbación de la sinapsis neuronal por causa de agregados de A β .¹¹

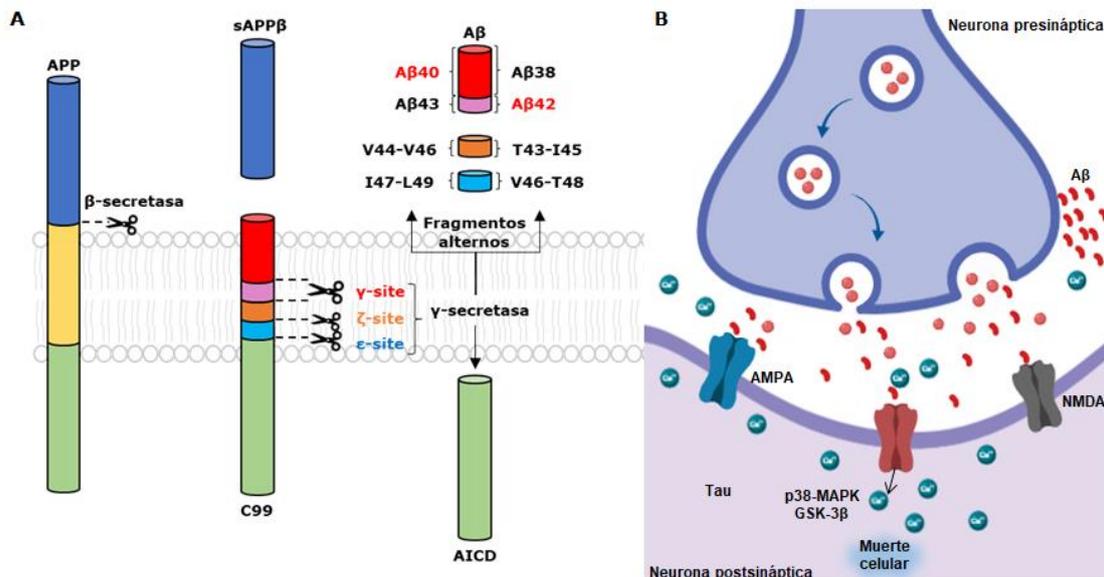


Figura 2.4. A) El corte secuencial de APP por β-secretasa genera sAPPβ, la posterior escisión por γ-secretasa genera a su vez diferentes isoformas de A β (Modificado).¹¹ B) La muerte celular causada por oligómeros de A β en el espacio intercelular, es provocando, en parte, por la interferencia de canales de Ca²⁺ y la irrupción de las membranas celulares de las neuronas (Modificado).¹⁴

2.4. γ-Secretasa

La enzima γ-secretasa es un complejo enzimático transmembranal con actividad de aspartil proteasa que participa en la escisión de diferentes péptidos integrales de membrana, entre los que se encuentra C99. γ-secretasa consta de cuatro componentes: presenilina (PS); potenciador de presenilina 2 (*Presenilin Enhancer 2*, PEN-2); faringe anterior defectuosa 1 (*Anterior Pharynx-Defective 1*, APH-1); y nicastrin (NCT) (**Figura 2.5.**). El sitio catalítico del complejo se encuentra en el componente PS, el cual consta de nueve hélices transmembranales (TMs) con dos aspárticos catalíticos localizados en TM6 (Asp257) y TM7

(Asp385).^{11,15} PEN-2 tiene dos TMs que contribuyen a la maduración de PS y facilitan la activación de la enzima. Por su parte, APH-1 tiene siete TMs que interactúan con PS (TM1, TM8, TM9) y le dan estabilidad al complejo. NCT consta de una hélice TM y un dominio extracelular (*extracellular domain*, ECD), el cual participa en el reclutamiento, maduración y ensamblaje del complejo de γ -secretasa.

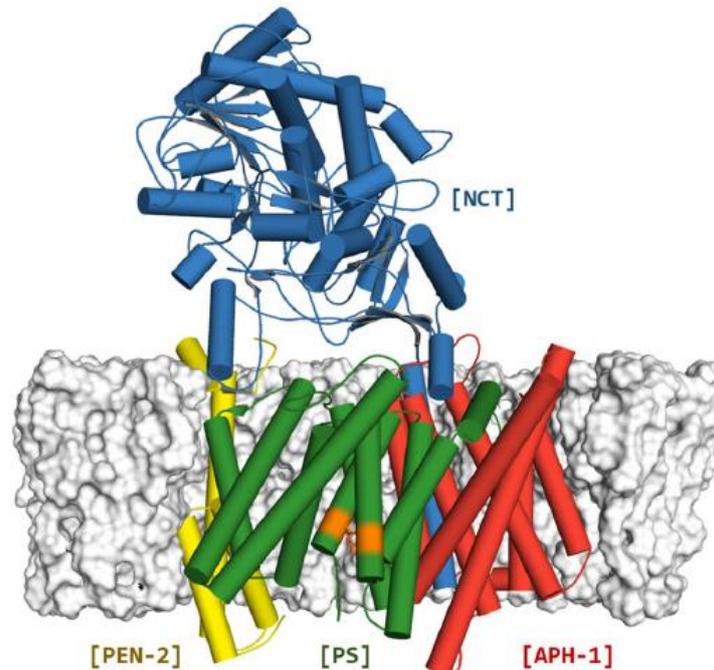


Figura 2.5. Estructura de γ -secretasa y sus componentes: NCT (Azul), PS (Verde), PEN-2 (Amarillo), APH-1 (Rojo). Los residuos catalíticos se muestran en naranja.⁹

Debido a la búsqueda de estrategias terapéuticas que traten la enfermedad de Alzheimer se ha generado el desarrollo de diversas moléculas, entre las que se encuentran los inhibidores (*γ -Secretase Inhibitors*, GSIs) y moduladores de γ -secretasa (*γ -Secretase Modulators*, GSMs). Los GSIs bloquean la actividad de γ -secretasa, por lo tanto, inhiben la generación de $A\beta_{42}$, mientras que los GSMs modulan la producción selectiva de $A\beta_{42}$.^{16,17}

2.5. Inhibidores de γ -secretasa

Los GSIs actúan impidiendo el procesamiento de APP y la posterior formación de $A\beta$ en pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Existen tres clases de GSIs (**Figura 2.6.**): (1) los péptidos helicoidales (isostéricos), (2) las azepinas y (3) las sulfonamidas. El primer grupo actúa bloqueando el sitio de unión del sustrato y evitando que el componente PS ejerza su actividad proteolítica. Las azepinas y sulfonamidas, también conocidos como inhibidores del estado de transición, se unen a un sitio alostérico en el componente PS interfiriendo con la actividad proteolítica.¹⁶⁻¹⁸ Sin embargo, varios estudios clínicos han demostrado que estos compuestos provocan efectos adversos en los pacientes al interferir en el procesamiento de otros sustratos importantes de γ -secretasa (ej. Notch-1).^{12,15,16}

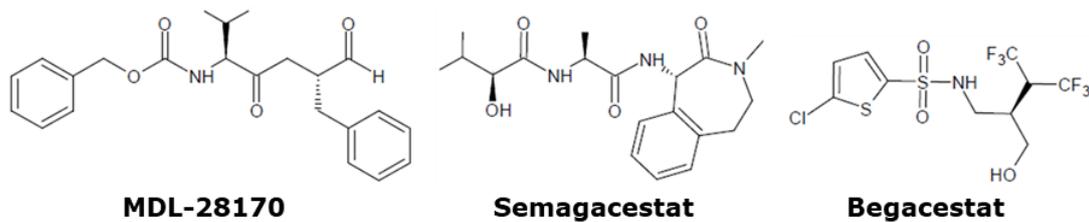


Figura 2.6. Estructuras químicas de inhibidores de γ -secretasa (GSIs).

2.6. Moduladores de γ -secretasa

A diferencia de los GSIs, los moduladores de γ -secretasa (GSMs) modifican el patrón de escisión de C99 reduciendo la producción de $A\beta_{42}$, sin afectar el procesamiento de otras proteínas.^{14,15} La primera generación de GSMs caracterizada fue la de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como sulfuro de sulindac, indometacina, (R)-flurbiprofeno (**Figura 2.7**). Aún no se ha demostrado cómo funcionan estos compuestos, pero se cree que los AINEs se unen en el motivo GXXXG del sustrato APP (X corresponde a cualquiera de los 20 aminoácidos), alterando la escisión de γ -secretasa e induciendo un aumento de $A\beta_{38}$ y disminución de $A\beta_{42}$.¹⁹⁻²¹ Diversos compuestos de esta primera generación han ingresado a estudios clínicos, mostrando

un buen perfil de seguridad y disminución en el deterioro cognitivo.^{22,23} Además, mostraron reducir de forma eficiente la agregación de A β ₄₂.¹⁶

La segunda generación de GSMs (GSMs heterocíclico no derivado de AINE) se caracteriza por tener una estructura base de anillos heterocíclicos de tipo A-B-C-D (**Figura 2.7**), en el que los anillos A-B presentan un arilimidazol (ej. E-2012, E-2212)²⁰. Se observó que esta serie de compuestos reducen tanto A β ₄₂ como A β ₄₀, aumentando a su vez la producción de A β ₃₇ y A β ₃₈. Al igual que los GSMs de primera generación, hasta el día de hoy no se conoce el mecanismo de modulación, pero se cree que inducen un cambio conformacional en γ -secretasa al unirse a un sitio próximo entre los componentes PS y PEN-2 del complejo. Esto último resulta en la modificación de los sitios de escisión sobre A β ₄₉, facilitando la producción preferente de A β ₃₇ y A β ₃₈.^{20,24} Al igual que los GSMs de primera generación, estos compuestos no afectan el procesamiento de otros sustratos; sin embargo, muchos de estos compuestos no tienen buen perfil de seguridad debido a su interacción con otras proteínas. Diversos grupos de investigación buscan optimizar o generar nuevos GSMs que presenten mejor actividad, perfil de seguridad y propiedades fisicoquímicas.^{18,24}

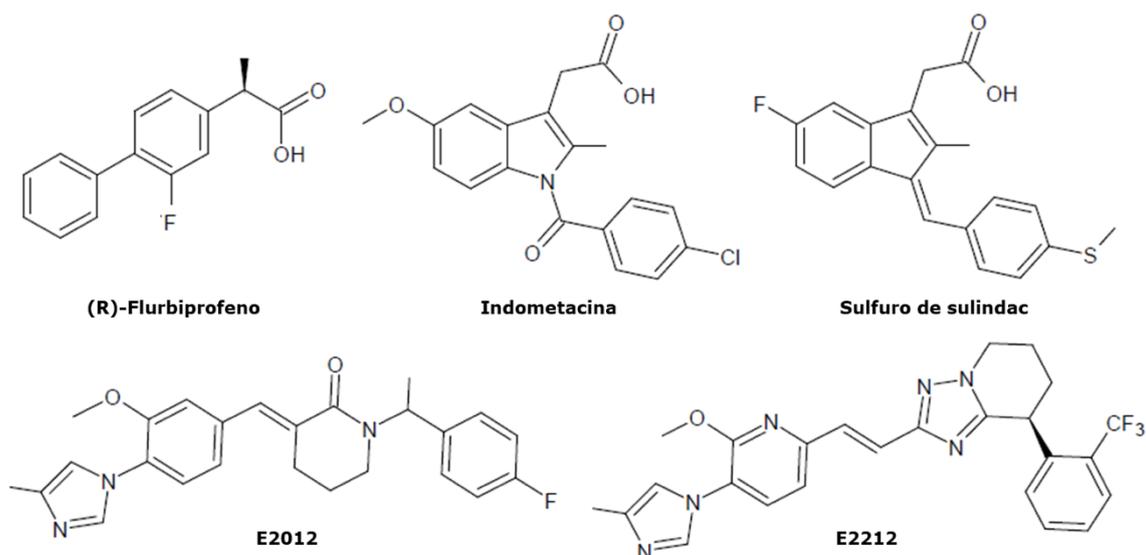


Figura 2.7. Estructuras químicas de moduladores de γ -secretasa (GSMs).

Estudios con ayuda de herramientas computacionales, han propuesto que los GSMs (indometacina y sulfuro de sulindac) se unen en el motivo GXXXG del sustrato APP (**Figura 2.8**). Debido a sus características hidrofóbicas les permiten atravesar la membrana, y por su geometría plana les ayuda a interactúa con la α -helice de APP.²¹

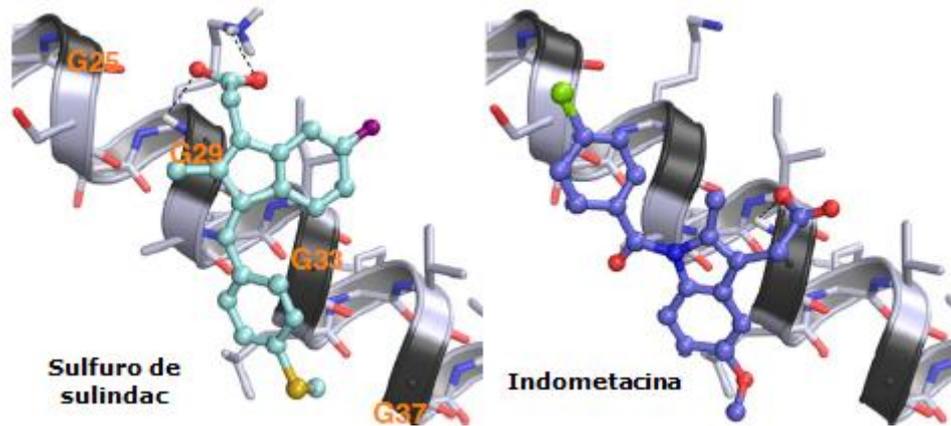


Figura 2.8. Sitio de unión de sulfuro de sulindac e indometacina propuesto con ayuda de Docking flexible.²¹

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento en el número de casos de personas que padecen la enfermedad de Alzheimer, se ha buscado el desarrollo y la obtención de nuevos fármacos que disminuyan la producción de $A\beta_{42}$ sin presentar efectos adversos. Los análogos de flurbiprofeno han mostrado ser uno de los grupos de GSMs con mejor perfil de seguridad y eficacia en estudios clínicos. Para el desarrollo u optimización eficiente de estas moléculas, es necesario caracterizar las interacciones proteína-ligando a nivel molecular. Esto último es posible abordarlo mediante el empleo de herramientas computacionales, con las cuales será posible establecer un sitio de unión que dará la base para un diseño racional de moléculas basada en la estructura del receptor.

4. HIPÓTESIS

El uso de herramientas computacionales permitirá caracterizar propiedades de conectividad, topológicas, geométricas, etc., de los análogos de flurbiprofeno e interacciones proteína-ligando.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos generales

Emplear herramientas computacionales para identificar el posible sitio de unión del flurbiprofeno y sus análogos al péptido C99.

5.2. Objetivos particulares

- Recopilar información disponible en la literatura de análogos de flurbiprofeno con actividad inhibitoria de la producción de $A\beta_{42}$.
- Emplear los datos experimentales existentes para generar modelos de relación cuantitativa estructura-actividad.
- Identificar el sitio de unión y caracterizar las interacciones de derivados de flurbiprofeno con el péptido C99 mediante estudios de dinámica molecular.

6. METODOLOGÍA

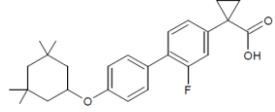
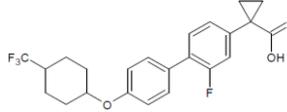
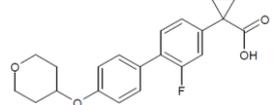
6.1. Construcción de moléculas

Se empleó la herramienta 2D-Sketcher del programa Maestro de Schrödinger²⁵ para construir las estructuras del flurbiprofeno y sus análogos. Las estructuras generadas se optimizaron con el campo de fuerza OPLS2005 (**Tabla 1.**).

Tabla 1. Estructuras químicas de análogos de flurbiprofeno con información experimental

Com-puesto	Estructura	% de Inhibi-ción de A β ₄₂	Com-puesto	Estructura	% de Inhibi-ción de A β ₄₂
Flurbi-profeno		30	5j		96
5a		87	5k		40
5b		75	5l		11
5c		13	5m		67
5d		58	5n		42
5e		55	5o		27
5f		79	13a		76
5g		44	16d		75

Continúa					
Com-puesto	Estructura	% de Inhibi-ción de Aβ ₄₂	Com-puesto	Estructura	% de Inhibi-ción de Aβ ₄₂
5i		25	6b		40
6c		2	11d		49
21		43	11e		75
18		31	11f		52
19		34	11g		58
23		46	11h		77
26		70	11i		60
11a		40	16a		99
11b		55	16b		80
11c		79	16c		75

Continúa					
Com-puesto	Estructura	% de Inhibición de Aβ ₄₂	Com-puesto	Estructura	% de Inhibición de Aβ ₄₂
13b		97	13d		70
13c		28			

6.2. Relaciones cuantitativas estructura-actividad en dos dimensiones

Para realizar el estudio de QSAR-2D se utilizó la información estructural y la actividad biológica reportada por el grupo de Investigación y Desarrollo Chiesi Farmaceutici S.p.A.²⁶ Se utilizaron las librerías Chemopy²⁷, BlueDesc²⁸, RDKit²⁹, CDK³⁰, Pybel³¹, PaDEL³² del servidor ChemDes³³ para el cálculo de 2,800 descriptores de tipo topológicos, de conectividad, geométricos, de carga, de autocorrelación, constitucionales, entre otros. Se empleó la librería VSURF³⁴ del programa R³⁵ para la selección de los mejores descriptores y *gmulti*³⁶ para la selección de mejores modelos. Para la selección del modelo lineal se analizaron 100 grupos realizando una selección aleatoria del grupo de prueba y entrenamiento con proporción 25:75 por cada set.

De todos los modelos generados se analizaron los estadísticos: coeficiente de determinación (r^2), coeficiente de determinación ajustado (r^2_{adj}), estadístico F de Fisher (F) y estadístico de validación cruzada interna (q^2_{int}). Para la eliminación de valores atípicos se calcularon residuales estandarizados (d_i). Los valores atípicos se identificaron en el área de significancia de 0.05 de distribución normal, verificado con la prueba de Shapiro-Wilk.³⁷ Al eliminar los valores atípicos se realizó la regresión lineal con los nuevos modelos y se analizaron nuevamente los estadísticos.

6.3. Simulación de dinámica molecular de C99₁₅₋₅₅

6.3.1. Preparación de los sistemas

Se utilizó la estructura resuelta por resonancia magnética nuclear (RMN) del dominio transmembranal de 15 a 55 aminoácidos del péptido C99 (C99₁₅₋₅₅, PDB ID: 2LLM)³⁸ de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB).³⁹ Para asignar la orientación del péptido en la membrana se utilizó el servidor *Orientation of Proteins in Membrane* (OPM).⁴⁰ Para la parametrización de los ligandos, se utilizó el programa CGenFF⁴¹ del servidor CHARMM-GUI^{42,43} adecuados para ser utilizados con el campo de fuerza CHARMM36m.⁴⁴

Cada sistema fue embebido en una bicapa lipídica de 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC, 100 lípidos) con 10 moléculas de colesterol en la monocapa superior e inferior (**Figura 6.1.**), utilizando el servidor CHARMM-GUI.

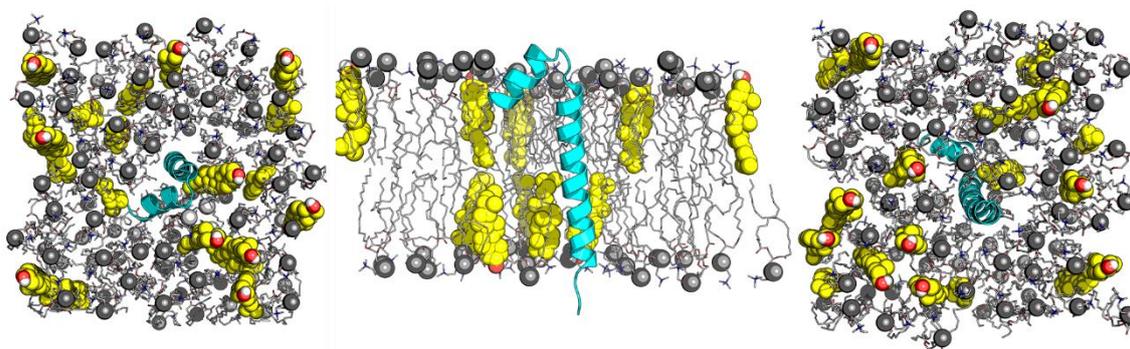


Figura 6.1. Vista superior, frontal e inferior del sistema con colesterol respectivamente; en amarillo se muestra la molécula de colesterol, en azul C99₁₅₋₅₅, en gris moléculas de POPC.

Para posicionar los análogos de flurbiprofeno en la membrana, se llevó a cabo la sustitución del colesterol con el programa PyMOL.⁴⁵ Se alineó el oxígeno del ácido carboxílico de los análogos de flurbiprofeno con el hidroxilo del colesterol, el carbono número 3 (C3) con el carbonilo C15, el C5 con C5, C8 con C2 y C14 con C8, respectivamente, de tal forma que los anillos B y D del colesterol estuvieran alineados con los anillos A y B de los análogos de flurbiprofeno (ver **Figura 6.2.**).

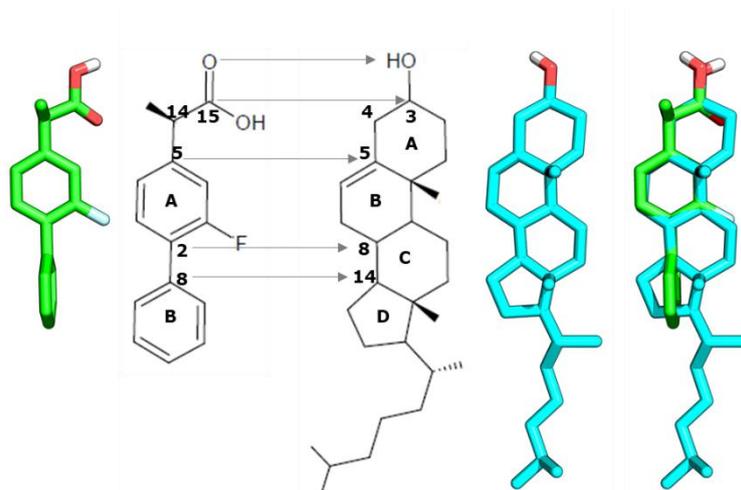


Figura 6.2. Alineación de la molécula de flurbiprofeno con la de colesterol.

Todos los sistemas se solvataron con moléculas de agua utilizando el modelo de agua TIP3P. Se adicionaron iones sodio y cloruro para neutralizar y alcanzar una concentración de 0.15 M.

6.3.2. Dinámica molecular

Los sistemas se simularon en el programa GROMACS 5.1.⁴⁶ con el campo de fuerza CHARMM36m. Se minimizó la energía de los complejos empleando el algoritmo *steepest descent* (SD).⁴⁷ Los equilibrios isocórico-isotérmico (NVT) e isobárico-isotérmico (NPT) se simularon en un sistema cerrado utilizando el algoritmo de Verlet,⁴⁸ fijando la temperatura en 310 K y la presión en 1.0 bar, respectivamente.

La temperatura del sistema fue controlada con el termostato de Nosé-Hoover⁴⁹ y la presión con el baróstato de Parrinello-Rahman.⁵⁰ Las energías de repulsión y atracción entre pares se calcularon con el potencial de Lennard-Jones.⁵¹ Las interacciones electrostáticas de largo alcance se calcularon mediante el método simplificado de partícula en la malla de Ewald (PME).⁵² Para cada sistema se hicieron 5 réplicas (total 35 sistemas) de 500 ns cada una.

Se analizaron las trayectorias resultantes con las herramientas de GROMACS: *make_ndx*, *trcat*, *trjconv*, *select* (tomando como contactos ligando-residuo una distancia de 0.5nm).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha propuesto que los AINEs modulan al complejo de γ -secretasa a través de la unión con el sustrato APP, alterando el procesamiento proteolítico de la enzima.^{19,20,21} Para que estas moléculas puedan interactuar con APP, es necesario que presenten un perfil hidrofóbico que facilite su inserción en la membrana lipídica.⁴³ Los análogos de flurbiprofeno tienen una estructura con características anfifílicas, debido a que cuentan con una región polar (ácido carboxílico/carboxilato) y una región hidrofóbica (bifenilo). Se sabe que las moléculas que se unen a sitios de proteínas embebidos en membrana requieren de este tipo de características para poder ser insertados en la membrana. Esto último favorecería la hipótesis de que los análogos de flurbiprofeno actúen de esta manera.⁵³

Debido a las características anfifílicas de los análogos de flubiprofeno, se debe tomar en cuenta su estado de ionización. Ya que cuando la molécula se encuentra como ácido carboxílico, es más fácil que atraviese la membrana en comparación con el carboxilato.⁵⁴ Teniendo en cuenta lo anterior, se procedió a hacer el estudio QSAR de los modelos: moléculas protonadas y desprotonadas. Cabe mencionar que no se busca generar modelos predictivos, sino identificar el estado de ionización de los análogos de flurbiprofeno y las características que deben de tener para llevar a cabo su actividad.

7.1. Relación cuantitativa estructura-actividad

Se utilizó el servidor ChemDes para el cálculo de descriptores moleculares, obteniendo un aproximado de 2,800 descriptores. El algoritmo *Random Forest* permitió seleccionar a los descriptores que presentaban la mayor correlación con los datos de actividad, obteniendo entre 5 y 8 descriptores por cada sistema (protonado y desprotonado). Con la ayuda del algoritmo genético, se generaron 100 grupos de entrenamiento y de prueba, obteniéndose de entre 5 y 11

modelos por grupo. En la **Tabla 7.1** se muestran los 5 mejores modelos por grupo.

Tabla 7.1. Modelos lineales del estudio de relación cuantitativa estructura-actividad

Moléculas Protonadas							
Modelo	R	r²	r²_{adj}	S	F	P	q_{int}²
Log%inhAβ ₄₂ =CrippenLogP+AATS7v	0.731	0.535	0.501	0.167	16.08	2.24x10 ⁻⁵	0.471
Log%inhAβ ₄₂ = CrippenLogP + hmin	0.725	0.526	0.492	0.173	15.52	2.91x10 ⁻⁵	0.482
Log%inhAβ ₄₂ =CrippenLogP+ VR1_Dzp	0.719	0.518	0.483	0.174	15.03	3.68x10 ⁻⁵	0.382
Log%inhAβ ₄₂ = CrippenLogP	0.719	0.517	0.501	0.172	31.1	5.11x10 ⁻⁶	0.477
Log%inhAβ ₄₂ = MolLogP + VR1_Dzp	0.713	0.508	0.473	0.176	14.47	4.83x10 ⁻⁵	0.474
Moléculas Desprotonadas							
Log%inhAβ ₄₂ =CrippenLogP+AATS7v	0.766	0.586	0.557	0.159	19.85	4.26x10 ⁻⁶	0.536
Log%inhAβ ₄₂ = CrippenLogP + hmin	0.698	0.487	0.450	0.151	13.29	8.73x10 ⁻⁵	0.411
Log%inhAβ ₄₂ = CrippenLogP	0.695	0.483	0.465	0.149	27.04	1.45x10 ⁻⁵	0.373
Log%inhAβ ₄₂ = hmin + ATSe6	0.522	0.272	0.22	0.179	5.23	1.2x10 ⁻²	0.200
Log%inhAβ ₄₂ = ATSe6	0.522	0.272	0.247	0.176	10.83	2.62x10 ⁻³	0.085

Para la selección del mejor modelo se tomaron en cuenta los estadísticos. El primer estadístico que se considero fue el coeficiente de correlación de Pearson (r), que permite analizar la correlación entre descriptores. Cuando $r > 0.6$ se dice que hay una buena correlación entre los descriptores utilizados en el modelo. Por lo que, como primer filtro, se eligieron a los modelos que cumplían con este criterio.

El coeficiente de determinación (r^2) explica la proporción de la varianza de los descriptores, por tanto, la calidad de los modelos. Mientras aumenta el número de descriptores se observa que r^2 aumenta, por lo que valores altos de r^2 no siempre es un indicativo de un buen modelo. Para esto, es necesario tomar en cuenta el coeficiente de determinación ajustado (r^2_{adj}), con el cual se puede evitar el sobreajuste de los datos; tomando en cuenta los modelos que muestren mayor r^2_{adj} .

El estadístico F de Fisher permite demostrar la importancia general de los coeficientes de regresión, la relación de varianza y evita el sobreajuste del modelo. El valor de probabilidad (p) muestra la probabilidad de que la relación se deba al azar, esta debe ser $p < 0.05$. Finalmente, el ultimo estadístico tomado en cuenta es el estadístico de validación interna cruzada (q^2_{int}), que considera que un modelo con valor de $q^2_{int} > 0.5$ tienen una buena predicción.^{55,56,57}

Los modelos que mostraron mejores valores estadísticos son los que contenían los descriptores CrippenLogP y AATS7v. Para encontrar el mejor grupo de entrenamiento y de prueba del conjunto de análogos de flurbiprofeno protonados y desprotonados se generaron 100,000 modelos con los mismos descriptores, escogiendo el modelo de cada grupo que mostraba los mejores estadísticos, comprobando que el grupo de prueba se encontrara dentro del rango de predicción del grupo de entrenamiento. Al tener los mejores modelos se verificó que el grupo de entrenamiento y de prueba, para cada grupo, fueran los mismos para compararlos (**Tabla 7.2**).

Tabla 7.2. Mejores modelos de cada grupo de análogos de flurbiprofeno.

Moléculas Protonadas							
Modelo	R	r ²	r ² _{adj}	S	F	P	q _{int} ²
Log%inhAβ ₄₂ = CrippenLogP + AATS7v	0.872	0.759	0.742	0.107	42.66	4.39x10 ⁻⁰⁹	0.742
%InhAβ ₄₂ = 0.199 (± 0.023) CrippenLogP + 0.004 (± 0.001) AATS7v + 0.009 (± 0.229)							
Moléculas Desprotonadas							
Log%inhAβ ₄₂ = CrippenLogP + AATS7v	0.712	0.507	0.470	0.153	13.88	7.15x10 ⁻⁰⁵	0.399
Log%InhAβ ₄₂ = 0.158 (± 0.032) CrippenLogP + 0.003 (± 0.001) AATS7v + 0.525 (± 0.291)							

En la **Figura 7.1**. se muestran los gráficos de porcentaje de inhibición de Aβ₄₂ observado contra porcentaje de inhibición de Aβ₄₂.

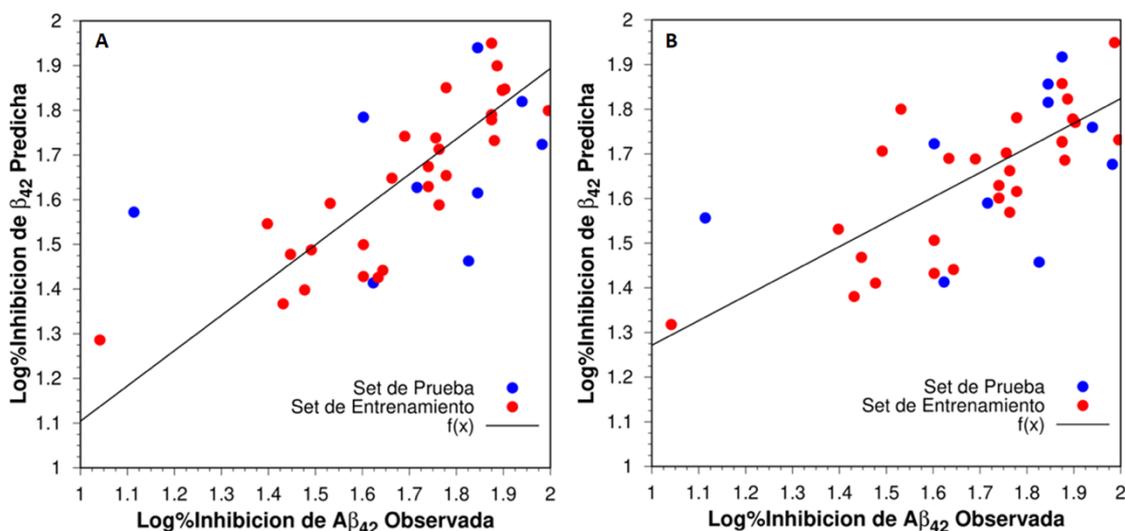


Figura 7.1. Graficas de actividad predicha contra actividad observada de análogos de flurbiprofeno (A) protonados, (B) desprotonados.

El modelo que muestra los mejores valores estadísticos y la menor dispersión de datos es el de análogos de flurbiprofeno protonados. La mayoría de los modelos que se obtuvieron durante el estudio QSAR incluían el descriptor LogP (con diferentes métodos de cálculo), que representa la constante de reparto octanol-agua.

La presencia del descriptor CrippenLogP en la ecuación de análogos de flurbiprofeno protonados (**Tabla 7.2**) sugiere una dependencia directa del comportamiento hidrofóbico de las estructuras con la actividad biológica, debido a la capacidad de las moléculas para embeberse en la membrana.⁵⁸ Por lo tanto, valores altos de LogP mejoran la actividad inhibitoria debido a que existe mayor probabilidad de inserción, permanencia, movilidad en la membrana e interacciones con el péptido.⁵⁹

El segundo descriptor del modelo es AATS7v, el cual correlaciona la distribución del volumen de Van der Waals en cada átomo de la molécula. Los compuestos más activos muestran un índice AATS7v mayor, lo cual también podría estar asociado con la inserción de las moléculas en la membrana, así como con el número de interacciones

hidrofóbicas entre los análogos de flurbiprofeno con los residuos hidrófobos de C99.^{60,61}

7.2. Dinámica molecular de C99₁₅₋₅₅ con ligandos

Con base en la información del mejor modelo QSAR obtenido en la sección anterior, se empleó el estado protonado de los derivados de flurbiprofeno. Las moléculas que se seleccionaron para DM fueron: *flurbiprofeno*, *compuesto 5j*, *compuesto 13b* y *compuesto 16a*, por ser los compuestos más activos de la serie de análogos; y *colesterol* para poder comparar los sitios de unión.

Los sistemas que se generaron están conformados por 100 moléculas de POPC en la bicapa lipídica (gris), C99₁₅₋₅₅ (azul) y 10 moléculas de colesterol o análogos de flurbiprofeno (amarillo) en la monocapa superior e inferior, respectivamente (**Figura 6.1**). Para ver la competencia entre el colesterol y análogos de flurbiprofeno, se generaron sistemas con 100 moléculas de POPC, C99₁₅₋₅₅, 5 moléculas de colesterol y 5 moléculas de flurbiprofeno en ambas monocapas.

Se obtuvieron un total de 7 sistemas C99₁₅₋₅₅-POPC-compuesto, constituidos por: (1) *colesterol*, (2) *flurbiprofeno*, (3) *compuesto 5j*, (4) *compuesto 13b*, (5) *compuesto 16a*, (6) *colesterol-flurbiprofeno* y (7) *colesterol-16a*. Por cada sistema se hicieron 5 réplicas con un tiempo de simulación de 500ns, obteniendo un total de 2,50 μ s por sistema.

Para todos los sistemas se analizó el factor de ocupación que existía en cada residuo de C99₁₅₋₅₅. El primer análisis que se hizo de las trayectorias es el de factor de ocupación de los residuos de C99₁₅₋₅₅ tomando en cuenta una distancia de 0.5 nm entre residuo y molécula como contacto. Para ejemplificar los análisis de todos los sistemas, se muestra el análisis que se hicieron al sistema de flurbiprofeno. En la **Figura 7.2** se muestra el análisis de factor de ocupación de las moléculas de flurbiprofeno (eje X, 100 debido a que cada replica tiene

20 moléculas y son 5 réplicas) con los residuos de C99₁₅₋₅₅ (eje Y). El código de color de la figura muestra el factor de ocupación que tiene cada molécula de flurbiprofeno con los residuos de C99₁₅₋₅₅. En color negro se representan las regiones con un factor de ocupación de 0 (no hubo contacto con el residuo de C99) y amarillo un factor de ocupación de 1 (en toda la dinámica hubo contacto de flurbiprofeno con algún residuo de C99).

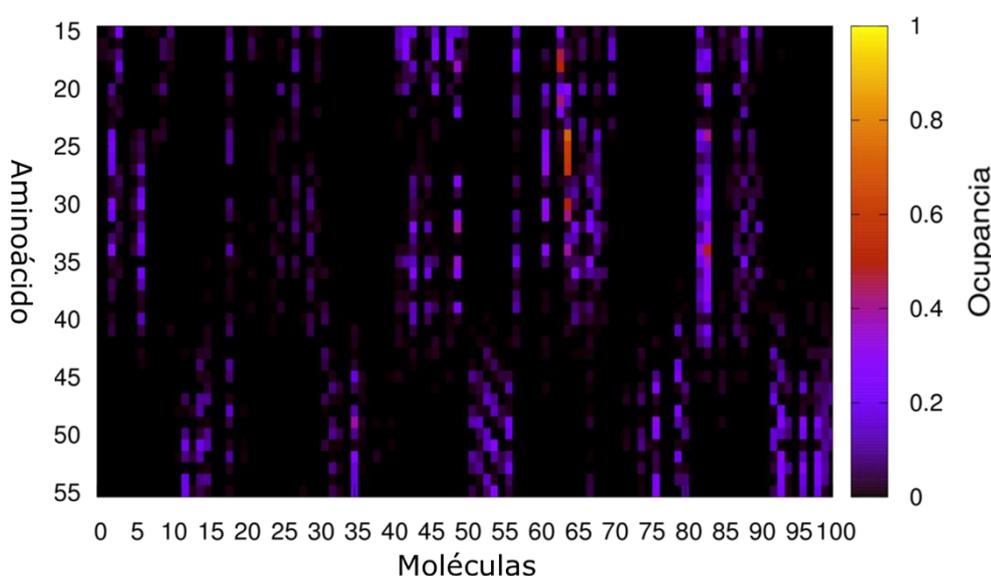


Figura 7.2. Factor de ocupación de las réplicas de flurbiprofeno.

Con base en el análisis anterior, se tomaron las trayectorias que mostraban un factor de ocupación ≥ 0.5 , seleccionando únicamente a la o las moléculas que cumplían con este criterio. Las trayectorias de los ligandos seleccionados que se unieron a la proteína se les analizó el número de contactos, tomando en cuenta como contacto una distancia de 0.5 nm.

En la **Figura 7.3A** se muestra el gráfico del factor de ocupación de flurbiprofeno con los residuos de C99₁₅₋₅₅, representándose en amarillo el sitio de unión del colesterol propuesto por Panahi et. al.⁶² En la **Figura 7.3B** se representa la estructura del péptido C99₁₅₋₅₅, mostrándose en código de color el factor de ocupación por residuo de C99₁₅₋₅₅. Finalmente, se dividió a C99₁₅₋₅₅ en tres para tener una mejor

representación de los contactos del ligando en cada sección del péptido (**Figura 7.3C**): hélice yuxtamembranal (Y), fragmento N-terminal de la hélice transmembranal (TMN) y fragmento C-terminal de la hélice transmembranal (TMC). Tomando en cuenta que las interacciones entre los análogos de flurbiprofeno y C99₁₅₋₅₅ se dan por una cara del péptido (debido a que C99 es una hélice), se dividió en cuadrantes cada parte de C99, considerando que cada giro de una hélice es de 3.6 aminoácidos por vuelta.

En la **Tabla 7.3** se muestran los aminoácidos que conforman cada cuadrante.

Tabla 7.3. Composición de los cuadrantes de C99₁₅₋₅₅

Hélice Yuxtamembranal		TMN-terminal		TMC-terminal	
Cuadrante	Aminoácidos	Cuadrante	Aminoácidos	Cuadrante	Aminoácidos
Y1	Q15, F19, D23, N27	TMN1	K28, I32, V36, V40	TMC1	I41, I45, L49, K53
Y2	K16, F20, V24	TMN2	G29, G33, G37	TMC2	A42, V46, V50
Y3	L17, A21, G25	TMN3	A30, L34, G38	TMC3	T43, I47, M51
Y4	V18, E22, S26	TMN4	K31, M35, V39	TMC4	V44, T48, L52

En la **Figura 7.3**, se puede observar que el flurbiprofeno tiene preferencia por la hélice yuxtamembranal, específicamente con el cuadrante Y3 (**Tabla 7.3**). Uno de los aminoácidos que componen este cuadrante es L17. Se ha visto que pentapéptidos de A β ₁₇₋₂₃ que presentan este aminoácido en específico inhiben la actividad de γ -secretasa.⁶³ Además, este cuadrante también incluye al aminoácido G25, aminoácido propuesto como blanco de mutaciones que provocan un aumento en la producción del péptido A β ₃₈ y una disminución del péptido A β ₄₂, esto debido a un cambio conformacional que aumenta la distancia entre APP y PS-1.^{20,53} Esto sugiere que la unión a este

cuadrante es importante para la modulación y la producción de la isoforma $A\beta_{38}$.

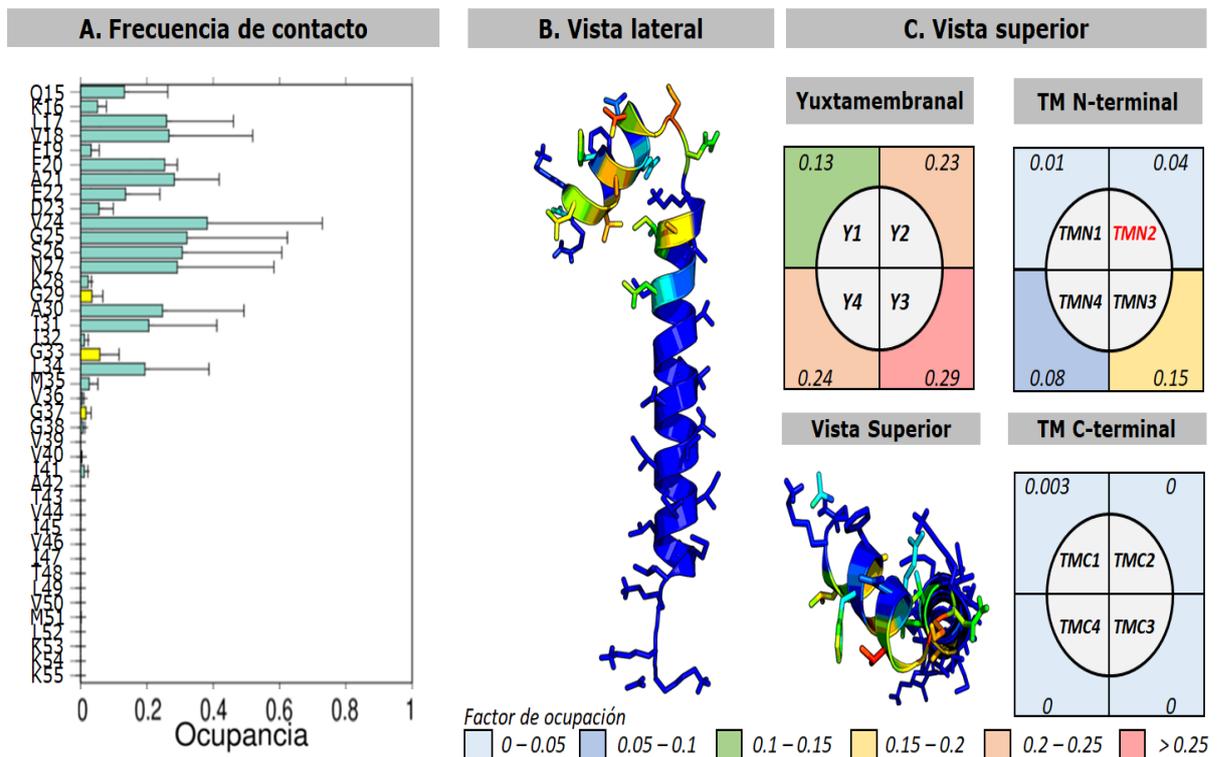


Figura 7.3. **A.** Factor de ocupación por residuo en el sistema de flurbiprofeno. **B.** Vista lateral del factor de ocupación de C99₁₅₋₅₅, donde azul es un factor de ocupación de 0 y rojo es un factor de ocupación de 0.4 **C.** Representación por cuadrantes del factor de ocupación, en letras rojas se muestra el sitio de unión del colesterol.

En el sistema de colesterol (**Figura 7.4**), se encontró que dicha molécula muestra una preferencia por la TM N-terminal en los cuadrantes TMN1 y TMN2, sugiriendo que el colesterol se une a la interfaz de los aminoácidos correspondiente a cada cuadrante. Esto corresponde con el sitio de unión propuesto para colesterol por diversos grupos de investigación, presente en el cuadrante TMN2.^{62,64,65,66} Cabe mencionar que los aminoácidos en el cuadrante TMN2 tienen hidrogeno como cadena lateral, esto podría explicar el menor factor de ocupación en comparación con TMN1. En el fragmento TM C-terminal, los cuadrantes TMC1 y TMC2 tienen un factor de ocupación mayor a 0.1, esto puede deberse a las interacciones de la cadena alifática del colesterol con los aminoácidos de estos cuadrantes.

Para todos los demás sistemas se desarrolló el mismo análisis (**Anexo I, sección 10.1**). Al compararlos entre si, se encontró que los sistemas con análogos de flurbiprofeno y los sistemas con colesterol (**Figura 7.4**) no muestran similitudes en el factor de ocupación calculado por cuadrante. Sugiriendo que los análogos de flurbiprofeno no se unen al mismo sitio de unión de colesterol.

La mayoría de los análogos de flurbiprofeno, muestran una alta preferencia por el cuadrante Y3 de la hélice yuxtamembranal (**Figura 7.4**). Los análogos con mayor actividad también muestran una preferencia por el fragmento TM N-terminal, en los cuadrantes TNM3 y TMN4. El cuadrante TMN3 cuenta con el aminoácido G38, que junto con G37, se han demostrado como los aminoácidos responsables de dar flexibilidad para que C99 pueda interactuar con γ -secretasa. Adicionalmente, se ha encontrado que restricciones de estos aminoácidos conducen a una escisión alterada y producción de isoformas $A\beta_{37}$, sugiriendo que la unión a este cuadrante disminuye la flexibilidad de C99 provocando la producción de isoformas cortas de $A\beta$.⁶⁷ A diferencia del *flurbiprofeno* y el *compuesto 5j*, los *compuestos 13b* y *16a* mostraron contactos con la región C-terminal del péptido debido a que estas moléculas presentan sustituyentes más voluminosos ((ciclohexiloxi)bifenilo y triifenilo, respectivamente), lo que aumenta la superficie de contacto de las mismas.

Finalmente, para los sistemas en presencia de una mezcla de colesterol-compuesto (**Figura 7.5**) se llevó a cabo el mismo análisis que en los sistemas anteriores. Sin embargo, para el análisis de cuadrantes solo se tomaron en cuenta las moléculas que tenían un factor de ocupación de 0.4, debido a que el factor de ocupación en todos los sistemas fue menor a 0.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

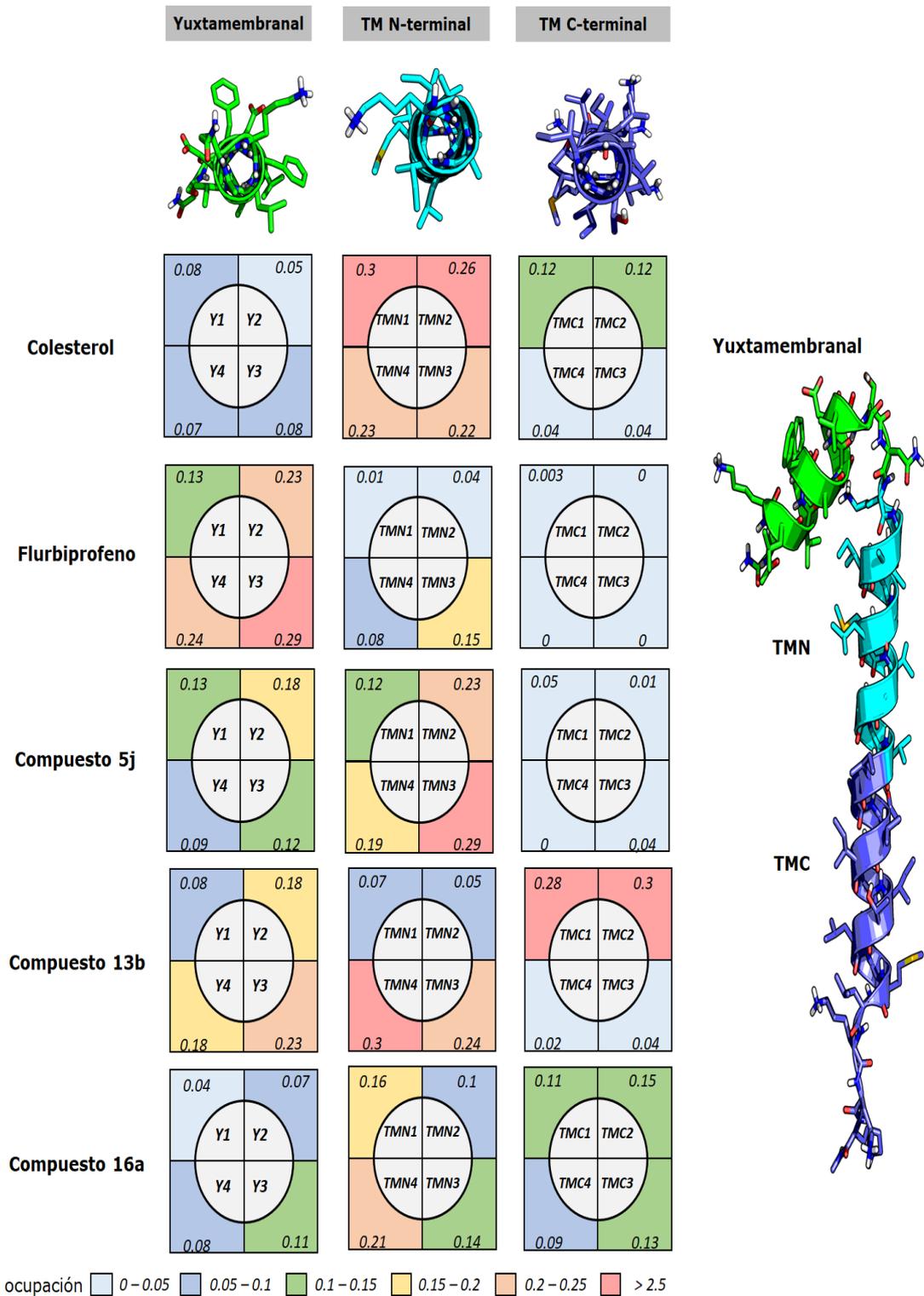


Figura 7.4. Factor de ocupación de cada sistema dividido por cuadrantes dependiendo del fragmento de C99₁₅₋₅₅ (en verde la hélice yuxtamembranal, en azul el fragmento TM N-terminal, en morado el fragmento TM C-terminal).

Nuestros resultados muestran que no hay competencia entre las moléculas de *colesterol* y los *análogos de flurbiprofeno* y que la disminución en el factor de ocupación se debe a la menor cantidad de moléculas presentes en los sistemas combinados en comparación con el sistema que sólo tiene colesterol. El factor de ocupación en el *compuesto 16a* y el *flurbiprofeno* en la hélice yuxtamembranal disminuye, debido al impedimento estérico, ya que, al unirse las moléculas de colesterol al cuadrante TMN2 se desplazan las moléculas de *flurbiprofeno* o *compuesto 16a*, evitando su unión a Y3 y TMN3. El factor de ocupación de *flurbiprofeno* en el fragmento TM C-terminal en los cuadrantes TMC3 y TMC4, también puede ser causado por el desplazamiento de las moléculas de colesterol, debido a que en el sistema con únicamente *flurbiprofeno* no hay contacto con estos cuadrantes.

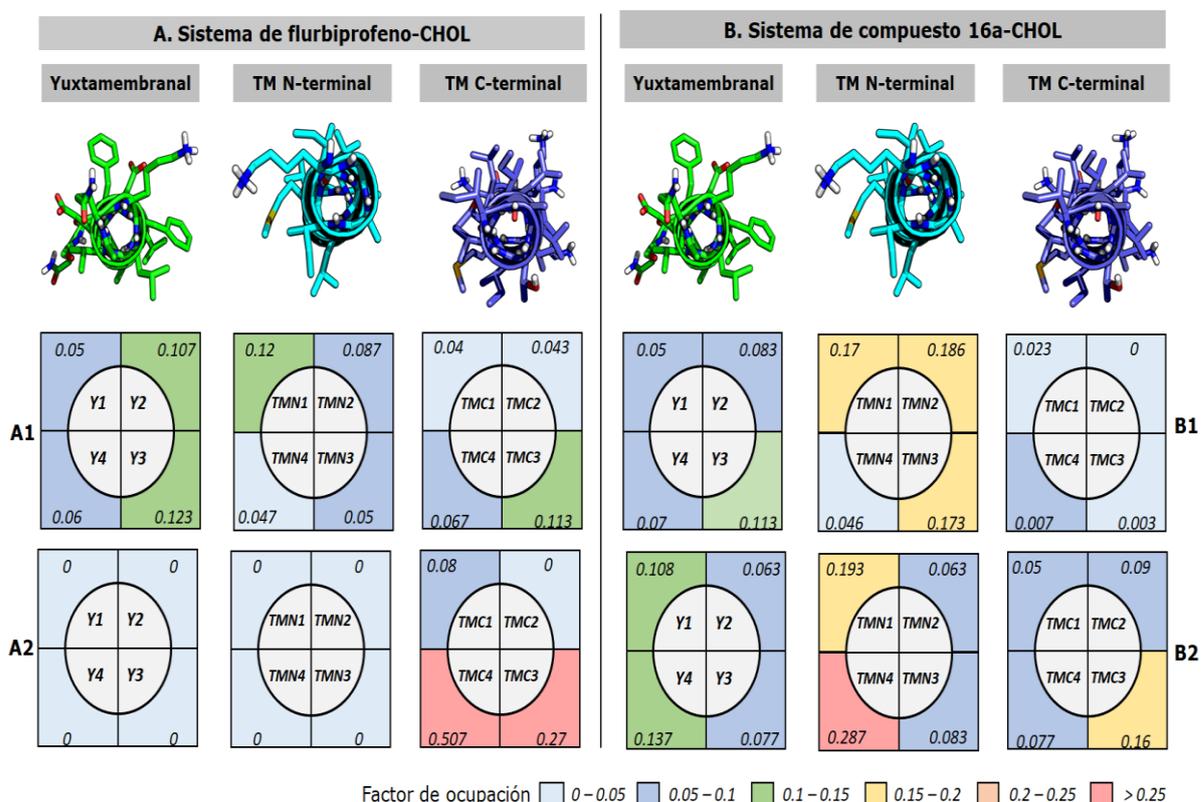


Figura 7.5. Factor de ocupación por cuadrantes de los sistemas combinados. **A.** Sistema de flurbiprofeno-CHOL **A1.** Colesterol, **A2.** Flurbiprofeno. **B.** Sistema de compuesto 16a-CHOL, **B1.** colesterol, **B2.** Compuesto 16a.

8. CONCLUSIONES

Con la ayuda de herramientas computacionales se lograron identificar características de los análogos de flurbiprofeno indispensables para que estos puedan ejercer su actividad. Además, se logró proponer un posible sitio de unión de estas moléculas a C99.

Con la información biológica y estructural recopilada de los análogos de flurbiprofeno, se lograron utilizar descriptores moleculares para generar modelos QSAR. Para la generación de estos modelos se utilizó *Random Forest* y algoritmo genético los cuales ayudaron a disminuir el tiempo de generación de cada uno de estos modelos, adecuándolos y validándolos con métodos estadísticos. El descriptor CrippenLogP permitió dar a conocer la importancia de las características hidrofóbicas de las moléculas y el descriptor AATS7v pudo identificar interacciones entre los ligandos y C99. Además, de acuerdo con los mejores valores estadísticos de cada modelo, se lograron construir los sistemas adecuados para el estudio de DM.

Con ayuda de la DM se pudo identificar que los análogos de flurbiprofeno no compiten por el sitio de unión del colesterol al no unirse al mismo sitio en C99. Estos se unen preferentemente a la hélice yuxtamembranal y al fragmento TM N-terminal cercano a sitio de unión del colesterol. Sugiriendo que existe una posible interferencia con el sitio de reconocimiento entre C99 y γ -secretasa.

9. PERSPECTIVAS

A partir de los modelos QSAR generados, proponer modificaciones estructurales a los análogos de flurbiprofeno, para mejorar la actividad y puedan ser propuestos como candidatos para la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer. Evaluación de las interacciones proteína-ligando propuestas en sistemas compuestos por una bicapalipídica, C99, γ -secretasa, colesterol y análogos de flurbiprofeno, para verificar la unión de estos ligandos.

10. REFERENCIAS

1. World Health Organization. (2018). Demencia. [online] Disponible en: <http://www.who.int/es> [Acceso Junio 2018].
2. Alz.co.uk. (2018). *Alzheimer's Disease International*. [online] Disponible en: <https://www.alz.co.uk/> [Acceso Junio 2018].
3. Alz.org. (2017). *Alzheimer's Disease & Dementia | Alzheimer's Association*. [online] Disponible en: https://www.alz.org/espanol/about/el_alzheimer_y_el_cerebro.asp [Acceso Junio, 2018].
4. Hickman, R., Faustin, A. and Wisniewski, T. (2016). Alzheimer Disease and Its Growing Epidemic. *Neurologic Clinics*, 34(4), pp.941-953.
5. Mudher, A., Colin, M., Dujardin, S., Medina, M., Dewachter, I., Alavi Naini, S., Mandelkow, E., Mandelkow, E., Buée, L., Goedert, M. and Brion, J. (2017). What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation?. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1).
6. Downing, K. (2000). Structural Basis for the Interaction of Tubulin with Proteins and Drugs that Affect Microtubule Dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), pp.89-111.
7. Imahori, K. (2010). The biochemical study on the etiology of Alzheimer's disease. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 86(1), pp.54-61.
8. Binder, L., Guillozet-Bongaarts, A., Garcia-Sierra, F. and Berry, R. (2005). Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739(2-3), pp.216-223.

9. Alzheimer-riese.it. (2018). *Associazione Alzheimer Riese*. [online] Disponible en: <https://www.alzheimer-riese.it/> [Acceso Julio 2018].
10. O'Brien, R. and Wong, P. (2011). Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev. Neurosci*, 34:185-204
11. Aguayo-Ortiz, R. and Dominguez, L. (2016). Generation of Amyloid- β Peptides by γ -Secretase. *Israel Journal of Chemistry*, 57(7-8), pp.574-585.
12. Deatherage, C., Lu, Z., Kroncke, B., Ma, S., Smith, J., Voehler, M., McFeeters, R. and Sanders, C. (2017). Structural and biochemical differences between the Notch and the amyloid precursor protein transmembrane domains. *Science Advances*, 3(4), p.e1602794.
13. Ball, K., Phillips, A., Wemmer, D. and Head-Gordon, T. (2013). Differences in β -strand Populations of Monomeric A β 40 and A β 42. *Biophysical Journal*, 104(12), pp.2714-2724.
14. Tan Y, Deng Y, Qing H. Calcium channel blockers and Alzheimer's disease. (2012) *Neural Regen Res*; 7:137-40
15. Lu, P., Bai, X., Ma, D., Xie, T., Yan, C., Sun, L., Yang, G., Zhao, Y., Zhou, R., Scheres, S. and Shi, Y. (2014). Three-dimensional structure of human γ -secretase. *Nature*, 512(7513), pp.166-170.
16. Wolfe, M. (2010). Structure, mechanism and inhibition of γ -secretase and presenilin-like proteases. *Biological Chemistry*, 391(8).
17. Tan, Y., Zhang, Q., G. Wong, S. and Hua, Q. (2015). Anti-Alzheimer Therapeutic Drugs Targeting γ -Secretase. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(5), pp.549-557. Golde, T., Koo, E., Felsenstein, K., Osborne, B. and Miele, L. (2013). γ -Secretase inhibitors and modulators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(12), pp.2898-2907.

18. Bursavich, M., Harrison, B. and Blain, J. (2016). Gamma Secretase Modulators: New Alzheimer's Drugs on the Horizon?. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(16), pp.7389-7409.
19. Kukar TL, Ladd TB, Bann MA, Fraering PC, Narlawar R, Maharvi GM, Healy B, Chapman R, Welzel AT, Price RW, Moore B, Rangachari V, Cusack B, Eriksen J, Jansen-West K, Verbeeck C, Yager D, Eckman C, Ye W, Sagi S, Cottrell BA, Torpey J, Rosenberry TL, Fauq A, Wolfe MS, Schmidt B, Walsh DM, Koo EH, Golde TE. Substrate-targeting gamma-secretase modulators. *Nature*. 2008; 453:925–929.
20. Crump, C., Johnson, D. and Li, Y. (2018). *Development and Mechanism of γ -Secretase Modulators for Alzheimer's Disease*.
21. Richter, L., Munter, L., Ness, J., Hildebrand, P., Dasari, M., Unterreitmeier, S., Bulic, B., Beyermann, M., Gust, R., Reif, B., Weggen, S., Langosch, D. and Multhaup, G. (2010). Amyloid beta 42 peptide (A 42)-lowering compounds directly bind to A and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), pp.14597-14602.
22. Johnson, D. and Pettersson, M. (2017). γ -Secretase Modulators as A β 42-Lowering Pharmacological Agents to Treat Alzheimer's Disease. *Topics in Medicinal Chemistry*, pp.87-118.
23. Eriksen, J.L.; Sagi, S.A.; Smith, T.E.; Weggen, S.; Das, P.; Mclendon, D.C.; Ozols, V.V.; Jessing, K.W.; Zavitz, K.H.; Koo, E.H.; Golde, T.E. NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112(3), 440-449.
24. Gijssen, H.J.; Mercken, M. γ -Secretase Modulators, Can We Combine Potency with Safety? *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 2012(295207), 1-10.
25. Schrödinger Release 2017-4: *Maestro*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.

26. Peretto, I., Radaelli, S., Parini, C., Zandi, M., Raveglia, L., Dondio, G., Fontanella, L., Misiano, P., Bigogno, C., Rizzi, A., Riccardi, B., Biscaioli, M., Marchetti, S., Puccini, P., Catinella, S., Rondelli, I., Cenacchi, V., Bolzoni, P., Caruso, P., Villetti, G., Facchinetti, F., Del Giudice, E., Moretto, N. and Imbimbo, B. (2005). Synthesis and Biological Activity of Flurbiprofen Analogues as Selective Inhibitors of β -Amyloid1-42Secretion. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(18), pp.5705-5720.
27. Cao, D., Xu, Q., Hu, Q. and Liang, Y. (2013). ChemoPy: freely available python package for computational biology and chemoinformatics. *Bioinformatics*, 29(8), pp.1092-1094.
28. BlueDesc
(http://www.ra.cs.unituebingen.de/software/bluedesc/welcome_e.html).
29. RDKit (<http://sourceforge.net/projects/rdkit/>).
30. CDK Descriptor Calculator
(<http://www.rguha.net/code/java/cdkdesc.html>).
31. O'Boyle, N., Banck, M., James, C., Morley, C., Vandermeersch, T. and Hutchison, G. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1), p.33.
32. Yap, C. (2010). PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. *Journal of Computational Chemistry*, 32(7), pp.1466-1474.
33. Computational Biology & Drug Design Group: 2012-2017: ChemDes, An integrated web-based platform for molecular descriptor and fingerprint computation, *School of Pharmaceutical Sciences*, Central South University. (2017).
34. Genuer, R. and Poggi, J.M. and Tuleau-Malot, C. (2015), VSURF: An R Package for Variable Selection Using Random Forests, *The R Journal*. 7(2):19-33
35. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for

- Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
36. Buckland et al. 1997. Model selection: an integral part of inference. Biometrics. Burnham & Anderson. (2002). *Model Selection and Multimodel Inference. An Information Theoretic Practical Approach*.
 37. Ishikawa, T., Hirano, H., Saito, H., Sano, K., Ikegami, Y., Yamaotsu, N. and Hirono, S. (2012). Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Analysis to Predict Drug-Drug Interactions of ABC Transporter ABCG2. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(6), pp.505-514.
 38. Nadezhdin, K., Bocharova, O., Bocharov, E. and Arseniev, A. (2017). Structural and dynamic study of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. [online] *Rcsb.org*. Disponible en: <https://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2llm> [Acceso 16 Nov. 2017].
 39. www.rcsb.org H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. (2000) *The Protein Data Bank Nucleic Acids Research*, 28: 235-242.
 40. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H., Mosberg HI, Lomize AL (2012) OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* 40 (Database issue), D370-D376.
 41. Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I. and Mackerell, A. (2009). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, p.NA-NA.

42. B.R. Brooks, *et. al.* (2009) CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J. Comput. Chem.* 30:1545-1614
43. J. Lee, *et. al.* (2016) CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM
44. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H., Mosberg HI, Lomize AL (2012) OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* 40 (Database issue), D370-D376.
45. DeLano, W. L. (2002). PyMOL. *DeLano Scientific*, San Carlos, CA, 700.
46. Pronk, et al. (2013) *Bioinformatics* 29 845-854.
47. Goldstein, A. (1965). On Steepest Descent. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics Series A Control*, 3(1), pp.147-151.
48. Grubmüller, H., Heller, H., Windemuth, A. and Schulten, K. (1991). Generalized Verlet Algorithm for Efficient Molecular Dynamics Simulations with Long-range Interactions. *Molecular Simulation*, 6(1-3), pp.121-142.
49. Evans, D. and Holian, B. (1985). The Nose–Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics*, 83(8), pp.4069-4074.
50. Parrinello, M. and Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52(12), pp.7182-7190.
51. Lennard-Jones, J. (1931). Cohesion. *Proceedings of the Physical Society*, 43(5), pp.461-482.
52. Ewald, P. (1921). Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Annalen der Physik*, 369(3), pp.253-287.
53. Yin, H. and Flynn, A. (2016). Drugging Membrane Protein Interactions. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 18(1), pp.51-76.

54. Postila, P., Vattulainen, I. and Róg, T. (2016). Selective effect of cell membrane on synaptic neurotransmission. *Scientific Reports*, 6(1).
55. Echa.europa.eu. (2018). [online] Disponible en: https://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_qsars_es.pdf/f0b8a10a-fa73-43a7-8e53-b2a8990f4fb5 [Acceso Octubre, 2019].
56. Roy, K., Kar, S., Das, R.N. (2015). *A Primer on QSAR/QSPR Modeling - Fundamental Concepts*. Springer.
57. Goode Romero, G. (2017). *Estudio computacional del heterotetrámero de tubulinas y su interacción con estabilizadores microtubulares, con aplicación en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer*. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
58. Veber, D., Johnson, S., Cheng, H., Smith, B., Ward, K. and Kopple, K. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), pp.2615-2623.
59. Pajouhesh, H. and Lenz, G. (2005). Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRX*, 2(4), pp.541-553.
60. Hollas, B. (2003). An Analysis of the Autocorrelation Descriptor for Molecules. *Journal of Mathematical Chemistry*, 33(2), pp.91 - 101.
61. Pla-Franco, J., Gálvez-Llompарт, M., Gálvez, J. and García-Domenech, R. (2011). Application of Molecular Topology for the Prediction of Reaction Yields and Anti-Inflammatory Activity of Heterocyclic Amidine Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(2), pp.1281-1292.
62. Panahi, A., Bandara, A., Pantelopulos, G., Dominguez, L. and Straub, J. (2016). Specific Binding of Cholesterol to C99 Domain of Amyloid Precursor Protein Depends Critically on

- Charge State of Protein. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(18), pp.3535-3541.
63. Tian, Y., Bassit, B., Chau, D. and Li, Y. (2010). An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates γ -secretase activity for A β production. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(2), pp.151-158.
64. Munter, L., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D. and Multhaup, G. (2007). GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of A β 42. *The EMBO Journal*, 26(6), pp.1702-1712.
65. Uemura, K., Farner, K., Hashimoto, T., Nasser-Ghodsi, N., Wolfe, M., Koo, E., Hyman, B. and Berezovska, O. (2010). Substrate docking to γ -secretase allows access of γ -secretase modulators to an allosteric site. *Nature Communications*, 1(8), p.130.
66. Li, C., Xu, Q., Gu, R., Qu, J. and Wei, D. (2017). The dynamic binding of cholesterol to the multiple sites of C99: as revealed by coarse-grained and all-atom simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(5), pp.3845-3856.
67. Goetz, A., Mylonas, N., Hoegel, P., Silber, M., Heinel, H., Menig, S., Vogel, A., Freyrer, H., Huster, D., Luy, B., Langosch, D., Scharnagl, C., Muhle-Goll, C., Kamp, F. and Steiner, H. (2018). Modulating hinge flexibility in the APP transmembrane domain alters γ -secretase cleavage.
68. López Vallejo, F., Medina Franco, J. and Castillo, R. (2006). Diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química*, 17(4), pp.452-455.
69. Goode-Romero, G., Aguayo-Ortiz, R. and Domínguez Dueñas, L. (2018). ¿Cómo realizar estudios de relaciones cuantitativas estructura-actividad/propiedad en dos dimensiones

- (QSAR/QSPR-2D) con el programa R?. *Educación Química*. (En revisión)
70. Consonni, V. and Todeschini, R. (2009). Molecular Descriptors. *Recent Advances in QSAR Studies*, pp.29-102.
 71. Devillers, J. (1996). *Genetic algorithms in molecular modeling*. 1st ed. London: Academic Press, pp.131 - 157.
 72. Breiman, L. Random forests. *Machine Learning* (2001). *The Mathematics of Generalization*. 45, 5-32. (9); Wolpert, D. H., Ed.; Addison-Wesley: Reading, 1995.
 73. J.H. Friedman, T. Hastie, R. Tibshirani, *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference and Prediction*, Springer-Verlag, New York, 2008.
 74. Louppe, G. (2014). *Understanding Random Forest: From Theory Practice*. PhD. University of Liège.
 75. D. Rapaport, *The art of molecular dynamics simulation*, Cambridge University Press, New York, Second. 2004
 76. Allen, M. (2004). Introduction to molecular dynamics simulation. *Comput. Soft Matter From Syth. Polym. to proteins*. 23, 1-28
 77. Leach, A. R. *Molecular modelling: principles and applications*. (Prentice Hall, 2001).
 78. Verlet, L. Computer 'experiments' on classical fluids I. Thermodybamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* 159, 98-103 (1967).
 79. Schrödinger Release 2017-4: *Maestro*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.

11. ANEXO I

11.1. Relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR)

La suposición básica para los estudios QSAR está basada en la hipótesis de que moléculas similares tienen actividades similares, a este principio se le llama Relación Estructura-Actividad (SAR, por sus siglas en inglés). Puede definirse como la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos para encontrar relaciones empíricas de la forma:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_jx_j + \epsilon$$

donde y es la actividad o propiedad de las moléculas; x son los descriptores moleculares; β es el coeficiente asociado al descriptor y ϵ es el error asociado.^{68,69}

Los descriptores moleculares son representaciones matemáticas de una molécula, obtenida mediante un algoritmo o un procedimiento experimental,⁶⁸ siendo propiedades estructurales, geométricas, topológicas, de autocorrelación, etc. Dependiendo de la dimensionalidad de los descriptores, existen métodos QSAR en una dimensión (QSAR), dos dimensiones (QSAR-2D) tomando en cuenta la dimensionalidad de una molécula en términos de índices de conectividad, y tres dimensiones (QSAR-3D) que describen interacciones no covalentes, orientaciones de las moléculas.⁷⁰

Un modelo QSAR está basado en dos hipótesis: 1) los compuestos ejercen su actividad mediante un mismo mecanismo; por lo cual, si el mecanismo de acción no se conoce, se asume que todos los compuestos evaluados comparten el mismo mecanismo, 2) existe una relación entre las propiedades y la estructura molecular. Por lo tanto, se busca establecer relaciones matemáticas para describir y extrapolar una o varios descriptores moleculares para explicar una propiedad.⁶⁹

11.2. Algoritmo genético

El algoritmo genético es un método de búsqueda inspirado en la evolución poblacional, donde los cromosomas más aptos pueden pasar sus características a las siguientes generaciones. Las variables (descriptores) se representan como genes en un cromosoma (modelo).^{71,72} La evolución de un grupo de modelos iniciales aleatorios para mejorar su aptitud se hace mediante la selección natural, mutaciones y recombinaciones.

La selección natural garantiza la propagación del cromosoma con mejor función de aptitud a las siguientes generaciones. Para mejorar esta función de aptitud se pueden utilizar operaciones como la recombinación o la mutación. En la recombinación los cromosomas anteriormente seleccionados pueden recombinarse produciendo dos descendientes. En la mutación, se hace un cambio local en el cromosoma como se muestra en la Figura 11.1.⁷³

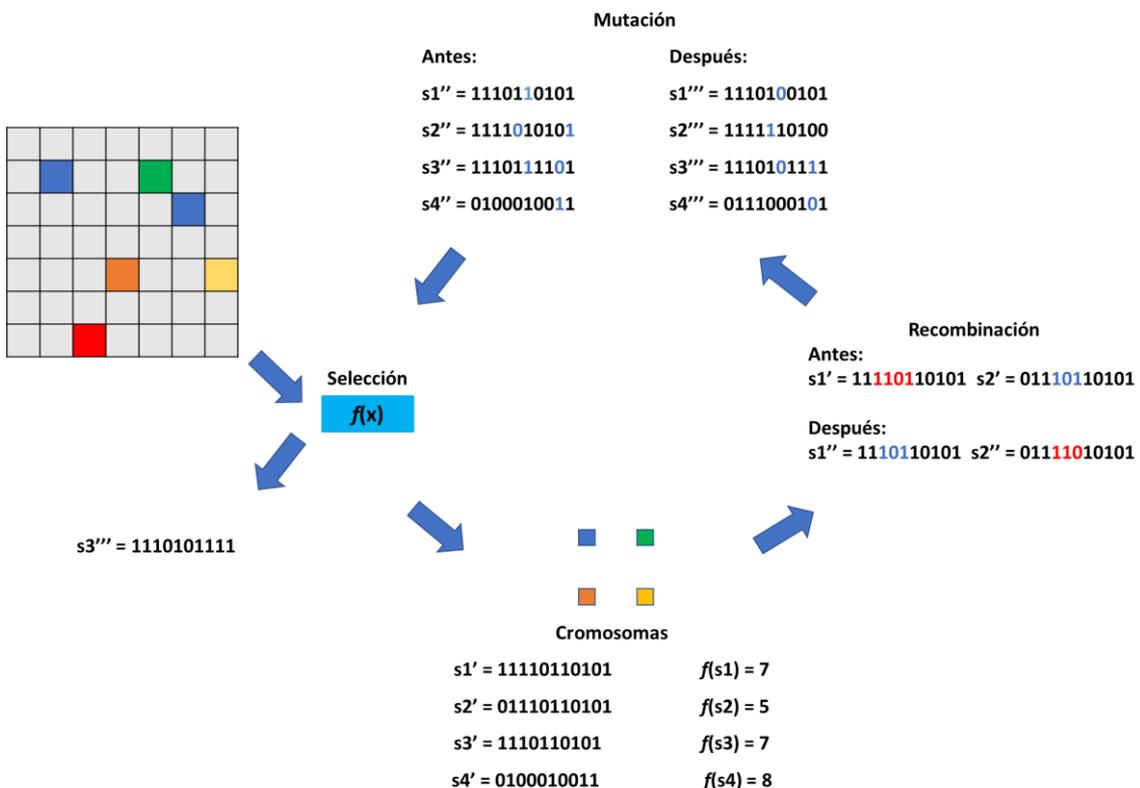


Figura 11.1 Etapas de algoritmo genético algoritmo genético.

11.3. *Random Forest*

El algoritmo *Random Forest* (**Figura 11.2**) es un método de aprendizaje supervisado que se aplica para resolver problemas de clasificación o regresión. El método está compuesto por arboles de decisión binarios en un solo modelo,⁷³ donde cada árbol de decisión en el bosque considera un subconjunto aleatorio de características.⁷⁴

Para resolver problemas de regresión, el árbol inicia con una estimación basada en la contribución de cada variable para predecir la variable de salida.⁷³ Durante el entrenamiento del modelo, se le dan valores dividiendo dos conjuntos de datos y generando nodos de forma iterativa hasta obtener un nodo final. Finalmente, el valor de los nodos finales de cada árbol se promedia y el resultado es la predicción del problema.⁷⁴

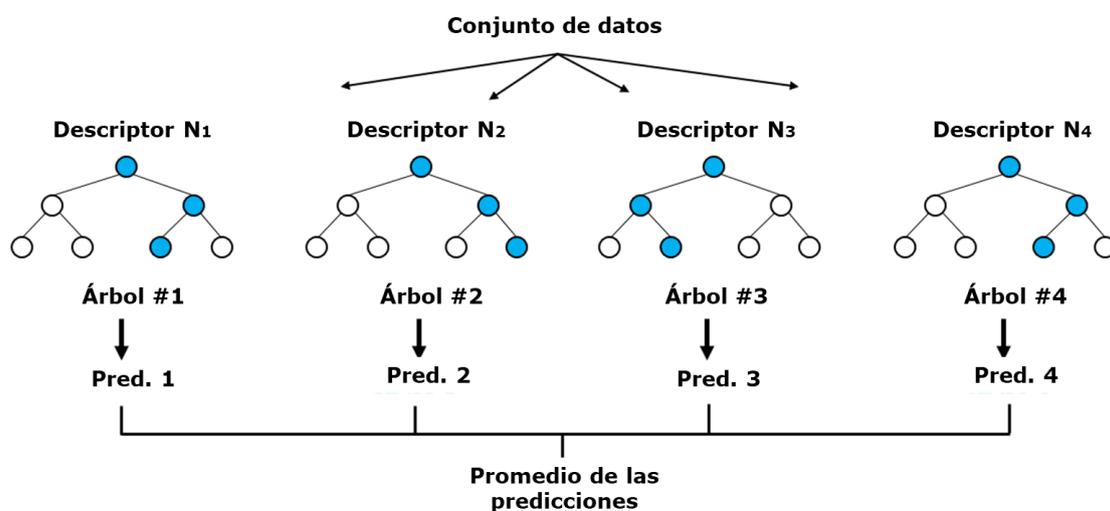


Figura 11.2. Selección de mejores descriptores por *Random Forest*.

11.4. Dinámica Molecular

La dinámica molecular (DM) consiste en el uso de mecánica clásica para modelar el comportamiento molecular, analizando la evolución en el tiempo de un sistema, sin tomar en cuenta efectos electrónicos. La DM es una técnica determinista debido a que, dado un conjunto de posiciones y velocidades iniciales, su evolución en el tiempo está determinada.⁷⁵

11.4.1. Campo de fuerza

El campo de fuerza define los parámetros en la descripción de los átomos y enlaces. Para la descripción de los átomos se les asigna su carga, átomos a los que están unidos, además de constantes de fuerza y datos atómicos como el radio atómico, la carga, la masa. Para la descripción de los enlaces se toman en cuenta dos tipos de interacciones:

- Interacciones no enlazantes: define átomos no unidos de manera directa por enlaces; comprendiendo los términos electrostáticos y de van der Waals.
- Interacciones enlazantes: intervienen átomos unidos por enlaces químicos. Para estas interacciones se toma en cuenta el estiramiento del enlace, rotación del enlace, torsión de ángulo.

En la Figura 11.3. se muestran los principales términos. La vibración de los enlaces y ángulos se modela a partir de un potencial armónico. Las torsiones se presentan mediante funciones periódicas. Finalmente, los términos de no enlace son funciones de potencia inversa de la distancia.⁷⁶

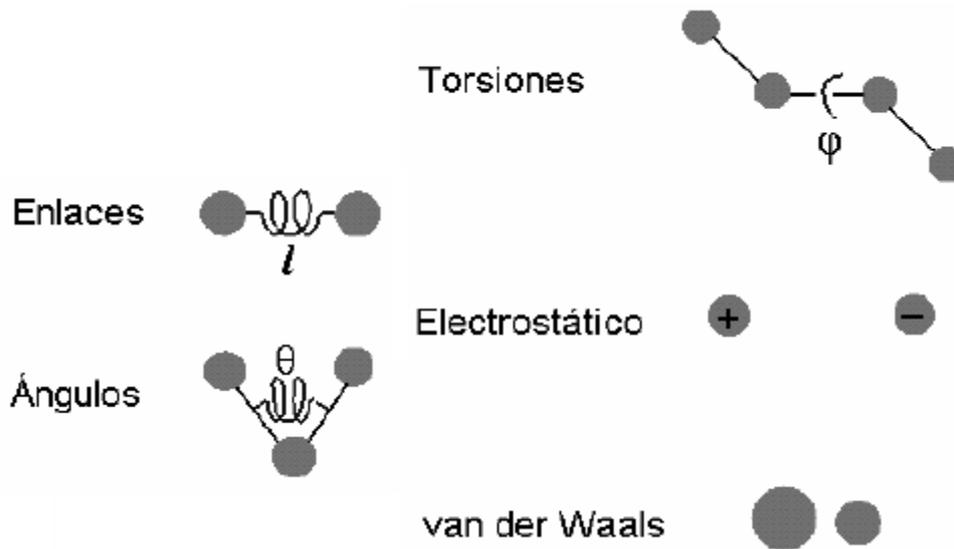


Figura 11.3. Representación gráfica de los términos de un campo de fuerza.

El campo de fuerza define una ecuación de energía potencial entre n número de partículas (1):

$$E_{\text{potencial}} = \sum_{\text{enlace}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angulo}} k_\theta (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} (1 - \cos(n\theta - \theta_0))^2 + \sum_{\text{vanderWaals}} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\epsilon_0 r_{ij}} \quad (1)$$

El primer término de la ecuación da la interacción entre pares de átomos enlazados, el segundo término es una suma de ángulos, el tercer término indica el potencial de torsión que modela el cambio en la energía por efecto de la rotación de enlaces, donde V_n es el potencial en el máximo, n es la periodicidad y θ_0 es la fase. El cuarto término de la ecuación (1) describe las interacciones de no enlace representadas por el potencial de Lennard-Jones que describe del equilibrio entre fuerzas repulsivas y atractivas y por un potencial coulombico que representa.⁷⁶

El campo de fuerza define una ecuación de energía potencial entre n número de partículas (1):

$$E_{potencial} = \sum_{\text{enlace}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angulo}} k_\theta (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} (1 - \cos(n\Theta - \Theta_0))^2 + \sum_{\text{vanderWaals}} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\epsilon_0 r_{ij}} \quad (1)$$

El primer término de la ecuación da la interacción entre pares de átomos enlazados, el segundo término es una suma de ángulos, el tercer término indica el potencial de torsión que modela el cambio en la energía por efecto de la rotación de enlaces, donde V_n es el potencial en el máximo, n es la periodicidad y θ_0 es la fase. El cuarto término de la ecuación (1) describe las interacciones de no enlace representadas por el potencial de Lennard-Jones que describe del equilibrio entre fuerzas repulsivas y atractivas y por un potencial coulombico que representa.⁷⁶

11.4.2. Algoritmo de integración

La DM es una técnica que produce trayectorias por integración de las ecuaciones de movimiento de Newton. Se necesita un conjunto de condiciones iniciales (posición y velocidad) para representar las fuerzas que actúan entre las partículas y definir las condiciones fronteras.⁷⁷ Para sistemas con más de tres cuerpos interactivos, no existe una solución analítica para las ecuaciones de movimiento. Por lo cual, se debe de aproximar de una manera discreta, denominándose como integración numérica de las ecuaciones de movimiento o algoritmos integradores.^{78,79}

Estos integradores deben de tener propiedades deseables como:⁷⁸

- Calcular con poca frecuencia las fuerzas, para disminuir el costo computacional.
- Estabilidad para pasos cortos y largos de tiempo, disminuyendo las desviaciones de energía.
- Conservar el volumen de fase, disminuyendo el error en la dinámica.

12. ANEXO II

12.1 Análisis de dinámica molecular

En las siguientes figuras se muestra el análisis de cada sistema del factor de ocupación de todas las réplicas utilizando un código de color para diferenciar diferentes rangos del factor de ocupación **(A)**. Posteriormente, **(B)** las moléculas que tuvieron un factor de ocupación mayor a 0.5 o 0.4 (para los sistemas mixtos). **(C)** Vista lateral de C99₁₅₋₅₅ mostrando en código de color el factor de ocupación, que va de azul a rojo (0 a 0.4, respectivamente), esta figura va de acuerdo a figura **B**. Análisis por cuadrantes del factor de ocupación de cada molécula **(D)**. Los aminoácidos correspondientes a cada cuadrante se muestran en la Tabla 12.1.

Tabla 12.1. Composición de los cuadrantes de C99₁₅₋₅₅

Hélice Yuxtamembranal		TMN-terminal		TMC-terminal	
Cuadrante	Aminoácidos	Cuadrante	Aminoácidos	Cuadrante	Aminoácidos
Y1	Q15, F19, D23, N27	TMN1	K28, I32, V36, V40	TMC1	I41, I45, L49, K53
Y2	K16, F20, V24	TMN2	G29, G33, G37	TMC2	A42, V46, V50
Y3	L17, A21, G25	TMN3	A30, L34, G38	TMC3	T43, I47, M51
Y4	V18, E22, S26	TMN4	K31, M35, V39	TMC4	V44, T48, L52

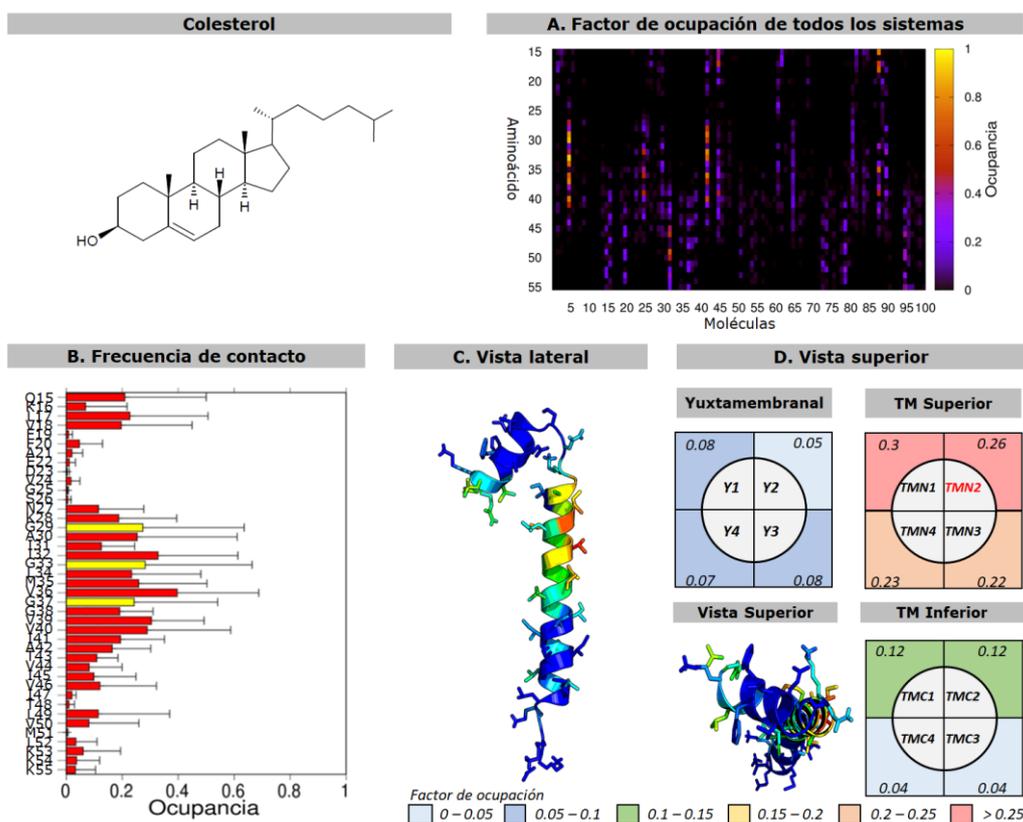


Figura 12.1. Análisis de factor de ocupación del Sistema de colesterol.

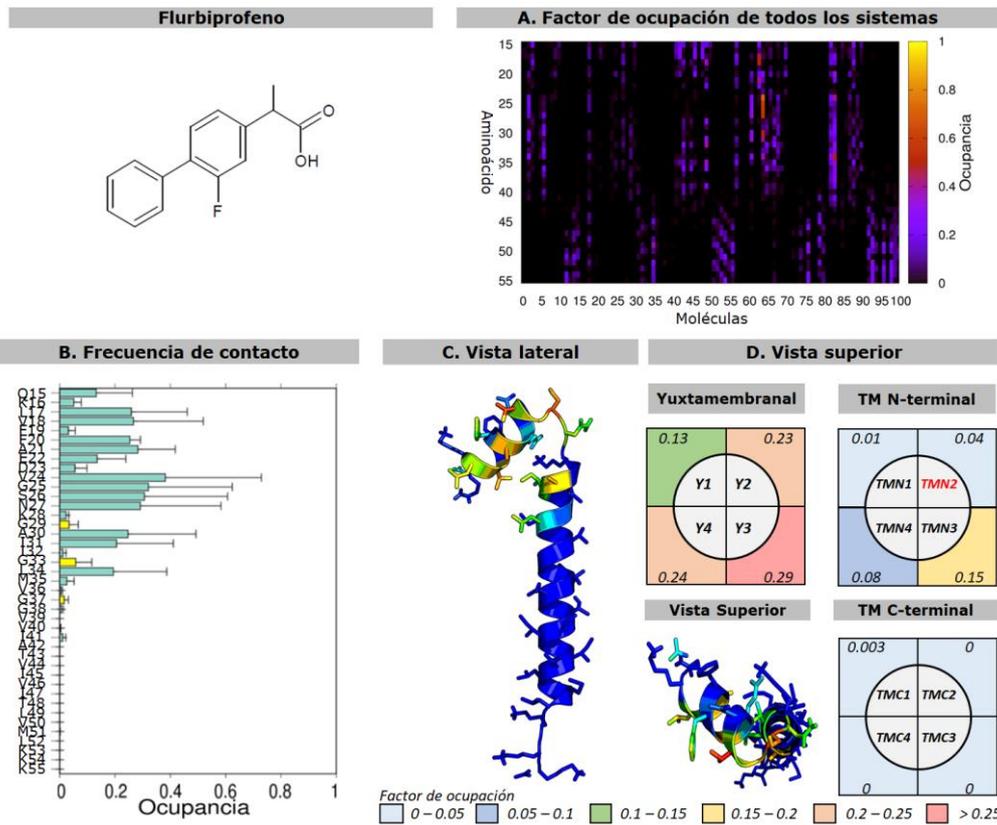


Figura 12.2. Análisis de factor de ocupación de Sistema de flurbiprofeno

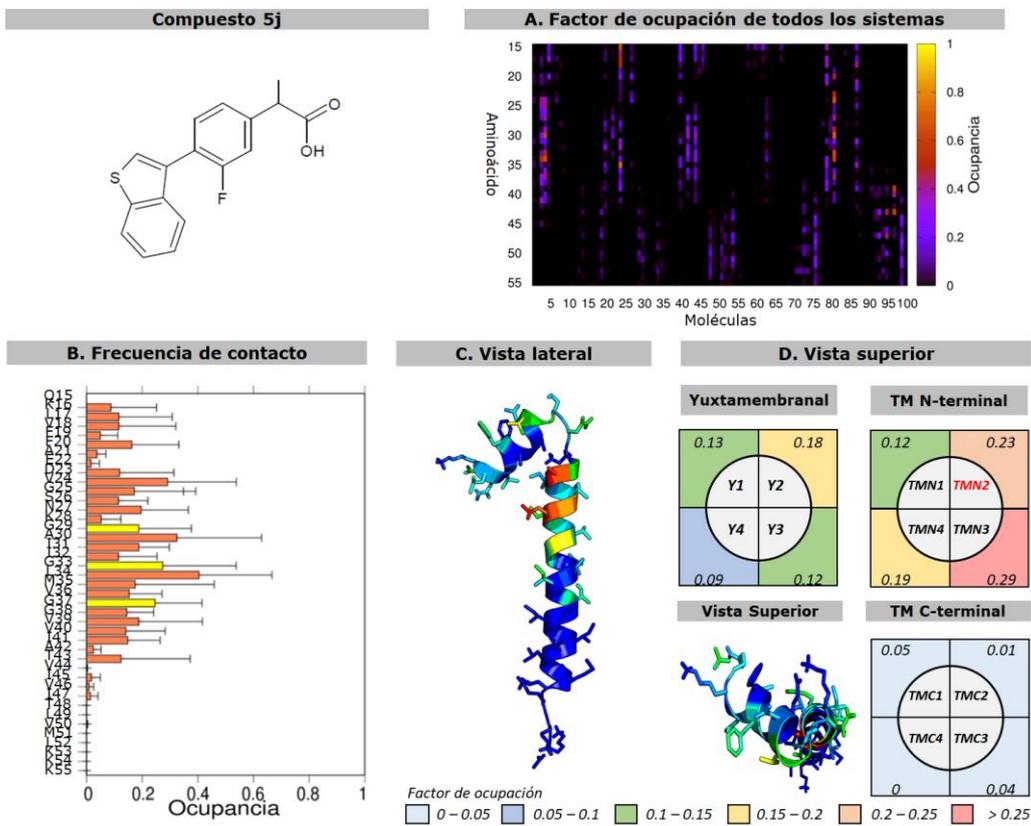


Figura 12.3. Análisis de factor de ocupación de Sistema de compuesto 5j.

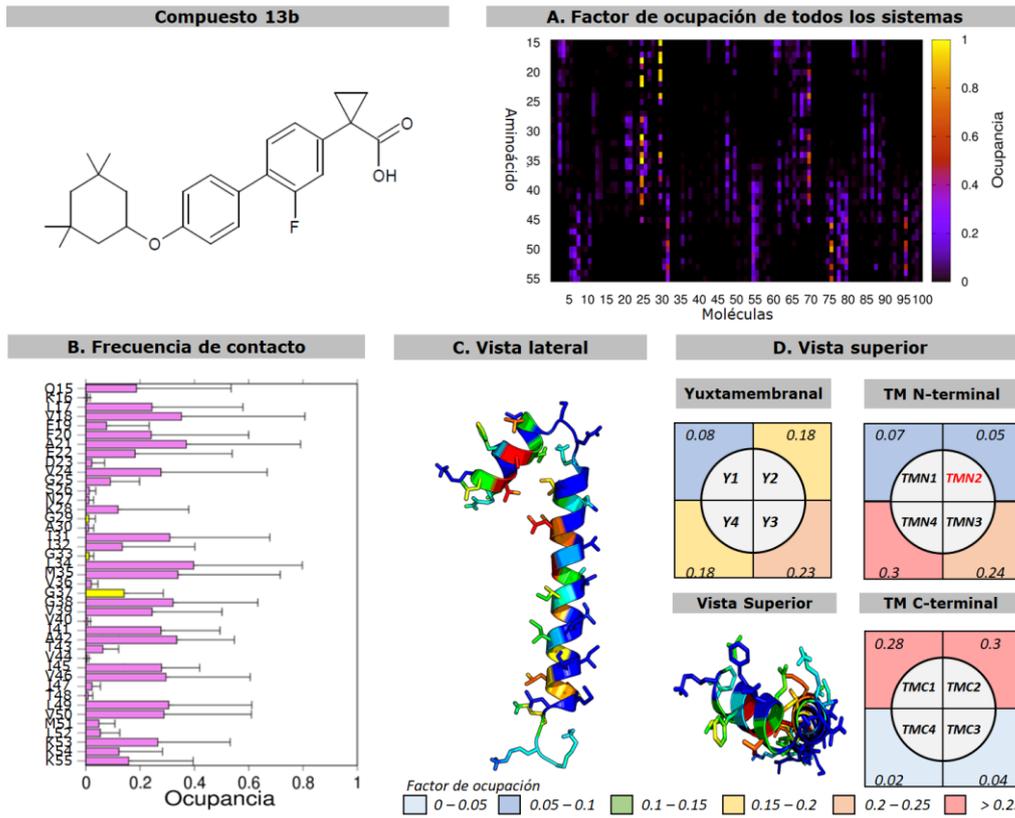


Figura 12.4. Análisis de factor de ocupación de Sistema de Compuesto 13b.

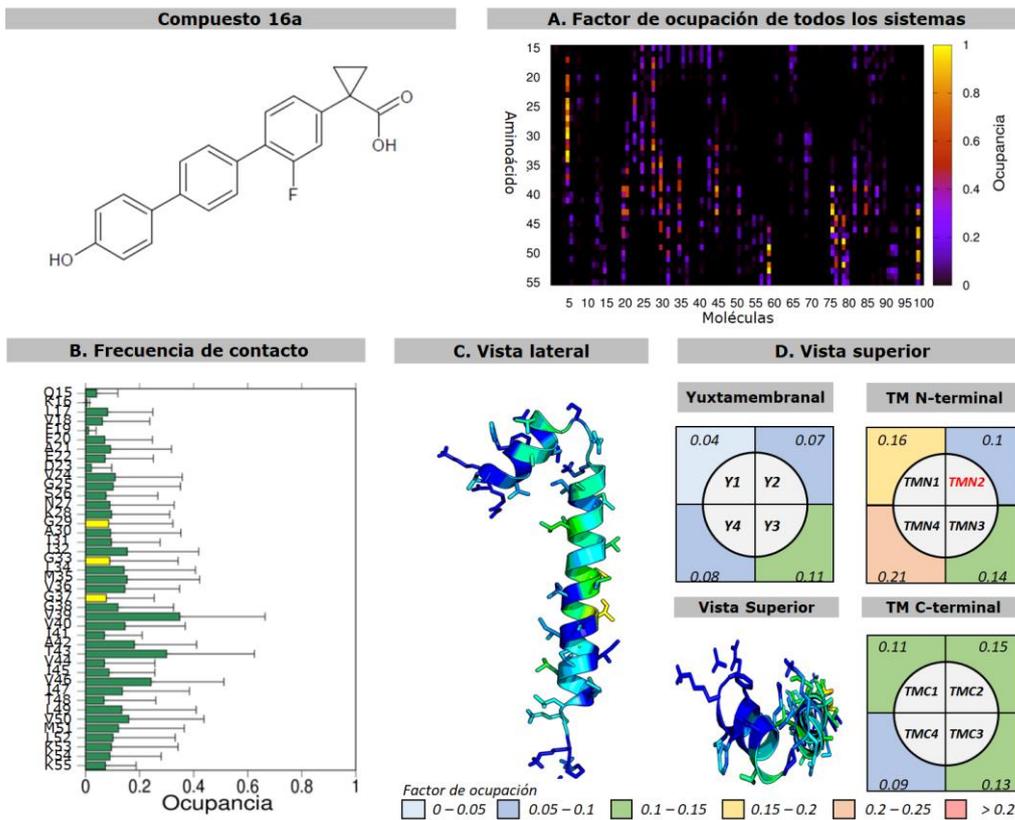


Figura 12.5. Análisis de factor de ocupación de Sistema de compuesto 16a.

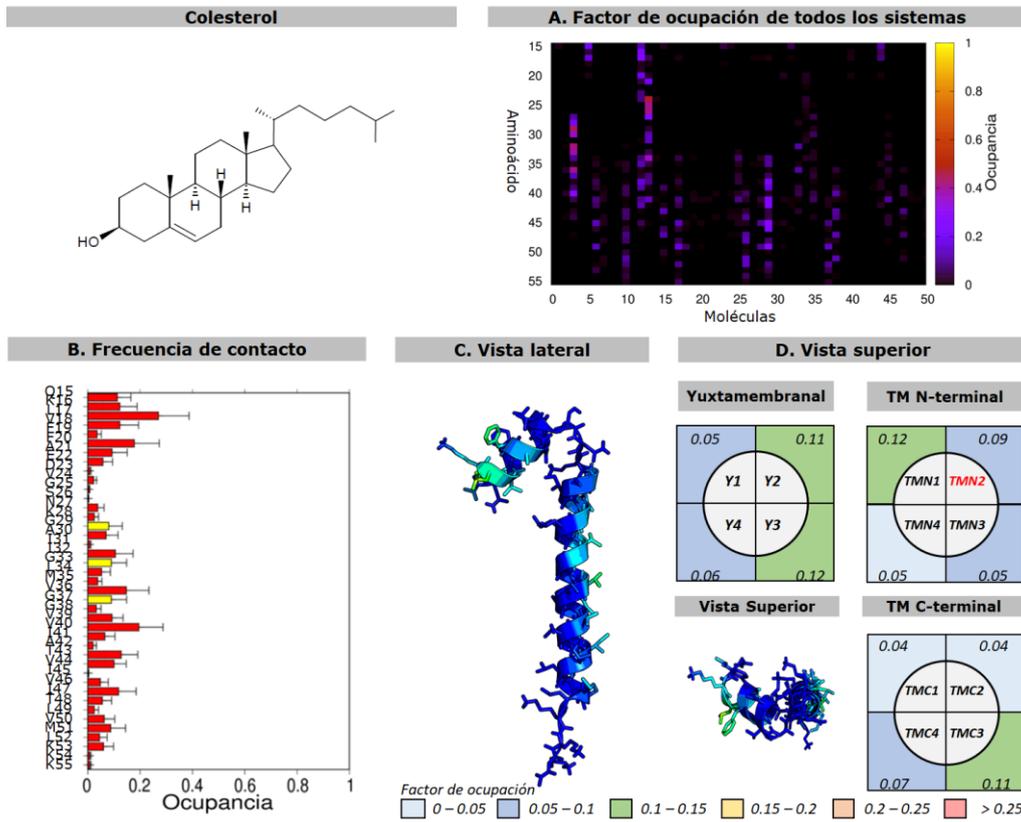


Figura 12.6. Sistema de CHOL-flurbiprofeno, análisis de colesterol.

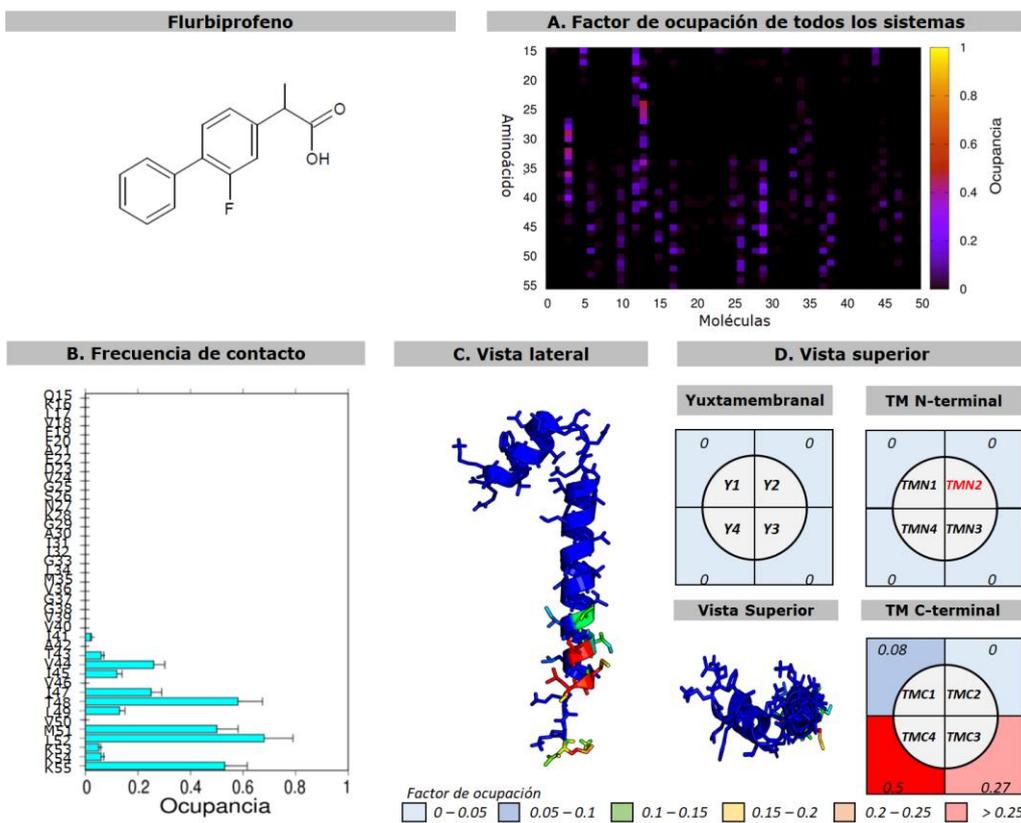


Figura 12.7. Sistema de CHOL-flurbiprofeno, análisis de flurbiprofeno.

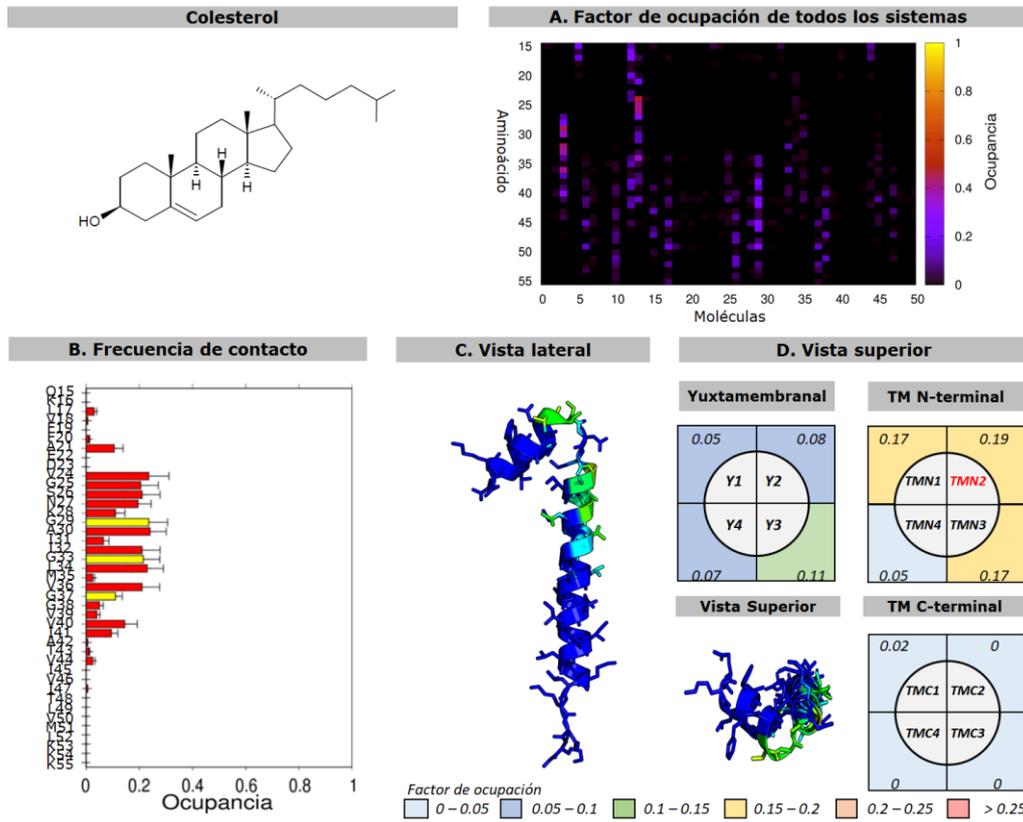


Figura 12.8. Sistema de CHOL-compuesto 16a, análisis de colesterol.

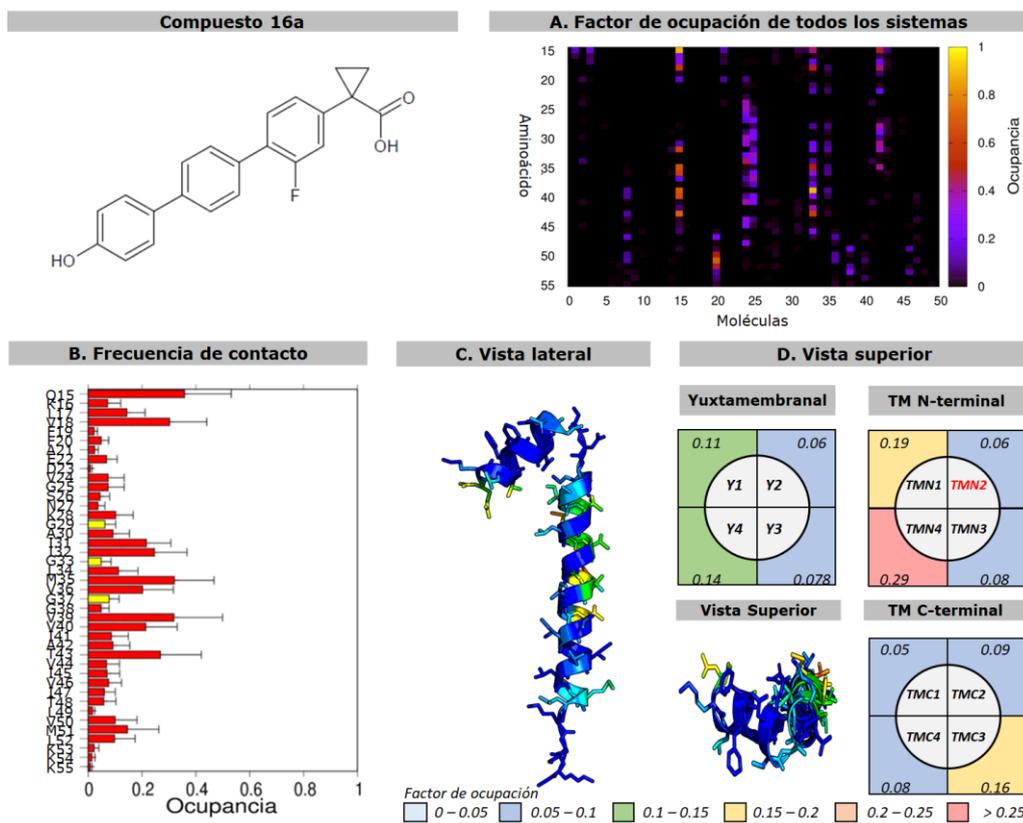


Figura 12.9. Sistema de CHOL-compuesto 16a. Análisis de compuesto 16a.