

# Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



### EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE CICLÓTIDOS PRESENTES EN LA FAMILIA RUBIACEAE Y ESTRUCTURAS DE β-AMILOIDE A NIVEL DE MECÁNICA MOLECULAR

Tesis presentada por la Bachiller: Calderón Sumi, Ángela

Para optar el Título Profesional de Ingeniera Biotecnóloga

Asesor: Dr. Gómez Valdez, Badhin

### Arequipa – Perú 2018

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos En su investigación no olvide referenciar esta tesis



16000850 Expediente Nº. UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas 265-2016 Nº Trámite en Fac. y Biotecnológicas Fecha Recep. Fac. 11-01-2016 Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL CALDERON SUMI, Angela DE: PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO "DETERMINACION DE LAS ENERGIAS DE INTERACCION A NIVEL DE MECANICA MOLECULAR Y QM/MM PARA LA INTERACCION ENTRE CICLOTIDOS PRESENTES EN LA FAMILIA Rubiaceae Y ESTRUCTURAS &-AMILOIDE" DICTAMINADORES: 1) Dr. Jaime Cárdenas García 2) Dr. José Villanueva Salas DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: "DETERMINACION DE LAS ENERGIAS DE INTERACCION A NIVEL DE MECANICA MOLECULAR Y OM/MM PARA LA INTERACCION ENTRE CICLOTIDOS PRESENTES EN LA FAMILIA Rubíaceae TIPO KALATA BI Y ESTRUCTURAS β-AMILOIE" después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad. Atentam ente polle FECHA 19/01/2016 (Devolver antes de 8 días hábiles) FIRMAS: Dr. Badhin Gómez Valdez ASESOR DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Tribajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el titulo debe cambiar a "EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN A NIVEL DE MECÁNICA MOLECULAR ENTRE CICLÓTIDOS PRESENTES EN LA FAMILIA RUBIACEAE Y ESTRUCTURAS DE β-AMILOIDE" y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de DICTAMEN ASESORÍA: nuestra Facultad FECHA 19-04-18 FIRMA DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS: Dra. Karin Vera López Dr. José Villanueva Salas 3) 1) Mgter. Jaime Barreda del Carpio 2) Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie DICTAMEN FINAL: el título a: "EVALUACION DE LA INTERACCION ENTRE CICLOTIDOS PRESENTES EN LA FAMILIA RUBIACEAE Y ESTRUCTURAS DE  $\beta$ -AMILOIDE A NIVEL DE MECANICA MOLECULAR" y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias minimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad. ame (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA FIRMA JURADOS: PRESIDENTE VOCAL SECRETARIO LOCAL SUN C-402 HORA 19.00 07/18 FECHA FECHA 21/06/18 FIRMA DEL DECANO

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos En su investigación no olvide referenciar esta tesis



# DEDICATORIA

A mi Papá Juan por siempre creer en mí, quererme y apoyarme incondicionalmente para poder cumplir mis metas y objetivos, y solo decirte gracias.

A mis padres, Patricia y Juan Carlos, por haberme dado la vida, por quererme y estar siempre ahí para mí, por la confianza depositada en mí, y creer que puedo realizar todo lo que me propongo y enseñarme que las cosas solo se logran con esfuerzo y empeño.





## AGRADECIMIENTOS

Agradecer mi Papá Juan, por haberme dado la oportunidad para superarme en la vida; a mis padres, mis hermanos y mi familia, ya que sin ellos no sería la persona que soy; y a Dante por ser mi apoyo, ayudarme e incentivarme a realizar todo lo que me propongo.

También agradecer a Dios, por permitirme llegar a este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, y por todas las maravillosas personas que ha puesto en mi camino a lo largo de mi vida.

Y finalmente agradecer a la Universidad Católica de Santa María, al Centro de Investigación en Ingeniería Molecular (CIIM) y a FONDECYT que financió esta tesis mediante el proyecto 139-2015-FONDECYT.

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

# CONTENIDO

DEDICATORIA	Ι
AGRADECIMIENTOS	п
CONTENIDOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XII
GLOSARIO	XIII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI
INTRODUCCIÓN	XVII
OBJETIVOS	XVIII
OBEJTIVO GENERAL	XVIII
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	XVIII
HIPÓTESIS	XIX
CAPÍTULO I	1

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos En su investigación no olvide referenciar esta tesis

MARCO TEÓRICO	1
1.1. Alzheimer	1
1.1.1. Síntomas	1
1.1.2. Epidemiología	3
1.1.3. Patología	4
1.1.4. Fisiopatología	6
1.1.5. Tratamiento CATOLICA	9
1.2. Ciclótidos	11
1.2.1. Estructura de los Ciclótidos	13
1.2.2. Subfamilias de los Ciclótidos	15
1.2.3. Biosíntesis	17
1.2.4. Actividades Biológicas	19
1.3. Antecedentes para el tratamiento de Alzheimer con ciclótidos	22
1.4. Química Computacional	23
1.4.1. Mecánica Clásica	23
1.4.2. Acoplamiento Molecular	30
1.4.3. Termodinámica Estadística	30
CAPÍTULO II	32

MÉTODOS Y DETALLES COMPUTACIONALES	32
2.1. Detalles Computacionales	32
2.1.1. Hardware	32
2.1.2. Software	32
2.2. Métodos	33
2.2.1. Recopilación de estructuras	33
2.2.2. Modelado y Predicción de Estructuras terciarias	35
2.2.3. Minimización de Energías y Dinámica Molecular	36
2.2.4. Acoplamiento Molecular (Docking)	39
2.2.5. Validación de resultados	42
CAPÍTULO III	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.1. Recopilación y Modelado de los modelos estructurales	44
3.2. Optimización y Validación de las estructuras terciarias	50
3.2.1. Beta amiloide	50
3.2.2. Ciclótidos	54
3.3. Acoplamiento molecular	64
CONCLUSIONES	81

VII

UNIVERSIDAD

DE SANTA MARÍA

CATÓLICA

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos En su investigación no olvide referenciar esta tesis

RECOMENDACIONES	82
BIBLIOGRAFÍAS	83



VШ

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>1.1</b> Los cerebros la enfermedad del Alzheimer (EA) se caracteriza por tener una notable	
atrofia en comparación con los cerebros control	5
1.2 Presentación esquemática de las vías de procesamiento de PPA	9
1.3 Ilustración de la línea del tiempo acerca de las investigaciones relacionadas ciclótidos1	2
<b>1.4</b> (A) Estructura química del prototipo de ciclótido kalata B1. (B) Estructura 3D de un ciclótido, donde se ve el nudo cístina (NCC), una cadena principal con bucles de secuencia	

2.1 Búsqueda de la estructura de la Beta amiloide en la base de datos "Protein Data Bank".34

2.2 Búsqueda de las secuencias de aminoácidos de los ciclótidos de la familia Rubiaceae en la
base de datos "Cybase"
<b>2.3</b> Secciones utilizados para la predicción de los ciclótidos en el Servidor Robetta35
<b>2.4</b> A) Archivo ".mdp" con parámetros para la minimización de energías de las estructuras. B) Archivo ".mdp" con los parámetros para la dinámica molecular
<b>2.5</b> Archivo con los comandos para realizar la minimización y dinámica molecular para las moléculas, tanto de los ciclótidos como de la Beta amiloide
<b>2.6</b> Estructura del ciclótido en caja con solvente
<b>2.7</b> Estructura de beta amiloide en caja con solvente
<b>2.8</b> Servidor PockDrug para la predicción de sitios de interacción de la beta amiloide39
2.9 Parámetros utilizados para el acoplamiento molecular en el software Hex Docking40
<b>2.10</b> Parámetros utilizados para simulación de Dinámica molecular del complejo ciclótido- beta amiloide
2.11 Complejo ciclótido-beta amiloide en caja con solvente para la dinámica molecular41
<b>2.12</b> Forma de obtener la gráfica de Ramachandran en el Servidor Molprobity43
<b>3.1</b> Estructura tridimensional de Beta amiloide obtenida de la base de datos "Protein Data Bank" con código de acceso 2MXU44
<b>3.2</b> Péptido de Beta amiloide con aminoácidos faltantes
<b>3.3</b> Dodecámero de Beta amiloide formado con el uso del programa VMD45
<b>3.4</b> Estructura tridimensional de Ciclótido predicha por el servidor Robetta

<b>3.5</b> Ciclótido con puentes disulfuro y con enlace C- y N- terminal
<b>3.6</b> Comparación entre la estructura inicial de Beta amiloide con la estructura final después de una dinámica molecular de 200 ns
<b>3.7</b> Desviación media cuadrática (RMSD) de la Beta amiloide
<b>3.8</b> Fluctuación de la desviación media cuadrática (RMSF) de la Beta amiloide52
<b>3.9</b> Gráfica de Ramanchandran para el dodecámero de la Beta amiloide53
<b>3.10</b> Archivos de Gromac's modificados para poder analizar ciclótidos.A) Archivo animoacids.n.tdb. B) Archivo aminoacids.c.tdb. C) Archivo specbond.dat
<b>3.11</b> A) Ciclótido Caripe1 antes de la dinámica molecular. B) Ciclótido Caripe1 después de la dinámica molecular
<b>3.12</b> Desviación media cuadrática de los ciclótidos tipo Kalata
<b>3.13</b> Desviación media cuadrática de los ciclótidos tipo Caripe
<b>3.14</b> Desviación media cuadrática de los ciclótidos tipo Circulin
<b>3.15</b> Desviación media cuadrática de los ciclótidos tipo Chassatide
<b>3.16</b> Desviación media cuadrática de los ciclótidos tipo Psyle
<b>3.17</b> Estructura promedio del ciclótido Caripe1 de los 4ns a 200ns
<b>3.18</b> Se observan los sitios activos de la beta amiloide dados por el servidor PockDrug desde dos vistas de la proteína; P0-rojo, P11-amarillo, P12-rosado, P13-verde, P18-celeste65
<b>3.19</b> Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Caripe
<b>3.20</b> Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Vibi

	<b>3.21</b> Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Psyle
	<b>3.22</b> Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo PS
	<b>3.23</b> Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Circulin
	<b>3.24</b> Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Kalata
	<b>3.25</b> Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Hedyoide
	<b>3.26</b> Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Chassatide
	<b>3.27</b> Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo CD
	<b>3.28</b> Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido Caripe
	<b>3.29</b> Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido Vibi
	<b>3.30</b> Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido Psyle
	<b>3.31</b> Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido PS
	<b>3.32</b> Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido Circulin
	<b>3.33</b> Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido kalata
	XII
Publicación a	utorizada con fines académicos e investigativos
En su investig	ación no olvide referenciar esta tesis
The I for the	

<b>3.34</b> Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido Hedyotide
<b>3.35</b> Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido Chassatide
<b>3.36</b> Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido CD
<b>3.37</b> Puentes hidrógeno formados entre la Glutamina 305 de la Beta amiloide y la Arginina 30 del ciclótido Caripe
<b>3.38</b> Puentes hidrógeno formados entre la Asp253, Glu179, Arg257 de la Beta amiloide y la Arg28, Tyr23, Cys19 del ciclótido Vibi74
<b>3.39</b> Puentes hidrógeno formados entre la Asp421 de la Beta amiloide y la Lys23, Ser22 del ciclótido Vibi
<b>3.40</b> Puentes hidrógeno formados entre la Asp421, Glu221 de la Beta amiloide y la Asn31, Arg30, Lys13, Asn36 del ciclótido PS75
<b>3.41</b> Puentes hidrógeno formados entre la Arg341, Asp301 de la Beta amiloide y la Gly11, Trp23 del ciclótido Circulin
<b>3.42</b> Puentes hidrógeno formados entre la Asp421 de la Beta amiloide y la Lys23, Ser22 del ciclótido Kalata
<b>3.43</b> Puentes hidrógeno formados entre la Asp253, Asp211 de la Beta amiloide y la Arg29 del ciclótido Hedyotide
<b>3.44</b> Puentes hidrógeno formados entre la Arg257, Arg199, Arg173 de la Beta amiloide y la Cus23, Lys24, Phe4, Cys9 del ciclótido Chassatide
<b>3.45</b> Puentes hidrógeno formados entre la Asn363, Lys364, Lys322, Lys280, Lys238 de la Beta amiloide y la Tyr11, Glu18, Ser9, Glu28 del ciclótido CD

XIII



# ÍNDICE DE TABLAS

<b>1.1</b> Ciclótidos Representativos de las subfamilias Möbius, bracelet e inhibidores de tripsina
<b>3.1</b> Lista de secuencias lineales de 78 ciclótidos reportados en Cybase para especies de planta <i>Rubiaceae</i>
<b>3.2.</b> Aminoácidos de mayor y menor fluctuación por tipos de Ciclótidos
<b>3.3</b> Tabla de energía obtenida del software Gromacs después de la Dinámica Molecular60
<b>3.4</b> Resultados del análisis de Ramanchandran de los 78 ciclótidos
<b>3.5</b> Tabla de información proporcionada por PockDrug para el dodecámero de Beta amiloide
3.6 Relación de aminoácidos interactuantes entre la beta amiloide y los ciclótidos,
englobados por tipos de ciclótidos
<b>3.7</b> Energías de interacción entre los 78 ciclótidos y la Beta amiloide

UNIVERSIDAD Católica De Santa María

# **GLOSARIO**

- 1. EA. Enfermedad del Alzheimer
- 2. SNP. Síntomas neuropsiquiátricos
- 3. DCL. Deterioro cognitivo leve
- 4. AAC. Angiopatía amiloidea cerebral
- 5. TEP. Tomógrafo de emisión de positrones
- **6.**  $\beta$ A. Beta amiloide
- 7. PPA. Proteína precursora amiloidea
- 8.  $\beta$ A40. Beta amiloide de 40 residuos
- 9. βA42. Beta amiloide de 42 residuos
- **10.** PPAsα. *PPA secretada* α
- 11. CTF. Fragmento carboxiterminal
- 12. AICD. Dominio intracelular APP
- **13.** PPAs $\beta$ . *PPA secretada*  $\beta$
- 14. PS1. Presinilina 1
- **15.** PS2. Presinilina 2
- 16. FDA. Administración de Medicamentos y Alimentos
- **17.** NMDA. *N.metil D-aspartato*
- 18. NCC. Nudo cíclico de cistína
- 19. RMN. Resonancia Magnética Nuclear
- 20. RTD. Rhesus theta defensin
- 21. NTR. Dominio N-terminal repetido
- 22. PDNT. Pro dominio N-terminal
- 23. RE. Retículo endoplasmático
- 24. PDI. Disulfuro isomerasa
- 25. AEP. Asparraginil endoproteinasa
- 26. LQN Ligación química nativa
- 27. SPFS. Síntesis de péptidos en fase sólida

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos En su investigación no olvide referenciar esta tesis



- 28. TFA. Ácido triofluoroacético
- **29.** PE. Fosfatidiletanolamina
- 30. MM. Mecánica Molecular
- 31. vdW. Van der Waals
- 32. LJ. Lennar-Jonnes
- 33. PES. Superficie de Energía Potencial
- 34. GROMACS. Máquina de Groningen para Simulaciones Químicas.
- 35. PDB. Protein Data Bank
- 36. OPLS. Potencial optimizado para simulaciones líquidas todos los átomos
- **37.** NVT. Número de átomos, volumen y temperatura constante.
- 38. NCBI. Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
- 39. PBC. Condiciones periódicas de Contorno
- 40. RMSD. Desviación media cuadrática
- 41. RMSF. Fluctuación media cuadrática
- 42. H-bond. Puentes Hidrógeno



### RESUMEN

En la presente investigación se realizó el análisis de la interacción de 78 ciclótidos de la familia *Rubiaceae* con un dodecámero de beta amiloide; obteniendo en una primera instancia las estructuras reportadas en la literatura, tanto como de los ciclótidos como de la beta amiloide, las cuales fueron modeladas, optimizadas y alcanzaron el equilibrio mediante el uso de técnicas de Mecánica Molecular como la minimización de energías y dinámica molecular, utilizando el ensamble canónico NVT por un tiempo de 200ns, el campo de fuerza OPLSAA, y un solvente explícito (SPC216). El acoplamiento molecular entre la beta amiloide y los 78 ciclótidos respectivamente y post procesamiento con una dinámica molecular de 10ns, nos mostró que llega a existir una interacción entre los ciclótidos con la proteína de beta amiloide al observar la existencia de puentes hidrógeno; solo un ciclótido no tiene presencia de puentes hidrógeno con respecto al dodecámero de beta amiloide, el Cycloviolacion O22, después de evaluar los aminoácidos interactuantes entre ambas proteínas, los resultados obtenidos se pueden usar para estudios posteriores.

**Palabras clave:** Beta amiloide, Ciclótido, Dinámica Molecular, Campo de Fuerza, Acoplamiento Molecular.



### ABSTRACT

In the present investigation, the interaction of 78 cyclotides of the *Rubiaceae* family with an amyloid Beta dodecamer was performed; obtaining in a first instance the structures reported in the literature, as well as cyclotides and amyloid beta, which were modeled, optimized and reached equilibrium through the use of Molecular Mechanics techniques such as the minimization of energies and molecular dynamics, using the canonical NVT assembly for a time of 200ns, the force field OPLSAA, and an explicit solvent (SPC216). The docking between the amyloid Beta and the 78 cyclotides respectively and post processing with a molecular dynamics of 10ns, showed us that there is an interaction between the cyclotides with the Beta amyloid protein when observing the existence of hydrogen bonds; only one cyclotide doesn't have presence of hydrogen bridges with respect to the dodecamer of Beta amyloid, Cycloviolation O22, after evaluating the amino acids interacting between both proteins, the results obtained can be used for further studies.

Key words: Amyloid Beta, Cyclotide, Molecular Dynamics, Force Field, Docking.

XVIII

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos En su investigación no olvide referenciar esta tesis



# **INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida progresiva crónica de la estructura y las funciones de las neuronas, lo que resulta en deficiencias funcionales y mentales. Si bien las causas asociadas con la degeneración neuronal siguen siendo poco conocidas, la incidencia de neurodegeneración aumenta con la edad, en la vida adulta media a tardía. Este fenómeno, que afecta principalmente a las personas mayores, se traduce en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (EA).

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo progresivo e incesante que afecta amplias áreas de la corteza cerebral y el hipocampo. La enfermedad de Alzheimer está asociada con la acumulación de formas insolubles de beta amiloide ( $\beta$ A) en placas en espacios extracelulares, así como en las paredes de los vasos sanguíneos, y con la agregación de la proteína tau de microtúbulos en los enredos neurofibrilares de las neuronas.

En el Perú alrededor de 200,000 personas padecen de la enfermedad de Alzheimer, en donde el Ministerio de Salud (Minsa) brinda tratamientos y servicios especializados a 3,309 pacientes. Actualmente, existen estudios donde se da terapia anti-amiloidogénica, que principalmente abarca la reducción de la producción de  $\beta$ A mediante la inhibición de la enzima secretasa, o bloqueando la agregación de  $\beta$ A, siendo este último el de interés en esta investigación ya que existen estudios en donde anticuerpos, péptidos u otras moléculas pequeñas, interaccionan con  $\beta$ A y la inhiben.

Los ciclótidos son péptidos que son propósito de diversas investigaciones, como inhibidores de moléculas responsables de distintas enfermedades tales como: la proliloligopeptidasa humana, la proteína tau, etc. Es por ello que el objetivo de este estudio es realizar y evaluar la interacción de ciclótidos con las moléculas de  $\beta$ A, mediante el uso de herramientas bioinformáticas y técnicas de mecánica molecular.

# **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la interacción a nivel de Mecánica Molecular entre los ciclótidos presentes en la familia *Rubiaceae* y estructuras de beta amiloide.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Recopilar información en la literatura sobre las estructuras de los ciclótidos presentes en la familia de *Rubiaceae*, así como de las estructuras de beta amiloide, reportadas en el "Protein Data Bank"
- 2. Minimizar energías y realizar una dinámica molecular de las estructuras de los ciclótidos como de las de beta amiloide en formato pdb.
- 3. Acoplar, "Docking", la estructura beta amiloide con los ciclótidos obtenidos presentes en la familia *Rubiaceae*
- Evaluar mediante simulación de Dinámica Molecular en el ensamble Canónico, las estructuras más estables del complejo ciclótido – beta amiloide.
- 5. Analizar la interacción entre las estructuras de los ciclótidos con la beta amiloide mediante la existencia de puentes hidrógeno.



# HIPÓTESIS

Utilizando la Mecánica Molecular para sistemas biológicos, es factible evaluar la interacción entre ciclótidos presentes en la familia *Rubiaceae* y la estructura de Beta amiloide, mediante técnicas de acoplamiento molecular.



# **CAPÍTULO I**

# Marco Teórico

### 1.1.Alzheimer

Los desórdenes neurodegenerativos son esporádicos y caracterizados por la persistente y progresiva pérdida de los subtipos neuronales, entre ellas se incluye a la enfermedad del Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, Esclerosis Lateral amiotrófica, Esclerosis múltiple y desórdenes neurocognitivos asociados a virus.<sup>1, 2</sup>

La enfermedad del Alzheimer es el desorden neurodegenerativo más común que desarrollan las personas de la tercera edad, mayormente a partir de los 65 años, esta enfermedad se caracteriza por ser la forma más común de demencia, la cual afecta al paciente en un ámbito personal, laboral, familiar y social; y los síntomas más remarcables son la degeneración de las funciones cognitivas y alteración del comportamiento de la persona afectada, incluyendo la pérdida progresiva de la memoria.<sup>3, 4</sup>

### 1.1.1. Síntomas

En 1906, el Dr. Alois Alzheimer presentó los resultados de la autopsia de cerebro de Auguste Deter, una mujer de 55 años de edad, que padecía de demencia presenil, y propuso que los problemas psiquiátricos de la paciente eran debido a lesiones patológicas anormales en su cerebro. Alzheimer indicó que esto era un "proceso de enfermedad diferente" descrito por la correlación de hallazgos clínicos y características patológicas; sin embargo, Emil Kraeplin, el mentor de Alzheimer, nombró a la demencia presenil como "la enfermedad de Alzheimer".<sup>5</sup>

Se conoce que la enfermedad del Alzheimer (EA) produce síntomas cognitivos, pero los avances en la neurociencia han establecido que; además de estos síntomas, la enfermedad también presenta una conexión entre las emociones y las cogniciones, presentando una serie de síntomas neurosquiátricos (SNP).<sup>6</sup> Una reciente iniciativa del "Instituto Nacional sobre el envejecimiento" junto con "La Asociación de Alzheimer" ha desarrollado un nuevo criterio de diagnóstico en donde clasifica a la enfermedad del Alzheimer en tres fases: La fase pre-clínica, fase clínica , y finalmente la demencia de EA.<sup>7</sup>

Los síntomas de la fase pre-clínica son a menudo confundidos con problemas relacionados al envejecimiento normal o indicadores de estrés inducido, incluyendo la falta de formar nuevas memorias. Por otro lado, básicamente la fase clínica es en donde la enfermedad puede ser identificada como un deterioro cognitivo leve (DCL), en este estado o fase de la enfermedad se observa que hay cambios tanto psicológicos como en el comportamiento, mostrando un deterioro gradual en la forma de realizar actividades diarias, incluyendo aprender nuevas habilidades.<sup>8</sup> Usualmente en el progreso de la enfermedad, la persona afectada aún puede hacerse cargo de sí mismo, pero comienza a notarse un deterioro en su vocabulario y pérdida de la fluidez para comunicarse. De todos los SNP, la depresión y la apatía son los síntomas más frecuentemente observados, además de que la incidencia de agitación verbal y física es también alta en EA y DCL.<sup>9</sup>

Paralelamente, los SNP pueden ser una manifestación directa no cognitiva de la enfermedad del Alzheimer debido a que afecta áreas clave del cerebro asociados al comportamiento, emociones y/o percepciones.<sup>10</sup> Como la enfermedad es progresiva, las alucinaciones y las agresiones se vuelven más comunes, donde la apatía es la más persistente en los SNP de entre todos los estados del EA. Adicionalmente, el ritmo circadiano se vuelve exagerado comparado con la fase de cambio que se observa en las personas con envejecimiento normal.<sup>11</sup>

Conforme va avanzando la enfermedad a su última fase, el paciente requiere de un cuidador, debido a que en la mayoría de casos en esta última etapa de la enfermedad la persona ha perdido totalmente el habla, además también sufre una pérdida de la masa muscular que como consecuencia afecta la movilidad del paciente, por lo cual este termina confinado a estar postrado en una cama. En esta etapa de la enfermedad los SNP se vuelven menos frecuentes que en la fase intermedia del EA.<sup>12</sup>

En general, los síntomas más recurrentes en personas con EA incluye depresión, psicosis, apatía, hiperactividad o agitación, desórdenes del sueño, pérdida de la memoria y habilidades diarias, deterioro de la comunicación y el vocabulario, y finalmente perdida de la movilidad física.<sup>13</sup>

### 1.1.2. Epidemiología

La enfermedad del Alzheimer es la mayor causa de demencia en personas mayores de 60 a 65 años. En donde el declinamiento cognitivo y demencia ha tenido un alto impacto individual, el cual está asociado a la edad, por lo que el impacto social viene aumentando a nivel mundial. La prevalencia global de demencia para el 2010 fue de 35.6 millones, y se predice que ira doblando esta cantidad cada 20 años, afectando a más de 80 millones de personas en el mundo para el 2040.<sup>14</sup> Este incremento de casos de Alzheimer es atribuido al incremento de personas ancianas en los países del segundo y tercer mundo. Consecuentemente, se espera que para el 2040 el porcentaje de las personas con demencia aumente del 80 % al 190 % en lo que es Europa, Norte América, y la región desarrollada del occidente del Pacífico, mientras que en lo que se refiere a Latinoamérica, India, China, Norte de África, y el medio oriente incrementará en más de 300 %.<sup>15</sup>

La incidencia de casos de Alzheimer en Latinoamérica en adultos mayores de 65 años es de 7.1 % parecido al de países desarrollados; específicamente en Perú la prevalencia es de 6.85 %, siendo el Alzheimer la forma de demencia más común en el país. La epidemiología de esta enfermedad en Latinoamérica es mucho mayor que en países desarrollados, esto se debe a los bajos niveles socio-económicos y educativos, que influyen en el desarrollo a nivel crónico de la EA. Por eso es que la demencia, en un aspecto general, se considera como un problema de salud pública en Latinoamérica.<sup>16</sup>

Si se basa la prevalencia de esta enfermedad de acuerdo a género, estudios en Latinoamérica indica que para ambos géneros se tiene un promedio de producirse o presentarse la enfermedad a la edad de 65 a 69 años; si se toma solo a las mujeres, el resultado de presentarse la enfermedad va de 70 a 74 años, por otro lado para el grupo masculino se mostró una tasa levemente superior que el de mujeres. Por lo tanto, la prevalencia de que se produzca esta enfermedad en Latinoamérica en mayores tasas que en países desarrollados, puede deberse a distintas razones como, el acceso limitado a una atención médica primaria y los bajos niveles de educación.<sup>17</sup>

Un gran número de factores ha sido asociado con el incremento del riesgo de EA, pero entre ambos, la enfermedad cerebrovascular y sus antecedentes son los más consistentemente reportados. Una historia con diabetes, hipertensión, el tabaquismo, la obesidad y la dislipidemia se ha encontrado que puede aumentar el riesgo. Aunque una enfermedad cerebrovascular, infartos corticales, infartos individuales, hemorragia cerebral, cambios corticales dado por la hipoperfusión, cambios en la materia blanca y vasculopatías, son los antecedentes a la demencia en general.<sup>18</sup>

#### 1.1.3. Patología

A través de los años las dos características neuropatológicas de la enfermedad del Alzheimer han sido las placas Beta amiloide y los ovillos neurofibrilares, que han sido estudiados extensivamente en un intento de entender las causas subyacentes e identificar un potencial tratamiento para la enfermedad.<sup>19, 20</sup>

N101 6

En la actualidad la EA sólo puede ser confirmado con exámenes post-mortem, y un diagnóstico clínico se puede realizar sólo después de que se haya presentado la enfermedad, por lo que se realizan varios estudios en cuanto a mejorar el diagnóstico de la enfermedad en donde lugares como el "Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes cerebrovasculares" y "La Asociación de Alzheimer" que combina criterios los patrones clínicos y neuropatológicos y asignan diagnósticos como "posible", "probable", y "definitivamente es EA".<sup>21</sup>

En la actualidad si es que se hace el estudio de la sección transversal del cerebro humano en una persona con Alzheimer este revelaría una atrofia cerebral macroscópicamente visible en las regiones que implica el aprendizaje y el proceso de memoria, incluyendo la corteza temporal, parietal y frontal también conocido como hipocampo (ver Figura 1.1). Esta reducción del volumen del cerebro da lugar a una profunda degeneración de las neuronas y la sinapsis.<sup>22,23</sup> Para observar si realmente estas lesiones son causadas por las placas seniles u ovillos neurofibrilares, se hace un estudio histopatológico específico para EA.<sup>24</sup>



**Figura 1.1** Los cerebros la enfermedad del Alzheimer (EA) se caracteriza por tener una notable atrofia en comparación con los cerebros control.<sup>24</sup>

Con respecto a los cambios estructurales que se producen en el cerebro son clasificadas como: lesiones "positivas" a la acumulación de placas y ovillos, hilos, neuritas distróficas, angiopatía amiloide cerebral (AAC) y otras lesiones que se observan en los cerebros de pacientes con EA, y lesiones "negativas" que comprenden la atrofia masiva, consecuencia de la pérdida de neuronas y la degeneración de axones y sinapsis. <sup>25, 26</sup>

Cada una de estas lesiones presenta un patrón característico en la EA, la cual provee algunas claves acerca de la relación entre estas lesiones y el progreso de los síntomas y la enfermedad. Existen también cambios estructurales en la neuropilo asociado con las placas y lo ovillos que contribuyen con la discapacidad cognitiva. Estas placas amiloideas aparecen en el cerebro en una etapa temprana de la enfermedad y va progresando lentamente, empieza con la corteza cerebral y pasa a la allocorteza, luego llega hasta el diencéfalo, el cuerpo estriado, y el prosencéfalo basal de núcleos colinérgicos, seguido por la progresión a los núcleos del tronco cerebral y, finalmente, al cerebelo.<sup>27</sup>

Recientes estudios en imágenes radiológicas han sido capaces de detectar las características patológicas de la enfermedad del Alzheimer en pacientes vivos, así mejorando un diagnóstico exacto y una selección de pacientes para las pruebas clínicas. Básicamente este proceso se basa en inyectar un compuesto (PbI) en la sangre que se unirá a los depósitos de proteínas beta amiloide fibrilares (placas amiloide), si estos se llegan a unir al compuesto con ayuda de un Tomógrafo de emisión de positrones (TEP), pueden ser detectados con este equipo; pero se ha podido observar que este compuesto comienza a presentar unas reacciones causa-efecto con respecto a la enfermedad pasados unos 5 años de detectada la enfermedad.<sup>28, 29</sup>

### 1.1.4. Fisiopatología

Con respecto a la fisiopatología, existen muchas hipótesis que han sido puestas como la base de los diversos factores causantes de esta enfermedad, que traen consigo como consecuencia los desórdenes multifactoriales; las hipótesis más comúnmente tomadas por los científicos son la de las Beta amiloide ( $\beta$ A) o la hipótesis de la proteína Tau.<sup>30, 31</sup>

Aunque la creciente evidencia ha demostrado que el estrés oxidativo es un factor importante que contribuye a la iniciación y progresión de la EA; sin embargo, los mecanismos que conducen a la alteración del equilibrio redox y las fuentes de radicales libres sigue siendo difícil de alcanzar. Las especies reactivas de oxígeno excesivas pueden generarse a partir de mecanismos tales como la disfunción mitocondrial y/o la acumulación aberrante de metales de transición, mientras que la acumulación anormal de proteínas  $\beta A$  y tau parece promover el desequilibrio redox. El resultado de estrés oxidativo ha sido implicado con las  $\beta A$  o neurotoxicidad con proteínas Tau. Además, la evidencia ha sugerido que el estrés oxidativo puede elevar la producción y la agregación de  $\beta A$  y facilitar la fosforilación y la polimerización de tau, formando así un ciclo vicioso que promueve la iniciación y progresión de la EA. <sup>32-34</sup>

En la actualidad se ha observado que la hipótesis más frecuentemente usada es la de la ruta de la Beta amiloide, la cual ha prevalecido durante las dos últimas décadas.<sup>35</sup> Estudios recientes han descubierto el rol de los oligómeros de  $\beta$ A en la interrupción de la sinapsis, con lo cual se sugiere que este destruye la integridad de las funciones del cerebro.<sup>36, 37</sup>



### • Vía amiloidogénica

Como se dijo la Beta amiloide es una de las características de la enfermedad del Alzheimer, donde sugiere que esta proteína tiene muchos roles fisiológicos. Existen tres posibles mecanismos para la fisiopatología del Alzheimer dependiente de  $\beta$ A: la primera, la agregación de  $\beta$ A; la segunda, el incremento de la producción de  $\beta$ A; y la tercera, la alteración de la degradación de la  $\beta$ A.<sup>38</sup>

Las condiciones que vuelven a la Beta amiloide ( $\beta$ A) una molécula patológica no está del todo claro, pero se cree que es dependiente de la concentración de esta proteína; es por ello que la acumulación de la  $\beta$ A empieza alcanzar niveles tóxicos.<sup>39</sup>

La proteína de la Beta amiloide se da naturalmente dentro del cerebro humano como un fragmento proteolítico de la proteína precursora amiloidea (PPA).<sup>40</sup> La PPA posee una estructura anfifílica con terminales N-hidrofílico y C-hidrofóbico. El término de la C-terminal es variable, y produce proteínas con un rango de largo de entre 37 a 42 residuos de aminoácidos. Las dos formas más estudiadas de  $\beta$ A son las aloformas  $\beta$ A40 y  $\beta$ A42, las cuales consisten de 40 o 42 residuos de aminoácidos respectivamente.<sup>41,42</sup>

Las fibrillas de  $\beta$ A forman el núcleo de las placas amiloide dentro del parénquima cerebral, una de las características de la EA, o se acumulan en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales, asociados con la angiopatía amiloidea cerebral (AAC). Una gran variedad de agregados de  $\beta$ A han sido identificados, como dímeros, oligómeros heteromorfos, o protofibrillas, que representan el último estado antes de finalmente pasar a ser fibrillas.<sup>43</sup>

De acuerdo con la hipótesis de la amiloide, en las células de las neuronas se puede dar dos vías: la primera en donde la PPA puede ser procesada por una vía no amiloidogénica, que previene la formación de la  $\beta$ A, o por la vía amiloidogénica que da como producto a la  $\beta$ A. En la vía no amiloidogénica, la PPA es reconocida por la enzima transmembrana  $\alpha$ -secretasa, donde corta a la proteína en dos fragmentos la PPAs $\alpha$  y la  $\alpha$ -CTF que luego este último fragmento vuelve adentro de la neurona donde es reconocida por la  $\gamma$ -secretasa y esta la secciona en dos fragmentos en el p3 y la AICD, que como se ve ningún fragmento resultante es la  $\beta$ A. En el caso de la vía amiloidogénica, la PPA no es reconocida por la  $\alpha$ -secretasa, por lo que esta proteína ingresa nuevamente a la neurona donde en un endosoma la enzima  $\beta$ -secretasa reconoce a la PPA y comienza con una escisión dando como resultado a la PPAs $\beta$  y la  $\beta$ CTF; seguidamente la B-CTF es cortada por la enzima  $\gamma$ -secretasa, que es un complejo de presinilinas 1 y 2 (PS1/2), para generar a la AICD y la beta amiloide.<sup>44, 45</sup> La  $\gamma$ -secretasa puede trabajar bajo condiciones fisiológicas entre los aminoácidos 37 a 43 de la secuencia de la  $\beta$ A, generando así diversas especies de  $\beta$ A.<sup>46</sup>

Siguiendo por la vía amiloidogénica (ver Figura 1.2), la beta amiloide es secretada de la neurona, donde en una primera parada, estas deberían ser degradadas por enzimas como la cistatina C, plasminógeno y tPA/uPA, si en este paso algunas beta amiloide no son degradadas, forman pequeños oligómeros (que pueden ser dímeros y trímeros), y pasan por una segunda etapa de degradación por otro grupo de enzimas; los oligómeros que no sean degradados en esta etapa son los que pasaran a formar parte de las placas seniles o placas amiloideas.<sup>47,48</sup>

La especie más abundante de  $\beta$ A es la  $\beta$ A40, pero la  $\beta$ A42 es la más tóxica debido a su alta hidrofobicidad y su tendencia a formar agregados. Pero la proteína de la  $\beta$ A por sí misma no es tóxica, ya que esta también cumple un rol fisiológico en las neuronas, en donde estudios han determinado que interviene en el aprendizaje y retención de la memoria, que en bajas dosis este mejora la memoria, mientras que por el contrario en altas dosis este afecta la memoria.<sup>49</sup>

Estudios nos indican que la enfermedad del Alzheimer pude resultar de la desregulación de la neurotransmisión glutamatérgica excitatoria por la  $\beta$ A, produciendo alteraciones sinápticas. En donde el Glutamato es el mayor neurotransmisor excitatorio, y es el responsable de munchas funciones en el cerebro, incluyendo la cognición y la memoria. El glutamato contribuye al aprendizaje dependiente del hipocampo y la potenciación de la memoria a largo plazo. Además es beneficioso a bajos niveles, pero en altas concentraciones de glutamato extracelular puede producir la muerte celular a través de la excesiva activación de los receptores de glutamato, proceso conocido como excitocicidad.<sup>50</sup>



Figura 1.2 Presentación esquemática de las vías de procesamiento de PPA.<sup>30</sup>

### 1.1.5. Tratamiento

En la actualidad, muchos de los fondos para búsquedas básicas y traslacionales en EA han sido invertidos en desarrollo de tratamientos que puedan detener la producción de  $\beta$ A o aumentar su remoción, los cuales han tenido fallas en pruebas clínicas.<sup>51</sup>

La enfermedad del Alzheimer es compleja, y es improbable que un fármaco intervenga satisfactoriamente a tratar esta enfermedad. Los enfoques actuales se centran en ayudar a las personas que padecen esta enfermedad a mantener una buena función vital, controlar los síntomas del comportamiento y retrasar o detener los síntomas de la enfermedad.

Investigadores esperan poder desarrollar terapias con mecanismos de marcadores específicos, genéticos, moleculares y celulares así que las causas subyacentes de la enfermedad pueden ser detenidas.<sup>52</sup>

Actualmente, existen muchas prescripciones aprobadas por la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos) para tratar a personas que han sido diagnosticadas con la

enfermedad del Alzheimer. El poder tratar los síntomas de la enfermedad proporciona al paciente comodidad, dignidad e independencia durante un largo periodo de tiempo. Es importante entender que ninguno de los medicamentos detiene a la enfermedad por sí misma.<sup>53</sup>

Para tratar el Alzheimer leve o moderado (es decir en su fase pre-clínica y clínica) se usan los medicamentos que inhiben la colinesterasa, las cuales pueden ayudar a reducir o prevenir los síntomas que van empeorando en un determinado tiempo y puede ayudar a controlar algunas síntomas del comportamiento, algunos ejemplos de estos medicamentos son la galantamina, rivastigmina, donazepil.<sup>54</sup>

Varios científicos aún no han podido comprender completamente como el inhibidor de colinesterasa trabaja para tratar la enfermedad del Alzheimer, pero algunos dicen que posiblemente previene la descomposición de la acetilcolina, un químico del cerebro que se cree que es importante para la memoria y el pensamiento. Conforme va desarrollándose la enfermedad, el cerebro va produciendo menos y menos acetilcolina, por lo tanto los inhibidores de colinesterasa pueden ir perdiendo su efecto. Estudios no publicados comparan directamente estas drogas, porque ellos trabajan en caminos similares, cambiando de un fármaco a otro para ver la probabilidad de si produce algún cambio significante. Pero un paciente puede responder mejor a una droga que a otra.<sup>55</sup>

En el caso del tratamiento del Alzheimer moderado a severo existe un medicamento llamado Namenda (memantina), un antagonista del N-metil D-aspartato (NMDA), que es prescrito para tratar las etapas de moderado a severo de la enfermedad del Alzheimer. El efecto principal de esta droga o fármaco es de retrasar el progreso de algunos de los síntomas del paciente. Este puede permitir a los pacientes a mantener ciertas funciones diarias un poco más de lo que les permitiría la enfermedad.<sup>56</sup>

Por ejemplo la Namenda puede ayudar al paciente en las últimas etapas de la enfermedad a mantener su habilidad de poder ir al baño independientemente por varios meses más, algo que beneficiaria tanto a pacientes como cuidadores. Se cree que este fármaco ayuda a regular el glutamato, un importante químico del cerebro, que cuando es producido en exceso, el glutamato puede dirigir a la muerte celular; esto debido a que el antagonista NMDA trabaja muy diferente a los inhibidores de la colinesterasa, los cuales ambos pueden ser prescritos en combinación.<sup>57</sup>

Por otro lado, investigaciones o teorías dicen que si la  $\beta$ A inicia y sostiene una cascada especifica en la EA, la eliminación o prevención de esta podría ser lo más ideal para detener su aparición o posterior progresión. En un estudio humano, una vacuna de  $\beta$ A redujo el total de carga de placas amiloidea, mientras que en otros estudios, infusiones intravenosas características del ensayo de anticuerpos para  $\beta$ A fallaron al cumplir su primer objetivo.<sup>58</sup>

Otros tratamientos que se han ido desarrollando a menudo implican intervenciones médicas drásticas como la quimioterapia y el trasplante de hígado o corazón, o como ya se ha descrito el uso de fármacos inhibidores de la formación de la fibrilla son escasos<sup>59</sup> Así es como algunos compuestos provenientes de plantas, han sido o han generado gran interés para la investigación de posibles biofármacos que podrían inhibir a la formación de las placas Beta amiloide.<sup>60</sup>

#### 1.2. Ciclótidos

Los ciclótidos son péptidos cíclicos de aproximadamente unos 28 a 37 aminoácidos, caracterizados por tres enlaces disulfuro, estos enlaces se deben a que en su estructura tiene 6 residuos conservados de cisteína los cuales forman un nudo cíclico de cistina (NCC), el cual le confiere una alta estabilidad a la estructura.<sup>61</sup>

Los ciclótidos fueron definidos como una única familia de proteínas en 1999, con el nombre proveniente de los términos "ciclo" y "péptido" que indicaban sus mayores características que era de desde el inicio al termino del péptido tenía una estructura circular.<sup>62</sup> El descubrimiento de los ciclótidos fue dado por las aplicaciones de la medicina nativa, donde un té preparado a partir de la planta *Oldenlandia affinis* que era usado por las mujeres en varias partes de África para facilitar el parto de niños. En los años 70's el ciclótido Kalata B1 (de la familia *Rubiceae*) fue descubierto por Gran, como el responsable de estas actividades uterotónicas en el té, pero tuvieron que pasar otros 25

años antes de que se pueda conocer su secuencia y su estructura tridimensional (ver Figura 1.3)<sup>64</sup>.



Figura 1.3 Ilustración de la línea del tiempo acerca de las investigaciones relacionadas ciclótidos. <sup>63</sup>

El campo de investigación se quedó en silencio por unos 20 años, sin reportes que indicaran sobre la Kalata b1 sino hasta 1995 en donde se vio su estructura tridimensional, donde se revelaba en detalle el esqueleto macrocíclico y la propuesta del arreglo del nudo de enlaces disulfuro. Desde estos inicios, el campo de los ciclótidos se ha expandido significativamente, tanto así que en la actualidad existen más de 300 investigaciones publicadas sobre ciclótidos o muy relacionados a estos péptidos. Además que se siguen encontrando más ciclótidos en disitintas especies de plantas, que tan solo en la década pasada, el número de descubrimientos ha ido incrementando, y ha llegado a unas 150 secuencias de ciclótidos que han sido identificados.<sup>65</sup>

Los ciclótidos se encuentran en ciertos tipos de familias de plantas, en donde en la familia *Rubiceae* y *Violaceae* se encuentran con más abundancia, pero también se han encontrado en las familias *Cucurbitaceae, Fabaceae, Solanaceae*. Los ciclótidos son la clase más

grande de péptidos sintetizados ribosomalmente en plantas, y su distribución y evolución dentro de las plantas aún no está claro.<sup>66</sup>

La distribución de los ciclótidos en las *Rubiceae* es más limitada comparada con las *Violaceae*, sin embargo, el grado en que los ciclótidos están presentes en las *Rubiceae* aún no está claro, en parte porque menos de 10œ de especies rubiáceas existentes han sido evaluadas para la expresión de ciclótidos. *Rubiaceae* es la cuarta familia de angiospermas más extensa con un aproximado de 650 géneros y 13 000 especies de arbusto y árboles pequeños que se producen principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Los alcaloides son frecuentes en toda la familia, y los miembros familiares son una fuente importante de recursos de café, madera, tinte, plantas ornamentales, y medicamentos de venta con receta médica.<sup>67</sup>

#### 1.2.1. Estructura de los Ciclótidos

Los ciclótidos usualmente tienen una estructura primaria pequeña, que va desde los 28 a 37 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 2.8 a 3.7 kDa. Este grupo de proteínas están caracterizadas por poseer una peculiar estructura cíclica, debido a la falta de la N- y C-terminal que están unidos por un enlace peptídico y que tienen seis residuos conservados de cisteína, los cuales forman tres enlaces disulfuro.<sup>68</sup>

Los ciclótidos muestran esta ciclación conocida como "cabeza-cola" en su cadena polipeptídica, la cual es conocida parcialmente. Primero es un anillo formado por dos conexiones entre los enlaces disulfuro CysI-CysIV y CysII-CysV posicionados internamente en la estructura, con un tercer puente disulfuro formado por CysIII-CysVI pasando entre los otros dos enlaces anteriores, por lo tanto estos puentes enlazados forman un nudo de cistina cíclico (NCC) (ver Figura 1.4).

La naturaleza cíclica de la cadena polipeptídica entre los residuos de cisteína, forman seis bucles, estructuralmente importantes para la acción biológica de estos péptidos, es conservada, pero el número de residuos de aminoácidos puede variar de un ciclótido a otro.<sup>69</sup>



**Figura 1.4** (A) Estructura química del prototipo de ciclótido kalata B1. (B) Estructura 3D de un ciclótido, donde se ve el nudo cístina (NCC), una cadena principal con bucles de secuencia (1-6) y los tres enlaces puente disulfuro.<sup>70,71</sup>

Para poder determinar la estructura primaria del ciclótido, el esqueleto circular presenta la primera barrera para determinar la estructura, porque los ciclótidos no son susceptibles a cualquier secuenciación N- o C- terminal. Al principio se usó la secuenciación de Edman para obtener la secuencia primaria, pero con el tiempo ahora se usa un espectrómetro de masa.<sup>70</sup> Para determinar las estructuras secundarias y terciarias, se han hecho varios intentos por cristalizar los ciclótidos, ninguno ha llegado a ser probado exitosamente y toda la información existente de las estructuras terciarias de los ciclótidos viene de una espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).<sup>72</sup>

Los ciclótidos son extremadamente estables y sus residuos altamente conservados de las diferentes secuencias juegan un papel estructural importante y roles funcionales.<sup>73</sup> También los nudos de cistina son ahora una característica establecida de los ciclótidos casi como una firma de la estructura del ciclótido. Los residuos de cisteína son a menudo envasados herméticamente en el núcleo de los péptidos ricos en disulfuros, lo que esto significa que las 15 posibles conectividades de los disulfuro pueden ser concebibles. Para determinar esta conectividad se realizaron distintos cálculos de distancia en donde la

combinación de la conectividad de los enlaces I-IV, II-V, III-VI fueron los que se demostró que tenían una alta estabilidad térmica, química y enzimática.<sup>74</sup>

Ingenieros quienes construyen estructuras macroscópicas saben que los enlaces de abrazaderas cruzadas proporcionan fuerza a las estructuras, y en este caso los enlaces disulfuro hacen lo mismo para las proteínas.<sup>75</sup> Dos otras clases de nudos de cistina son también reconocidos, el inhibidor del nudo de cistina y el factor de crecimiento del nudo de cistina, el cual como su nombre lo dice, se refiere a los tipos de moléculas en donde estos nudos se producen.<sup>76</sup>

### 1.2.2. Subfamilias de los Ciclótidos

Los ciclótidos están divididos en dos grandes subfamilias: Los Möbius y las bracelet (ver Tabla 1.1).<sup>77</sup>

La principal característica que los distingue es la presencia del residuo conservado Prolina en la conformación "cis" en el bucle 5 en la subfamilia Möbius, causando una torsión de 180° en el bucle, el cual no se ve en la subfamilia bracelet. Esta conformación se debe a la presencia de un residuo de triptófano (Trp) que precede a la prolina (Pro). Por lo tanto, ocurre un interacción entre el anillo pirolidínico de prolina con el lado de la cadena del anillo aromático del triptófano, provocando una conformación de cis-prolina (Cis-Pro).<sup>78</sup>

Otra característica que distingue a los Möbius del bracelet, es la cantidad de residuos hidrofóbicos y su lugar en la superficie. Por ejemplo, cerca del 60% de los residuos superficiales en los ciclótidos tipo brazalete son hidrofóbicos, y se ubican en bucles 2 y 3. Por el contrario, solo el 40% de los residuos superficiales en los tipos Möbius, son hidrofóbicos y se encuentran localizados principalmente en los bucles 2,5 y 6.<sup>79</sup> Sin embargo, estas grandes familias también contienen otros residuos altamente conservados como es el caso de la Glutamina (Glu) en el bucle 1 y también el sitio natural de ciclación, Asparragina y Ácido aspártico (Asn/Asp) en el bucle 6.<sup>80</sup> Ahora se están comenzando a estudiar ciclótidos que tienen propiedades tanto de Möbius como de bracelet (por ejemplo la Kalata B8 y Psyle), normalmente se refieren a ellos como ciclótidos híbridos.<sup>81</sup>
Ciclótido	AA	Secuencia	PDB
Subfamilia Möbius	5		
Kalata B1	30	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN	1NB1
Kalata B2	29	GLPVCGETCFGGTCNTPGCSCTWPICTRD	1PT4
Kalata B7	29	GLPVCGETCTLGTCYTQGCTCSWPICKRN	2JWM
Kalata B12	28	GSLCGDTCFVLGCNDSSCSCNYPICVKD	2KVX
Cyclociolacin O14	31	GSIPACGESCFKGKCYTPGCSCSKYPLCAKN	2GJ0
Varv F	29	GVPICGETCTLGTCYTAGCSCSWPVCTRN	3E4H
Subfamilia Pulsera	a (Bra	acelet)	
Circulin A	30	GIPCGESCVWIPCISAALGCSCKNKVCYRN	1BH4
Circulin B	31	GVIPCGESCVFIPCISTLLGCSCKNKVCYRN	2ERI
Cycloviolacin O1	30	GIPCAESCVYIPCTVTALLGCSCSNRVCYN	1NBJ
Cycloviolacin O2	30	GIPCGESCVWIPCISSAIGCSCKSKVCYRN	2KNM
Kalata B5	30	GTPCGESCVYIPCISGVIGCSCTDKVCYLN	2KUX
Kalata B8	31	GSVLNCGETCLLGTCYTTGCTCNKYRVCTKD	2B38
Tricyclon A	33	GGTIFDCGESCFLGTCYTKGCSCGEWKLCYGTN	1YP8
	$\odot$	GDPTFCGETCRVIPVCTYSAALGCTCDDRSDGLCK	
Palicourein	37	RN	1R1F
Vhl-1	31	SISCGESCAMISFCFTEVIGCSCKNKVCYLN	1ZA8
Vhl-2	30	GLPVCGETCFTGTCYTNGCTCDPWPVCTRN	2KUK
Vhr1	30	GIPCAESCVWIPCTVTALLGCSCSNKVCYN	1VB8
Subfamilia inhibid	lor de	e tripsina	

Tabla 1.1 Ciclótidos Representativos	de las	subfamilias	Möbius,	bracelet	e
inhibidores de tripsina. <sup>77</sup>					

UNIVERSIDAD

de santa maría

CATÓLICA

# Subfamilia inhibidor de tripsinaMCoTI-II34GGVCPKILKKCRRDSDCPGACICRGNGYCGSGSD11B9

Entre las proteínas pertenecientes a la subfamilia Möbius, prácticamente no hay ninguna variación en el número de residuos de aminoácidos entre los bucles, además ellos tienen aminoácidos de cargas negativas o neutrales. Por otro lado los de tipo bracelet muestran una clara variación en el tamaño de los bucles y, normalmente los aminoácidos pertenecientes a esta subfamilia tienen carga positiva.<sup>82</sup>

Además de estas dos clasificaciones, existe una tercera y pequeña subfamilia llamada inhibidores de tripsina, actualmente compuesto de dos ciclótidos. Estos ciclótidos no comparten una homología significante con los otros dos tipos de ciclótidos, más que la presencia de los tres puentes disulfuro, pero en el análisis estructural por RMN ha mostrado que adoptan una topología similar del nudo de cistina y la estructura cíclica.<sup>83</sup>



## 1.2.3. Biosíntesis

En la última década, los péptidos cíclicos naturales más conocidos eran pequeños, y se creía que estos eran sintetizados no ribosomalmente, como por ejemplo los bien conocidos péptidos cíclicos fúngicos, como la ciclosporina. Sin embargo, esta ahora muy claro que todos los reinos de la vida producen péptidos cíclicos sintetizados ribosomalmente, pero se conoce muy poco de cómo se produce este.<sup>84</sup>

Los péptidos cíclicos sintetizados ribosomalmente son codificados como genes, transcrito en RNA y sujetos a un proceso ribosomal para producir proteínas precursoras lineales, de las cuales se procesaran posteriormente las proteínas circulares; lo que implica una serie de reacciones bioquímicas complejas.<sup>85</sup> El gen codificado RTD-1 (rhesus theta defensin-1) se sintetiza por ligadura hetero-dimerica post-traduccional de la cabeza a la cola de dos péptidos precursores separados, RTD-1a y RTD-1b. La modificación post-traduccional es requerido para producir un RTD-1 maduro.<sup>86</sup>

Los genes codificados de la proteína precursora obtienen una secuencia señal que es reconocido por el retículo endoplasmático; un dominio N-terminal repetido (NTR), que forma un alfa-hélice que tiene un posible rol en el procesamiento de los ciclótidos y pueden ser directamente enlazado al transporte de los ciclótidos por la vía secretora, y también un pro- dominio N-terminal (PDNT) (ver Figura 1.5), el cual tiene alrededor de 46 a 68 residuos de aminoácidos, el cual no tiene un rol en la maduración de los ciclótidos y también un pro-péptido C-terminal. En donde el proceso enzimático del precursor conduce a la producción del ciclótido maduro.<sup>87</sup>

Múltiples copias del dominio del ciclótido y regiones flanqueantes cortas N- y Cterminal están presentes, generando varios ciclótidos de un solo gen. Esta multiplicidad dentro de un gen combinado con la presencia de múltiples genes de ciclótidos dentro de una planta, permite a la gran cantidad de ciclótidos presentes en especies de plantas individuales.

Durante la biosíntesis, se cree que los enlaces disulfuro son formados en el núcleo del precursor dentro del retículo endoplasmático, con ayuda de una enzima PDI (disulfuro isomerasa) la cual ha sido recientemente aislado de la *O. afiinis*; después de este paso, los

precursores son llevados al aparato de Golgi, donde aún nos es conocido como llevados del aparato de Golgi a la vacuola o si ellos entran por defecto a la vía y son secretados.<sup>88</sup>



Figura 1.5 Biosíntesis y la estructura de ciclótidos. Los ciclótidos se sintetizan como proteínas precursoras, con una región señal de retículo endoplasmático (RE) conservada, una pro-región, una señal de repetición N-terminal (NTR), la secuencia madura del ciclótido y una cola corta C-terminal. La NTR y la región del ciclótido pueden ser repetidos más de tres veces en precursores diferentes, codificando diferentes o idénticos ciclótidos.<sup>70</sup>

Según estudios realizados, se cree que posiblemente la ciclación del ciclótido se da dentro de la vacuola, donde con una enzima aun no conocida que corta la NTR y expone a la proto N-terminal del dominio del ciclótido. Luego viene la asparaginil endoproteinasa (AEP), enzima que prefiere cortar adyacente a residuos de asparragina, el cual corta los dominios N- y C-terminal para formar un nuevo péptido ciclado (ver Figura 1.6). Pero de todas formas, como se dijo esta forma de síntesis es solo una hipótesis basada en estudios o investigaciones, ya que la locación vacuolar no ha sido demostrado para ciclótidos y no ha sido determinado que esta puede a otras proteínas a la vacuola.

Distintos estudios mutagenéticos se realizaron para explorar la biosíntesis para dar soporte a la hipótesis de la AEP, el estudio se realizó en Tabaco y Arabidopsis transgénicos. Ninguna de estas plantas al natural producen ciclótidos, pero lo hacen después de la transfección con genes ciclótidos. El sitio solo de mutación cerca del N- o C- terminal modulan dramáticamente la producción de ciclótidos y en particular substituyendo la Asparragina (Asn) a cualquier otro residuo que anula la producción del péptido cíclico; siendo así fuertemente apoyada la hipótesis de la AEP.<sup>89</sup>



**Figura 1.6** Ilustración esquemática de la estructura genérica del precursor de proteína que codifica a los ciclótidos. Los ciclótidos son sintetizados ribosomalmente. Los genes codifican la proteína precursora que contiene la señal RE, el prodominio N-terminal, un dominio péptido maduro y, un pro péptido C-terminal. Una característica de todas las secuencias que tienen un residuo de asparragina o un ácido aspártico en el punto procesado C-terminal del dominio del ciclótido, donde la enzima asparaginil endopeptidasa (AEP) se ve implicada para eventualmente producir el ciclótido maduro.<sup>86</sup>

## 1.2.4. Actividades Biológicas

En general el uso de los péptidos como productos farmacéuticos ha sido limitado debido a la insuficiente estabilidad y biodisponibilidad bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, la estabilidad excepcional, la plasticidad de la secuencia, y un marco de flexibilidad de ciclótidos, junto con sus numerosas y potentes actividades biológicas como resultado de su actividad de dirigirse a las membranas lipídicas, hacen hincapié en la afirmación de que estos polipéptidos cíclicos son candidatos ideales para estudios en el desarrollo de nuevos fármacos y bioplaguicidas.<sup>87</sup> La función natural especulada de los ciclótidos es en defensa de la planta como se demuestra en distintos reportes acerca de sus propiedades antibacteriana/antimicrobiana, insecticida, antihelmínticas, nematicida, antiincrustante y, moluscocidas. El uso de ciclótidos en aplicaciones para la salud humana fue investigado primero durante el descubrimiento de la Kalata B1, y a través de su actividad uterotónica fue establecida en úteros de ratas, conejos, y humanos, no es recomendado como un agente oxitócico porque tiene severos efectos secundarios. Durante la década pasada, abundantes investigaciones dirigidas a la bioactividad demostraron que los ciclótidos tienen una gran variedad de actividades, incluyendo la antineurotensina, inhibidor de tripsina, hemolítica, citotóxico/antitumoral, y antivirales; donde varias de estas propiedades tienen una potencial relevancia terapéutica.<sup>88</sup>

## a) Actividad antiviral

Esta fue una de las primeras actividades proyectadas en los ciclótidos y su actividad ha sido confirmada en numerosos artículos científicos. La relación de actividad-estructura estudiada ha sido conducida y establecida que una pieza de residuos ubicados en la superficie de la Kalata B1 es importante para la actividad antiviral. También se ha demostrado que la estructura circular es esencial para su actividad antiviral. En los estudios más recientes, se encontró que la interacción de unión a la membrana es importante para la actividad antiviral, la cual aparece como el resultado de la habilidad de los ciclótidos Kalata B1 a dirigirse selectivamente y quebrantar la membrana que envuelve a las partículas virales. Así, como otros péptidos antivirales que inhiben la entrada viral en la célula hospedera, la Kalata B1 surge directamente como una actividad virocida por la orientación de la envoltura viral la cual comprende membranas como balsa muy rica en fosfolípidos fosfatidiletanolamina (PE).

Estudios con biosensores y RMN establecieron que la Kalata B1 hace interacciones específicas con los grupos principales PE, pero adicionalmente es modulado por interacciones hidrofóbicas de péptidos lipídicos. Kalata B1 no se dirige específicamente a fosfolípidos cargados negativamente, como muchos otros péptidos de membrana activa convencionales.<sup>89</sup>



## b) Actividad anticancerígena

Los ciclótidos tienen una citotoxicidad en contra de un número derivado de líneas de cáncer celular de diferentes tipos de cáncer incluyendo mieloma, leucemia de células T, cáncer de pulmón, linfoma y adenocarcinoma. El potencial anticancerígeno de los ciclótidos surge de su habilidad de dirigir selectivamente a células cancerosas sobre células normales, y de nuevo siendo la membrana el primer sitio objetivo. El índice terapéutico in vitro para las células de leucemia linfocítica crónica primaria es de 10, el cual es similar con respecto a otros tratamientos comparables como la doxorrubicina.

Además un número de estudios han mostrado citotoxicidad en líneas celulares cancerígenas, una ausencia de control en la forma de células no cancerígenas hace que la comparación con tratamientos actuales sea difícil. Hasta ahora la actividad prometedora en ensayos basados en células no ha sido trasladada en modelos de tumores en ratón in vivo donde la citotoxicidad considerable ha sido observada. Como consecuencia, la citotoxicidad de los ciclótidos contra las células cancerosas frente a células normales requiere de evaluaciones adicionales.<sup>90</sup>

### c) Actividad antimicrobiana

El primer informe de la actividad antimicrobiana en ciclótidos fue en 1999, y ha habido pocos reportes desde entonces. Estudios recientes sugieren algunos resultados contradictorios con respecto a estos estudios iniciales, por lo que el verdadero potencial de ciclótidos como agentes antimicrobianos no está claro aún. Parece que algunos ciclótidos exhiben actividad antimicrobiana bajo ciertas condiciones de ensayo, pero esta actividad no se mantiene en condiciones de alta salinidad, el cual se podría encontrar en sistema fisiológico. La Cycloviolacin O2 parece estar entre los ciclótidos antimicrobianos más activos. Ciertamente, el área requiere de más investigación, a pesar de que en esta etapa parece improbable que los ciclótidos sean clínicamente útiles como agentes antimicrobianos.<sup>91</sup>



## d) Actividad antihelmintica

Los ciclótidos han sido probados contra una variedad de parásitos de animales de granja y humanos. Estos han mostrado que tienen un actividad contra el *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, dos nematodos importantes gastrointestinales en ovejas. Más recientemente, se demostró que afecta al anquilostoma canino *Ancylostoma canimun*, y las larvas de *Necator americanus*, un anquilostoma humano. Esta es una nueva y prometedora área digna de investigación, ya que existe la posibilidad de plantas productoras de ciclótidos que pueden ser usadas como medicamentos naturales contra los parásitos que afectan principalmente a los países del tercer mundo.<sup>92</sup>

#### 1.3. Antecedentes para el Tratamiento de Alzheimer con ciclótidos

Los ciclótidos, según Julio Camarero, PhD., pueden ser sustitutos de varios fármacos. Ya que estos interfieren con las pequeñas hendiduras de unión, que definen las interacciones entre proteínas. Estos péptidos no sólo poseen ciertas características similares a anticuerpos, sino que también presentan un grupo de ventajas, como la capacidad de atravesar las membranas celulares.<sup>93</sup>

Estudios diversos han demostrado estas actividades de los ciclótidos como la inhibición de la prolil oligopeptidasa humana, enzima que al ser alterada su actividad puede ser la causante de enfermedades como la depresión clínica, esquizofrenia, enfermedades neuronales. Por lo tanto, existen estudios en los ciclótidos como posibles inhibidores de enzimas o proteínas que puedan desencadenar enfermedades en las personas.<sup>94,95</sup>

Otros estudios más relacionados con el Alzheimer, donde se utiliza un ciclótido para ver si puede inhibir a la p53, un supresor de tumor, que forma agregados de Beta amiloide en distintos tejidos y líneas celulares cancerígenas, desencadenando una posible carcinogénesis; en cuyos resultados del estudio realizado se vio que el ciclótido mejoró la estabilidad del p53.<sup>96</sup>

Acercándonos un pocos más a enfermedad es si del Alzheimer, se hizo un estudio acerca de la inhibición de la agregación de las proteínas tau, una de las hipótesis más usada después de la teoría de la Beta amiloide, en el cual en dicho estudio se observó que los

ciclótidos utilizados para ver si llegaban a inhibir la formación de ovillos neurofibrilares que son consecuencia de la múltiple fosforilación de las proteínas Tau, si podían ser utilizados como potenciales andamios para la inhibición de estas fibrillas.<sup>97–99</sup>

Es debido a estos estudios realizados a las propiedades que poseen los ciclótidos que se quiere estudiar en la presente tesis si los ciclótidos de la familia *Rubiaceae* pueden llegar a interaccionar con las proteínas Beta amiloide, inhibiéndolas de forma que estas no puedan formar oligómeros los cuales finalmente forman las placas seniles, causantes de la enfermedad del Alzheimer.<sup>100,101</sup>

## 1.4. Química Computacional

La química computacional puede ser muy vagamente definida como un modelamiento químico basado en una descripción a nivel atómico o molecular. Dicho término abarca un rango bastante amplio de teorías y métodos.<sup>102</sup>

La química computacional puede llegar a ser una herramienta valiosa para la investigación. Este método es usualmente usado para estudiar las características de moléculas individuales, interacciones entre moléculas, y la respuesta de las moléculas a las perturbaciones externas (como campos eléctricos).

La química computacional se basa en el uso de computadoras para la resolución de ecuaciones matemáticas para describir el comportamiento de sistemas químicos. En este método, los modelos teóricos son usados para representar a los sistemas reales. Varias de las aproximaciones están involucradas en las soluciones de las funciones de onda electrónicas y el modelamiento de las interacciones intermoleculares, como el muestreo de la fase de espacios. Esto es siempre necesario para un desarrollo más exacto y eficiente de los métodos de química computacional.

## 1.4.1. Mecánica Clásica

Mientras que los cálculos de la estructura electrónica nos dan acceso a la información ab initio para sistemas químicos, el alto costo computacional hace que estos sean inadecuados para casos donde la dinámica de un largo número de átomos es más importante que el comportamiento individual de los electrones. La Mecánica Molecular puede ofrecer una forma simple de representación molecular que hace posible realizarlo por medio de cálculos significativamente más rápidos.<sup>103</sup>

Los cálculos que caen bajo protección de la Mecánica Molecular explotan el hecho que en la mayoría de los casos donde los enlaces químicos no se rompen o se forman, los electrones y núcleos pueden ser condensados a una sola unidad para dar una representación de todo el átomo, el cual puede ser sometido a fuerzas interatómicas para reproducir un ambiente químico real.

Los cálculos de mecánica molecular operan basados en un conjunto predefinido de funciones y parámetros los cuáles han sido ajustados a otros resultados experimentales o ab initio. Estos parámetros pueden ser diseñados para dar una representación razonable de una amplia gama de sistemas químicos, o alternativamente puede ser optimizado para producir un sistema particular de interés a un alto grado de precisión. Colectivamente, las funciones usadas para describir interacciones dentro de un cálculo de mecánica molecular son denominadas potenciales interatómicos.<sup>104</sup>

## a) Campos de fuerzas

La calidad de los resultados producidos por los cálculos MM obviamente dependen de los parámetros escogidos para varias interacciones y algunas formas de parametrización deben ser emprendidas. Un conjunto de parámetros para una sola molécula o grupo de moléculas son llamados campos de fuerza.

En general, el potencial de energía del sistema puede ser representado como la suma de las funciones del campo de fuerza:

$$E = \sum_{ij} k_{ij} x_i x_j + \sum_{ijk} k_{ijk} x_i x_j x_k$$
(1.1)

Donde,  $k_{ij}$  es una constante dependiente de la distancia del enlace y  $k_{ijk}$  es una constante dependiente del ángulo del enlace.<sup>105</sup>

Es común para los campos de fuerza que estos tengan 5 partes básicas de términos intrae inter-molecular que siempre están incluidas. Estos son los enlaces, ángulos de enlaces torsiones e interacciones no enlazantes donde este último incluye las interacciones electrostáticas y las interacciones de van der Waals (vdW) las cuales son típicamente modeladas por el potencial de Lennard-Jones (LJ) (Ver Figura 1.8).



**Figura 1.7** En la Ilustración se muestran las cinco partes básicas en un Campo de Fuerza. En la parte de arriba están las interacciones enlazantes; enlaces de estiramiento, flexión de ángulo y torsión alrededor del enlace. En la parte baja están las interacciones no enlazantes; las interacciones electrostáticas y vdW.<sup>106</sup>

Un ejemplo de la forma más simple del funcional del campo de fuerza es dada en la siguiente ecuación:

$$E_{MM} = E_{enlace} + E_{ang} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{ele}$$
(1.2)

Donde  $E_{MM}$  es el potencial de energía como una función de las posiciones de las N partículas,  $E_{enlace}$  es la energía del unión enlazante,  $E_{ang}$  es la energía del ángulo del enlace,  $E_{tors}$  es la energía torsional para la rotación de tres enlaces conectados;  $E_{vdw}$  y  $E_{ele}$  describen las interacciones no enlazantes,  $E_{vdw}$  es la interacción de van der Waals y es usualmente modelado por el potencial de Lennard-Jones y,  $E_{ele}$  es la interacción electrostática.

El hecho de que los parámetros en la ecuación están conectados directamente a los movimientos hace más fácil de entender su comportamiento físico y como mejorar la parametrización.



## b) Condiciones Periódicas de Contorno

Para las Condiciones Periódicas de Contorno se utiliza una caja de simulación (simulation box) que tiene un número finito de átomos en su interior. Cuando uno de los átomos sale de caja por un extremo este entrará de nuevo por el lado opuesto de la caja. Esto significa que el sistema siente la fuerza como en una masa y que podría imitar el gran volumen infinito con un sistema pequeño de sólo unos pocos cientos o miles de átomos. <sup>106</sup>

La caja cúbica es el sistema periódico más simple para visualizar y programar; sin embargo, otra forma pudiera ser más apropiada para la simulación dada. Esto puede ser de importancia para aquellas simulaciones que consiste de una sola molécula o de un complejo intermolecular con moléculas solventes alrededor. En tales sistemas, es más común que el tiempo de computador sea gastado más por el solvente que por la molécula soluto.

Existen cinco formas satisfacen la condición de que llene todo el espacio por operaciones traduccionales de la caja central en tres dimensiones, las cuales son: el cubo, el prisma hexagonal, el octaedro truncado, el romododecaedro y el dodecahedro elongado.<sup>107</sup>

## c) Optimización Geométrica

Realizar una optimización geométrica es el primer paso en el estudio de una molécula usando técnicas computacionales. Las optimizaciones geométricas clásicas intentan localizar un mínimo en la superficie de la energía potencial con el fin de predecir las estructuras de equilibrio del sistema molecular.

Nosotros conocemos que la energía de una molécula cambia con su estructura. Entonces, comprendiendo los métodos de optimización geométrica es el mayor requerimiento para la minimización de la energía. Esto es esencial para entender la geometría de la molécula antes del análisis computacional.

Las optimizaciones multivariacionales pueden ser hechas con la ayuda de algoritmos los cuales hacen uso de dos tipos de métodos: Los métodos de búsqueda directa y los

métodos de gradiente base. En los problemas de optimización de química computacional, este último se encuentra más fiable debido a que los métodos de búsqueda directa necesitan muchas funciones de evaluación para converger a la solución. Por ende, los métodos de gradiente base son más rápidos que los métodos de búsqueda directa.

Los métodos de gradiente base usan los valores derivados de las funciones objetivo en los algoritmos. Muchas de las funciones objetivo no son diferenciables, así que, las derivadas no pueden ser aplicadas directamente. Algoritmos eficientes pueden ser usados si la derivada es válida. Existen diferentes métodos de gradiente, algunos de ellos son *Steepest descent, Conjugate gradient*, etc.<sup>108</sup>

d) Steepest Descent

Antes de requerir los cálculos de numerosas segundas derivadas, el método de *Steepest Descent* se basa en una aproximación. En este método la segunda derivada es asumida como una constante. Además, la ecuación para realizar la geometría vendría a ser:

$$x_{new} = x_{old} - \gamma E'(x_{old}) \tag{1.3}$$

Donde  $\gamma$  es una constante. En este método, los gradientes de cada punto aún deben ser calculados, pero como no requiere el cálculo de la segunda derivada, el método es mucho más rápido en cada paso que el método de Newton-Rhapson. Sin embargo, a causa de la aproximación, esto no es tan eficiente y por ende más pasos son requeridos para encontrar el mínimo.

El método es llamado *Steepest Descent* porque la dirección en la cual la geometría se minimizada primero es el opuesto a la dirección en la cual el gradiente es más largo en el punto inicial.

Una vez que se llega al mínimo en la primera dirección, una segunda minimización se realiza a partir de ese punto y se mueve en la dirección restante más empinada. Este proceso continúa hasta que un mínimo ha sido alcanzado en todas las direcciones dentro de una tolerancia suficiente.<sup>109</sup>



#### e) Dinámica Molecular

El método de simulación de dinámica molecular es una técnica extremadamente amplia y multifacética la cual calcula la distribución y movimiento de las partículas de un sistema de N-cuerpos y se relaciona con experimentos observables, tales como la presión, la capacidad de calor y propiedades termodinámicas, mediante el uso de la mecánica estadística. En la aproximación de dinámica molecular tradicional, el futuro de una disposición inicial de átomos determinada por el uso de la mecánica clásica para calcular las trayectorias de todas las partículas mientras que les permite interactuar por un periodo de tiempo. Sus interacciones son descritas por los clásicos campos de fuerzas, ya descritos anteriormente, y su evolución en el tiempo está dada por la ecuación de movimiento de Newton, y las interacciones de las fuerzas son definidas por el gradiente de una superficie de energía potencial (PES). La PES está representada por una función matemática, a menudo dividido en una suma de dos o tres interacciones de los cuerpos.

En general la simulación de la dinámica molecular resuelve la ecuación de movimiento de Newton numéricamente para cada átomo en la simulación, usando una función de energía potencial empírica.<sup>110</sup>

La dinámica molecular es un método dependiente del tiempo y el conjunto se genera como una trayectoria determinista por la resolución de la ecuación de movimiento de Newton:

$$-d\frac{E_{FF}}{d\mathbf{r}} = \mathbf{F} = \mathbf{m}\frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} = \mathbf{m}\mathbf{a}$$
(1.4)

Ya que hay muchas ecuaciones para calcular en cada paso la demanda en que el integrador sea rápido y eficiente es alta. El algoritmo integrador más común hoy en día son las variantes del algoritmo de Verlet. Como en todos los integradores utiliza métodos de diferencias finitas que hacen la hipótesis de que propiedades como posiciones, velocidades y aceleraciones de los átomos pueden ser aproximadas por las expansiones de Taylor como en la siguiente ecuación:

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^{2} + \dots$$

$$v(t + \delta t) = v(t) + a(t)\delta t + \frac{1}{2}b(t)\delta t^{2} + \dots$$

$$a(t + \delta t) = a(t) + b(t)\delta t + \frac{1}{2}c(t)\delta t^{2} + \dots$$
(1.5)

Para recuperar la siguiente posición  $r(t + \delta t)$ , el método de Verlet usa la posición actual r(t), la aceleración actual de a(t) calculada mediante el cálculo de las fuerzas que actúan sobre el átomo en este paso de tiempo durante el cual las fuerzas son consideradas constantes y, la posición previo  $r(t - \delta t)$ . A partir de la suma entre  $r(t + \delta t)$  y  $r(t - \delta t)$  se obtiene este resultado. Para alcanzar las velocidades se usa un enfoque similar.

$$r(t+\delta t) = 2r(t) - r(t-\delta t) + a(t)\delta t^2$$
(1.6)

Hay algunos inconvenientes con el método de Verlet, como la baja precisión y que las velocidades no se calcularán hasta el siguiente paso. Es por esto que muchas variantes de este calculan la posición velocidad y aceleración del próximo intervalo de tiempo al intervalo de tiempo actual y con una precisión mejorada. Uno de ellos es el algoritmo de la velocidad de Verlet, que se describe en siguiente ecuación, la cual es casi la elección universal.<sup>111</sup>

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^{2}$$
  

$$v(t + \delta t) = v(t) + \frac{1}{2}[a(t) - a(t + \delta t)]\delta t$$
(1.7)

### Métodos de solvente explícito

La forma correcta más rigurosa de modelamiento químico en solución tendría que ser insertar explícitamente todas las moléculas disolventes. Dichos cálculos convergen lentamente debido al gran número de partículas involucradas. Esto nos da una aproximación más cercana al sistema real, ya que hay interacciones directas del disolvente específico con el soluto, en contraste con los modelos continuos.<sup>112</sup>

## • Métodos de solvente implícito

Los modelos implícitos, son en general un tratamiento implícito de las moléculas disolventes a través de la estimación directa de la energía libre de solvatación, definido como el trabajo reversible requerido para transferir el soluto en una configuración fija de una solución vacía.

Para el desarrollo de esta tesis se hizo uso del programa computacional GROMACS (GROningen MAchine for Chemical Simulations), el cual es un paquete de simulación

de dinámica molecular, que es una herramienta comúnmente usada en un amplio rango de diferentes aplicaciones dentro de la física, química, y biología.

## 1.4.2. Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular o comúnmente llamado "*docking*" es una técnica de simulación donde se trata de encontrar "el mejor encaje" entre un receptor y un ligando, normalmente se da entre una proteína y una molécula pequeña (mejor conocida como ligando). El acoplamiento se basa en los primeros intentos para evaluar las interacciones entre proteínas y ligandos y poder entender y predecir sus afinidades.<sup>113</sup>

Tipos de Acoplamiento Molecular:

- Rígido-Rígido.- Este tipo de acoplamiento es cuando tanto el receptor como el ligando son rígidos sin movimiento en sus moléculas al momento de unirse.
- Rígido-Flexible.- En este tipo el receptor es rígido y el ligando flexible, esto quiere decir que el ligando se mueve para encontrar el mejor encaje posible con la proteína receptora.
- Flexible-Flexible.- Aquí ambas moléculas son flexibles, tanto el receptor como el ligando. Este tipo podría considerarse en mejor o el ideal a considerar para un acoplamiento molecular, pero debido a que usa mucho tiempo computacional la mejor opción es la mencionada anteriormente.<sup>114</sup>

## 1.4.3. Termodinámica Estadística

Termodinámica estadística es una herramienta matemática que une la brecha entre las propiedades de moléculas individuales y las propiedades termodinámicas macroscópicas de la materia.

Una descripción macroscópica de un sistema de N partículas esféricas requiere la especificación de 3N coordenadas y 3N momentos. Si N es del orden 1023, es claramente impráctico.<sup>115</sup>

Por otra parte, el mismo sistema de N partículas en equilibrio puede ser descrito solo por unos cuantos parámetros termodinámicos, tal como el volumen, temperatura y presión. Tal reducción drástica en el número de parámetros es alcanzado promediando todas las posibles locaciones y momentos de todas las partículas involucradas en el sistema. Las reglas empleadas en el promedio están en la teoría de termodinámica estadística. Esta teoría nos provee una serie de relaciones entre las cantidades termodinámicas por un lado y las cantidades moleculares por el otro.

Es por esto que se utiliza la termodinámica estadística como una validación de los métodos empleados en esta tesis, con ayuda fórmulas matemáticas corroborar que las energías obtenidas en los sistemas estudiados son los mismos o similares.<sup>116</sup>



# **CAPITULO II**

## Métodos y Detalles Computacionales

## 2.1. Detalles Computacionales

## 2.1.1. Hardware

Workstation: Con procesador E7 de 3.1GH, memoria RAM de 64GB, 02 discos duros de 04 y 06TB, Acelerador de Video GTX 980 con 4GB de memoria dedicada, Acelerador de Video Tesla K80 con 24Gb de memoria dedicada.

## 2.1.2. Software

- Gromacs 2016.- Es un paquete computacional para realizar dinámicas moleculares, mediante la simulación de las ecuaciones Newtonianas del movimiento. Disponible en *http://www.gromacs.org/.*<sup>117-120</sup>
- Chimera UCSF.- Es un programa interactivo de visualización y análisis de estructuras moleculares. Disponible en *https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/.*<sup>121-123</sup>
- VMD.- Es un programa de visualización molecular para mostrar, analizar grandes sistemas biomoleculares haciendo uso de gráficos 3D. Disponible en *http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/.*<sup>124</sup>
- **Hex.-** Programa computacional que mediante el método rigido-rigido predice el acoplamiento entre dos estructuras. Disponible en *http://hex.loria.fr/*.<sup>125-129</sup>

- **PDB** (*Protein Data Bamk*).- Es una base de datos de las estructuras terciarias, de proteínas y ácidos nucleicos, obtenidas por medio de cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN); estos datos son proporcionados por investigadores de todo el mundo y son de dominio público. Disponible en *https://www.rcsb.org/.*<sup>130</sup>
- Cybase.- Es una base de datos de proteínas con su estructura de cabeza a cola ciclada, esta proporciona información de secuencias de ácidos nucleicos, secuencias de proteínas y estructuras 3D. Disponible en *http://www.cybase.org.au/*.<sup>131-132</sup>
- Servidor Robetta.- Es un servidor que nos predice la estructura terciaria de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos. Disponible en http://robetta.bakerlab.org/.<sup>133</sup>
- Servidor MolProbity.- Es un servidor web de validación de estructuras que provee un análisis de amplio espectro tanto a nivel global como local para proteínas o ácidos nucleicos. Disponible en *http://molprobity.biochem.duke.edu/*.<sup>134</sup>
- Servidor PockDrug.- Es un servidor web que determina los sitios de interacción existentes en la proteína de interés, basándose en un análisis de hidrofobicidad, polaridad, residuos, geometría, forma, etc. Disponible en http://pockdrug.rpbs.univ-paris-diderot.fr/.<sup>135</sup>
- Software Gnuplot.- Es un graficador que usa comandos lineales utilizado generalmente en el sistema operativo Linux. Disponible en http://www.gnuplot.info/.<sup>136</sup>

## 2.2. Métodos

## 2.2.1. Recopilación de estructuras

Se hizo la búsqueda del modelo estructural de la Beta amiloide en la base de datos PDB (Protein Data Bank); la cual contiene estructuras tridimensionales de moléculas

biológicas obtenidas por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear en un formato de extensión ".pdb" (ver Figura 2.1). Los ciclótidos obtenido de la base de datos Cybase que contiene información de proteínas cíclicas, que tienen como característica un enlace peptídico entre el N- y C-terminal de su estructura, reportadas experimentalmente bajo la representación de estructura primaria (extensión .fasta) (ver Figura2.2).

	139948 B Macromo Enabling	iological lecular Structures Breakthroughs in		beta amyloid	225		an anna an	Go
PDB-101	Research	and Education	Worldwide Protein Data Bank Foundation	Advanced Search   Browse	by Annotations		5000	AY DC
819 Structures 351 Citatio	ns 485	Ligands 3 N	lews & PDB-101	Articles				
Search Parameter:							Refine Search Save Sear	ch to MyPDB
Refinements	0	Currently show	ing 1 - 25 of 819	Page: 1 of 33	← Previous Next →		Displaying 25	▼ Results
ORGANISM		View:	Reports:		Sort:			
Homo sapiens (704) Mus musculus (42) synthetic construct (22)		Detailed <b>v</b>	Select a Rep	oort v	1 Match score: Higher	to Lower 🔻	Download Files	
Gallus gallus (14) Bos taurus (14) Rattus norvegicus (12)				2MXU			Download File	iew File
Lama glama (10)		1000	2	42-Residue Beta	Amyloid Fibril			
Other (29)				<u>Xiao, Y., Ma, B., Mc</u>	<u> Iheny, D., Parthasarat</u>	<u>thy, S., Long, F.,</u>	<u>Hoshi, M., Nussinov, R., I</u>	<u>shii, Y.</u>
UNIPROT MOLECULE NAME		UH4		(2015) Nat Struct Mo	I Biol 22 499-505			
Beta-secretase 1 (363) Amyloid-beta A4 protein (124) Beta-2-microglobulin (43)			(Hate	Released: 5/6/2015 Method: Solid-State Residue Count: 504	NMR	Macromolecule: Amyloid beta A4 Unique Ligands	protein (protein)	
Transthyretin (19)			10			Search term ma	tch score: 424.86	

Figura 2.1 Búsqueda de la estructura de la Beta amiloide en la base de datos "Protein Data Bank"



Figura 2.2 Búsqueda de las secuencias de aminoácidos de los ciclótidos de la familia *Rubiaceae* en la base de datos "Cybase".



## 2.2.2. Modelado y Predicción de estructuras terciarias

Una vez obtenida las secuencias de aminoácidos de los ciclótidos se realizó la predicción de la estructura tridimensional (3D) con el uso del servidor Robetta, en la sección de "Domain Parsing & 3-D Modeling", se colocó la secuencia de aminoácidos de los ciclótidos y se colocó un correo electrónico en parte opcional, para que el archivo resultante llegue al correo proporcionado (Figura 2.3). Este servidor se basa en el principio del modelado por homología el cual toma una estructura de plantilla o molde en base a una alta homología (75 - 85%) para predecir la forma tridimensional de modelos que carecen de estudios experimentales (difracción de rayos X).





## 2.2.3. Minimización de Energías y Dinámica Molecular

Se inició con la edición de los campos de fuerza, lo cual consistió en declarar en el sistema de Gromacs 2016, los enlaces especiales que corresponden a los que forman parte de la ciclación de los ciclótidos (N- y C- terminal), esto se realizó en el archivo specbond.dat. y los archivos en la carpeta correspondiente al campo de fuerza OPLSAA (Potenciales optimizados para simulaciones líquidas para todos los átomos) aminoacids.n.tdb y aminoacids.c.tdb.

Posteriormente, antes de empezar con la minimización de energías y la simulación de dinámica molecular, se colocaron los parámetros correspondientes tanto como para los ciclótidos y la beta amiloide considerando todo para un ensamble canónico NVT (número de moléculas, volumen y temperatura constante), donde se consideraron los factores descritos en la Figura 2.4, algunos como el integrador steep para el caso de la minimización y md para la dinámica molecular, la temperatura que fue regulada con el termostato de v-rescale a 309.65°K, el tiempo de la trayectoria (nsteps) que consistió de 200 ns (nanosegundos) o 200000000 ps (picosegundos), las condiciones periódicas de contorno (pbc), fueron descritos en un archivo de extensión ".mdp"

🗋 minima.mdp 🗶	Α	🗋 *nvt.mdp 💥	В
title	= Minimizacion	title	= Dinamica Molecular NVT
cpp	= /lib/cpp	cpp	= /lib/cpp
include	= -I/top	include	= -I/top
define	=	integrator	= md
integrator	= steep	dt	= 0.0001
nsteps	= 20000000	nstens	= 20000000
nstcomm	= 100	nstrout	= 1000
emtol	= 1e-06	natwout	= 1000
emstep	= 0.001	natlog	- 1000
nstcgsteep	= 1000	natiog	- 1
nstxout	= 10	nstcalcenergy	= -1
nstvout	= 10	nstenergy	= 200
nstrout	= 0	nstxout-compre	essed= 1000
nstlog	= 1000	xtc-grps	=
nstcalcenergy	= 100	energygrps	=
nstenergy	= 1000	nstlist	= 20
nstxtcout	- 1	ns-type	= grid
nbigscorr	- 1000	fourierspacing	g = 0.39
xtc-precision	= 1000	pme-order	= 4
anergugrne	_	ewald-rtol	= 1e-5
cutoff_scheme	= Verlet	pbc	= xyz
netlist	= 20	tcoupl	= v-rescale
ns-type	= grid	tc-grps	= svstem
nbc	= xvz	tau-t	= 0.5
optimize-fft	= ves	ref-t	= 309.65
pme-order	= 4	gen-vel	= ves
fourierspacing	= 0.3	gen ver	= 173529
DispCorr	= Ener	constraints	= none
constraints	= none	constraints	- Nonlet
coulombtype	= PME	cutorr-scheme	- Verlet
rlist	= 0.9	contomptype	= PME
rcoulomb	= 0.9	riist	= 0.9
vdwtype	= Cut-off	rcoulomb	= 0.9
rvdw	= 0.9	vdwtype	= Cut-off
ewald-rtol	= 1e-5	rvdw	= 0.9

**Figura 2.4** A) Archivo ".mdp" con parámetros para la minimización de energías de las estructuras. B) Archivo ".mdp" con los parámetros para la dinámica molecular.

Seguidamente se realizó la minimización y la dinámica molecular, con los parámetros ya descritos, siguiendo una línea de comandos (ver Figura 2.5).

```
*corriendo 🞇
#!/bin/bash
for file in $(ls *.pdb)
do
 nuev=$(echo $file | sed 's/.pdb//g' )
  gmx editconf -f $file -o $nuev.gro -d 1.5 -c
  gmx solvate -cp $nuev.gro -cs spc216.gro -o $nuev.gro
  gmx pdb2gmx -nice 0 -ignh -f $nuev.gro -p $nuev.top -o $nuev.gro -i $nuev.itp -ff oplsaa -water spc -inter yes -ter yes
  gmx grompp -f minima.mdp -c $nuev.gro -p $nuev.top -o $nuev-01.tpr -po $nuev.mdp
  gmx mdrun -nice 0 -v -s -deffnm $nuev-01
  gmx pdb2gmx -nice 0 -f $nuev-01.gro -p $nuev-01.top -o $nuev-01.gro -i $nuev-01.itp -ff oplsaa -water spc -inter yes -ter yes
  gmx grompp -f nvt.mdp -c $nuev-01.gro -p $nuev-01.top -o $nuev-02.tpr -po $nuev-01.mdp
  gmx mdrun -nice 0 -v -s $nuev-02.tpr -o $nuev-02.trr -e $nuev-02.edr -x $nuev-02.xtc -cpo $nuev-02.cpt -c $nuev-02.gro -g
$nuev-02.log -ntmpi 0 -ntomp 0 -npme 0 -gpu id 1
  rm \#*
done
```

Figura 2.5 Archivo con los comandos para realizar la minimización y dinámica molecular para las moléculas, tanto de los ciclótidos como de la Beta amiloide

Donde, *gmx editconf* convierte el archivo .pdb a .gro, el cual es un archivo que reconoce gromacs, –d nos da la el tamaño de la caja considerando 1.5 veces más el tamaño de la molécula, -c nos coloca la molécula en el centro de la caja.

gmx solvate nos agrega el solvente de acuerdo al modelo de agua especificado con –cs, en este caso se usó el modelo SPC216, que es el modelo de agua parametrizado para el campo de fuerza OPLSAA y tiene el modelo de 3 sitios, que significa que tiene tres puntos de interacción que corresponden a los tres átomos de la molécula de agua (ver figura 2.6 -2.7).

*gmx pdb2gmx* nos genera los archivos de topología ".top" y ".itp" (archivos que contienen información de las cargas y enlaces de la estructura de acuerdo al campo de fuerza a utilizar), con –ff se elige el campo de fuerza, –inter y –ter reconocemos los puentes disulfuro y el enlace peptídico de ciclado declarados en los archivos correspondientes. *gmx grompp* es el comando que lee el archivo ".mdp" que contiene los parámetros para

la simulación y genera el archivo ".tpr" archivo que es el que contiene las coordenadas, velocidades, parámetros y la topología de la molécula.

*gmx mdrun* genera la simulación después de tener todos los datos correspondientes, dando como resultados el archivo de la trayectoria (.trr), el archivo que contiene las energías (.edr) y las coordenadas de la molécula final (.gro).

REPOSITORIO DE TESIS UCSM





Figura 2.7 Estructura de beta amiloide en caja con solvente.



## 2.2.4. Acoplamiento Molecular (Docking)

Antes de realizar el acoplamiento molecular, se usó el servidor PockDrug para analizar los sitios de interacción que tiene el dodecámeto de Beta amiloide donde se subió el archivo en formato ".pdb" de la beta amiloide y los demás parámetros se colocaron por defecto (ver Figura 2.8). Luego, mediante uso del Programa Computacional Hex se realizó el *docking* para formar el complejo Beta amiloide-ciclótido (receptor-ligando), considerando un sistema rígido-rígido, y que nos proporcione los resultados de acuerdo a la mejor energía utilizando el tipo de correlación *shape+electro+DARS (Decoys as the reference states)*, que realiza el *docking* considerando la forma de la estructura, las cargas electrostáticas y una aproximación natural de los potenciales intermoleculares de las estructura base, con un requerimiento de 20000 sistemas de modelos estructurales (ver Figura 2.9).

• Drug	gability Prediction using protein(s):
	vc Protein(s) information*:
	PDB ID(4 char) ex: 12AS
	or upload your PDB file Browse 3 Info
	or PDB ID list     Browse     Info
	rc Pocket estimation method(s)*:
	✓ fpocket Info
	prox 💿 Info
	Ligand proximity threshold between 4 Å and 12 Å*:
	5.5

Figura 2.8 Servidor PockDrug para la predicción de sitios de interacción de la beta amiloide.





Figura 2.9 Parámetros utilizados para el acoplamiento molecular en el software Hex Docking.

Adicionalmente para afinar el proceso de predicción de los acoplamientos se hizo una simulación de dinámica molecular, con el fin de observar que transcurrido un tiempo determinado el ciclótido permanece acoplado a la beta amiloide , además de comprobar que se mantiene en el lugar predicho de interacción y que no se acopla a otro lugar de la beta amiloide; para la simulación se usaron los mismos parámetros ya antes mencionados (ver figura 2.10) como la temperatura de 309.65°K, las condiciones periódicas de contorno, la caja con una distancia de 1.5 veces en relación al tamaño de la molécula y con solvente explícito (ver Figura 2.11), cambiando solo la trayectoria a un tiempo de 10ns (nanosegundos) o 10000000ps (picosegundos).

## REPOSITORIO DE TESIS UCSM



📄 \*nvt.mdp 🕷 title = Dinamica Molecular NVT = /lib/cpp qqp include = -I../top integrator = md = 0.0001 dt = 10000000 nsteps nstxout = 1000 = 1000 nstvout = 1000 nstlog nstcalcenergy = -1 nstenergy = 200 nstenergy nstxout-compressed= 1000 xtc-grps energygrps = nstlist = 20 ns-type = grid fourierspacing = 0.39 = 4 pme-order = 1e-5 ewald-rtol = xyz pbc = v-rescale tcoupl = system tc-grps = 0.5 tau-t = 309.65 ref-t gen-vel = yes = 173529 gen-seed constraints = none cutoff-scheme = Verlet = PME coulombtype rlist = 0.9 rcoulomb vdwtype = 0.9 = Cut-off rvdw = 0.9

Figura 2.10 Parámetros utilizados para simulación de Dinámica molecular del complejo



Figura 2.11 Complejo ciclótido-beta amiloide en caja con solvente para la dinámica molecular

## 2.2.5. Validación de resultados

Mediante los diagramas de RMSD, RMSF (provistos por el programa Gromacs 2016) y Ramachandran (mediante el servidor Molprobity) se evaluaron la validez de los modelos estructurales de estudio.

Teniendo en cuenta que para el RMSD este nos muestra la desviación media de la estructura durante la trayectoria, mostrando la estabilidad de los ciclótidos, beta amiloides y el complejo Beta amiloide-ciclótido, el cual nos dice que al tener una variación menor a 0.3 nm se encuentra estable, donde mediante el comando *gmx rms* se obtiene esta gráfica en formato ".xvg", utilizando los archivos".tpr" y ".trr" generados en la simulación de dinámica molecular, para poder observar la gráfica obtenida se utilizó el programa Gnuplot con el comando:

## plot "\*.xvg" using 1:2 with lines

Para el caso del RMSF este nos ayudó a identificar la fluctuación de cada aminoácido en la estructura; donde los que muestren un pico más alto, son aquellos que tienen un mayor cambio en la estructura, esto también puede deberse al cambio de una estructura secundaria (láminas beta, alfa hélices), que se determinó con el comando *gmx rmsf*, utilizando los archivos ".tpr" y ".trr" y –res para que lo determine la fluctuación por residuos y no por átomos; y de la misma manera se utilizó Gnuplot para ver la gráfica obtenida.

Finalmente la gráfica de Ramachandran nos dio la combinación de los ángulos, diedros, etc. de los aminoácidos de la estructura de las proteínas, el cual nos da el porcentaje de las combinaciones típicas posibles de los residuos mediante cuadrantes. También nos indica cuáles aminoácidos se encuentran en las regiones permitidas, regiones favorecidas y regiones aisladas; donde en el servidor después de subir el archivo de la proteína en formato ".pdb", se elige la opción de analizar la geometría del contacto de todos los átomos, seguidamente se deja por defecto los parámetros señalados y se obtiene la gráfica de Ramachandran en un archivo de formato ".pdf" (Figura 2.12).

## REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD Católica De Santa María

PROBITY		I	Main page				Duke Biochemistry Duke University School of Medicine
Main page About hydrogens Evaluate X-ray Evaluate NMR Eiv un structure	FILE UPLOAD/RET	IRIEVAL (MORE OPTIONS)		type: PDB coords	v		Fetch >
Work with kins	Seleccionar	archivo No se eligió archivo		type: PDB coords V			Upload >
Lab notebook Feedback & bugs Site map Save session Log out You are using 0% of your 200 Mb of disk space.	Molprobity s Duke (US)   N Legacy versio Usage Guidel These web ser	Seleccionar arcnivo       No se eligio archivo       Upload >         Molprobity sites:       Duke (US)   Manchester (UK)   Beta (Recent developments; Unstable)       Legacy version 4.02 has been retired. Please contact us through the 'Feedback & bugs' link if this affects your MolProbity use.       Usage Guidelines:         These web services are provided for analysis of individual structures, not batch runs.       Usage Guidelines:       Usage Guidelines:					
PROBITY		I	Main page			W	Duke Biochemistry Duke University School of Medicine
Main page About hydrogens Evaluate X-ray	SUGGESTED TOO	LS (ALL TOOLS)					
Evaluate NMR Fix up structure Work with kins	Due to the before and (i.e. for cr	e parameter adjustments to hydrog lysis. Please re-add hydrogens usi ystal structures) or nuclear-position	gen bondlengths and van der ng the "Add hydrogens" option n hydrogens (i.e. for neutron-d	Waals radii, the current n below, where you will liffraction structures or fo	default behavior for MolPr have the option to choose e or NMR structures).	obity is to ren ither the defau	nove hydrogens, if they are present, lt electron-cloud position hydrogens
View & download files Lab notebook Feedback & bugs Site map	Currently we	orking on: oak8_1_trimmed.pdb	File (trimmed) uploaded by user	▼ Set			
Save session Log out You are using 0% of	- "	Add hydrogens	۲ انگ	Edit PDB file Downgrade file to PDBv:	2.3 format (for download or	nly)	
space.	Ŵ	Make simple kinemages		fill gaps in growin looks Analyze geometry withou	ut all-atom contacts	st)	
Summary statist	tics						
		Poor rotamers	0	0.00%	Goal: <0.3%		
		Favored rotamers	22	84.62%	Goal: >98%		
		Ramachandran outliers	1	3.57%	Goa1: <0.05%		
Protei	in	Ramachandran favored	20	71.43%	Goal: >98%		
Geome	uy	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0		
		Bad bonds:	0 / 214	0.00%	Goal: 0%		
		Bad angles:	0 / 293	0.00%	Goal: <0.1%		
Peptide Or	megas	Cis Prolines:	0 / 2	0.00%	Expected: ≤1 per chair	n, or ≤5%	
In the two column results, t Multi-criterion vi View in KiNG   D Single-criterion	the left column gives isualizations i-criterion kinemage townload (22 Kb) visualization	S	- d	View (33 Kb)	lficriterion chart		
<ul> <li>Ramochen h</li> <li>Ramachandran</li> <li>Cp deviation set</li> </ul>	n plot PDF (1.7 M	(Wr. (Kb): View in KiNG   Downlo (b): View (b): view in KiNG   Download	ad				

Figura 2.12 Forma de obtener la gráfica de Ramachandran en el Servidor Molprobity.

# **CAPITULO III**

## **Resultados y Discusión**

## 3.1. Recopilación y Modelado de los modelos estructurales

Se obtuvo la estructura de la Beta amiloide de la base de Datos "Protein Data Bank" con el código de acceso 2MXU (ver Figura 3.1), siendo la estructura más recientemente reportada para la proteína de Beta amiloide, que contiene varios dodecámeros de Beta amiloide.



**Figura 3.1** Estructura tridimensional de Beta amiloide obtenida de la base de datos "Protein Data Bank" con código de acceso 2MXU.

Con la estructura obtenida se procedió a limpiar la estructura del Beta amiloide, eliminando residuos de agua y algunos iones que este presentaba, quedando así solo una cadena de Beta amiloide (ver Figura 3.2). La estructura también presentaba una pérdida de los 10 primeros aminoácidos, que fueron agregados con ayuda del programa Chimera

además, que con el uso del programa VMD se duplicó la cadena de Beta amiloide hasta obtener una estructura con 12 cadenas o dodecámero (ver Figura 3.3).



Figura 3.2 Péptido de Beta amiloide con aminoácidos faltantes.



Figura 3.3 Dodecámero de Beta amiloide formado con el uso del programa VMD

De la base de Datos Cybase se pudo recolectar 78 ciclótidos reportados para la familia de plantas *Rubiaceae* en su estructura primaria (ver Tabla 3.1). Con el uso del servidor Robetta se tomaron estas secuencias lineales para obtener predicciones de las estructuras terciarias de estas proteínas (ver Figura 3.4) en extensión .pdb; debido a que no se encuentran reportadas todas las 78 estructuras de los ciclótidos en la base de datos "Protein Data Bank" se utilizó este predictor, pero con la respectiva comparación de estructuras obtenidas con los ciclótidos que si se encuentran reportadas.

 Tabla 3.1 Lista de secuencias lineales de 78 ciclótidos reportados en Cybase para

 especies de planta Rubiaceae

Especie	Ciclótido	Secuencia
Oldenlandia affinis	Kalata B1	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN
Oldenlandia affinis	Kalata B2	GLPVCGETCFGGTCNTPGCSCTWPICTRD
Oldenlandia affinis	Kalata B3	GLPTCGETCFGGTCNTPGCTCDPWPICTRD
Oldenlandia affinis	Kalata B4	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRD
Oldenlandia affinis	Kalata B5	GTPCGESCVYIPCISGVIGCSCTDKVCYLN
Oldenlandia affinis	Kalata B6	GLPTCGETCFGGTCNTPGCSCSSWPICTRN
Oldenlandia affinis	Kalata B7	GLPVCGETCTLGTCYTQGCTCSWPICKRN
Oldenlandia affinis	Kalata B8	GSVLNCGETCLLGTCYTTGCTCNKYRVCTKD
Oldenlandia affinis	Kalata B9	GSVFNCGETCVLGTCYTPGCTCNTYRVCTKD
Oldenlandia affinis	Kalata B10	GLPTCGETCFGGTCNTPGCSCSSWPICTRD
Oldenlandia affinis	Kalata B11	GLPVCGETCFGGTCNTPGCSCTDPICTRD
Oldenlandia affinis	Kalata B12	GSLCGDTCFVLGCNDSSCSCNYPICVKD
Oldenlandia affinis	Kalata B13	GLPVCGETCFGGTCNTPGCACDPWPVCTRD
Oldenlandia affinis	Kalata B14	GLPVCGESCFGGTCNTPGCACDPWPVCTRD
Oldenlandia affinis	Kalata B15	GLPVCGESCFGGSCYTPGCSCTWPICTRD
Oldenlandia affinis	Kalata B16	GIPCAESCVYIPCTITALLGCKCQDKVCYD
Oldenlandia affinis	Kalata B17	GIPCAESCVYIPCTITALLGCKCKDQVCYN
Oldenlandia affinis	Kalata B18	GVPCAESCVYIPCISTVLGCSCSNQVCYRN
Oldenlandia affinis	Kalata B19	GFPCGESCVYVPCLTAAIGCSCSNKVCYKN
Oldenlandia affinis	Kalata S	GLPVCGETCVGGTCNTPGCSCSWPVCTRN

46



Oldenlandia affinis	Oak6 cyclotide2	GLPICGETCFGGTCNTPGCICDPWPVCTRD
Oldenlandia affinis	Oak7 cyclotide	GSHCGETCFFFGCYKPGCSCDELRQCYKN
Oldenlandia affinis	Oak8 cyclotide	GVPCGESCVFIPCLTAVVGCSCSNKVCYLN
Oldenlandia affinis	Oak6 cyclotide1	GLPVCGETCFGGTCNTPGCACDPWPVCTRN
Chassalia parvifolia	circulin A	GIPCGESCVWIPCISAALGCSCKNKVCYRN
Chassalia parvifolia	circulin B	GVIPCGESCVFIPCISTLLGCSCKNKVCYRN
Chassalia parvifolia	circulin C	GIPCGESCVFIPCITSVAGCSCKSKVCYRN
Chassalia parvifolia	circulin D	KIPCGESCVWIPCVTSIFNCKCENKVCYHD
Chassalia parvifolia	circulin E	KIPCGESCVWIPCLTSVFNCKCENKVCYHD
Chassalia parvifolia	circulin F	AIPCGESCVWIPCISAAIGCSCKNKVCYR
Chassalia parvifolia	circulin F	AIPCGESCVWIPCISAAIGCSCKNKVCYR
Hedyotis centranthoides	hcf-1	GIPCGESCHYIPCVTSAIGCSCRNRSCMRN
Hedyotis terminalis	htf-1	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRN
Hedyotis terminalis Hedyotis centranthoides	htf-1 hcf-1 variant	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRN GIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRN
Hedyotis terminalis Hedyotis centranthoides Palicourea tetragona	htf-1 hcf-1 variant cycloviolacin O22	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRN GIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRN GLPICGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN
Hedyotis terminalis Hedyotis centranthoides Palicourea tetragona Psychotria longipes	htf-1 hcf-1 variant cycloviolacin O22 cyclopsychotridA	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRNGIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRNGLPICGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNSIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCKSKVCYKN
Hedyotis terminalis Hedyotis centranthoides Palicourea tetragona Psychotria longipes Psychotria suterella	htf-1 hcf-1 variant cycloviolacin O22 cyclopsychotridA PS-1	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRNGIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRNGLPICGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNSIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCKSKVCYKNGFIPCGETCIWDKTCHAAGCSCSVANICVRN
Hedyotis terminalisHedyotis centranthoidesPalicourea tetragonaPsychotria longipesPsychotria suterellaChassalia discolor	htf-1 hcf-1 variant cycloviolacin O22 cyclopsychotridA PS-1 CD-1	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRNGIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRNGLPICGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNSIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCKSKVCYKNGFIPCGETCIWDKTCHAAGCSCSVANICVRNGADGFCGESCYVIPCISYLVGCSCDTIEKVCKRN
Hedyotis terminalisHedyotis centranthoidesPalicourea tetragonaPsychotria longipesPsychotria suterellaChassalia discolorPalicourea tetragona	htf-1 hcf-1 variant cycloviolacin O22 cyclopsychotridA PS-1 CD-1 vibi B	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRNGIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRNGLPICGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNSIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCKSKVCYKNGFIPCGETCIWDKTCHAAGCSCSVANICVRNGADGFCGESCYVIPCISYLVGCSCDTIEKVCKRNGLPVCGETCFGGTCNTPGCTCSYPICTRN
Hedyotis terminalisHedyotis centranthoidesPalicourea tetragonaPsychotria longipesPsychotria suterellaChassalia discolorPalicourea tetragonaPsychotria leptothyrsa	htf-1 hcf-1 variant cycloviolacin O22 cyclopsychotridA PS-1 CD-1 Vibi B vibi G	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRNGIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRNGLPICGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNSIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCKSKVCYKNGFIPCGETCIWDKTCHAAGCSCSVANICVRNGADGFCGESCYVIPCISYLVGCSCDTIEKVCKRNGLPVCGETCFGGTCNTPGCTCSYPICTRNGTFPCGESCVFIPCLTSAIGCSCKSKVCYKN
Hedyotis terminalisHedyotis centranthoidesPalicourea tetragonaPsychotria longipesPsychotria suterellaChassalia discolorPalicourea tetragonaPsychotria leptothyrsaPsychotria leptothyrsa	htf-1 hcf-1 variant cycloviolacin O22 cyclopsychotridA PS-1 CD-1 Vibi B vibi G	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRNGIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRNGLPICGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNSIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCKSKVCYKNGFIPCGETCIWDKTCHAAGCSCSVANICVRNGADGFCGESCYVIPCISYLVGCSCDTIEKVCKRNGLPVCGETCFGGTCNTPGCTCSYPICTRNGTFPCGESCVFIPCLTSAIGCSCKSKVCYKNGLLPCAESCVYIPCLTTVIGCSCKSKVCYKN
Hedyotis terminalisHedyotis centranthoidesPalicourea tetragonaPsychotria longipesPsychotria suterellaChassalia discolorPalicourea tetragonaPsychotria leptothyrsaPsychotria leptothyrsaPsychotria leptothyrsa	htf-1 hcf-1 variant cycloviolacin O22 cyclopsychotridA PS-1 CD-1 CD-1 vibi B vibi G vibi G	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRNGIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRNGLPICGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNSIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCKSKVCYKNGFIPCGETCIWDKTCHAAGCSCSVANICVRNGADGFCGESCYVIPCISYLVGCSCDTIEKVCKRNGLPVCGETCFGGTCNTPGCTCSYPICTRNGTFPCGESCVFIPCLTSAIGCSCKSKVCYKNGLLPCAESCVYIPCISYLVGCSCMSKVCYKNGIPCGESCVWIPCITSAIGCSCKSKVCYRN
Hedyotis terminalisHedyotis centranthoidesPalicourea tetragonaPsychotria longipesPsychotria suterellaChassalia discolorPalicourea tetragonaPsychotria leptothyrsaPsychotria leptothyrsaPsychotria leptothyrsaPsychotria leptothyrsaPsychotria leptothyrsaPsychotria leptothyrsa	htf-1 hcf-1 variant cycloviolacin O222 cyclopsychotridA PS-1 CD-1 CD-1 vibi B vibi G vibi G vibi H vibi H	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRNGIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRNGLPICGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNSIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCKSKVCYKNGFIPCGETCIWDKTCHAAGCSCSVANICVRNGADGFCGESCYVIPCISYLVGCSCDTIEKVCKRNGLPVCGETCFGGTCNTPGCTCSYPICTRNGTFPCGESCVFIPCLTSAIGCSCKSKVCYKNGILPCAESCVYIPCITSAIGCSCKSKVCYRNGIPCGESCVFIPCLTSAIGCSCKSKVCYRNGIPCGESCVFLGCFIPGCSCKSKVCYFN

47



Psychotria leptothyrsa	psyle C	KLCGETCFKFKCYTPGCSCSYFPCK
Psychotria leptothyrsa	psyle D	GIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCQNKVCYRD
Psychotria leptothyrsa	psyle E	GVIPCGESCVFIPCISSVLGCSCKNKVCYRD
Psychotria leptothyrsa	psyle F	GVIPCGESCVFIPCITAAVGCSCKNKVCYRD
Hedyotis biflora	hedyotide B1	GTRCGETCFVLPCWSAKFGCYCQKGFCYRN
Hedyotis biflora	hedyotide B2	GIQCGESCVWIPCISSAWGCSCKNKICSS
Palicourea rigida	Parigidin-br1	GGSVPCGESCVFIPCITSLAGCSCKNKVCYYD
Carapichea ipecacuanha	caripe 1	GVIPCGESCVFIPCISTVIGCSCKDKVCYRN
Carapichea ipecacuanha	caripe 2	GIPCGESCVFIRCTITALLGCSCSNNVCYKN
Carapichea ipecacuanha	caripe 4	LICSSTCLRIPCLSPRCTCRHHICYLN
Carapichea ipecacuanha	caripe 6	GAICTGTCFRNPCLSRRCTCRHYICYLN
Carapichea ipecacuanha	caripe 7	GIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCKNKVCYRNGLN
Carapichea ipecacuanha	caripe 8	GVIPCGESCVFIPCITAAIGCSCKKKVCYRN
Chassalia curviflora	chacur 1	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPICTRN
Psychotria brachiata	psybra 1	GLPICGETCTLGTCNTPGCTCSWPICTKN
Palicourea tetragona	paltet 1	GLPICGETCFTGTCNTPGCTCSYPVCTRN
Palicourea condensata	palicourein	GDPTFCGETCRVIPVCTYSAALGCTCDDRSDGLCKRN
Chassalia chartacea	chassatide C1	GDACGETCFTGICFTAGCSCNPWPTCTRN
Chassalia chartacea	chassatide C2	GIPCAESCVWIPCTITALMGCSCKNNVCYNN
Chassalia chartacea	chassatide C3	GIPCGESCWIPCISSALGCSCKNKVCYRN
Chassalia chartacea	chassatide C4	GASCGETCFTGICFTAGCSCNPWPTCTRN
Chassalia chartacea	chassatide C6	GVIPCGESCVFIPCISSVIGCSCKNKVCYRN
Chassalia chartacea	chassatide C7	GIPCGESCVWIPCLTAIAGCSCKNKVCYT
Chassalia chartacea	chassatide C8	GAIPCGESCVWIPCISTVIGCSCSNKVCYR

48



Chassalia chartacea	chassatide C9	GIPCGESCVFIPCVTTVIGCSCKDKVCYNN
Chassalia chartacea	chassatide C10	GEYCGESCYLIPCFTPGCYCVSRQCVNKN
Chassalia chartacea	chassatide C11	IPCGESCVWIPCISGMFGCSCKDKVCYS
Chassalia chartacea	chassatide C12	EYCGESCYLIPCFTPGCYCVSRQCVNKN
Chassalia chartacea	chassatide C13	GFPCAESCVYIPCTVTALLGCSCRNRVCYRN
Chassalia chartacea	chassatide C14	GIPCAESCVYIPCTITALFGCSCKDKVCYNN
Chassalia chartacea	chassatide C15	GIPCAESCVYIPCTITALLGCSCKDKVCYKN
Chassalia chartacea	chassatide C16	GVPCAESCVYIPCTITALFGCSCKDKVCYNN
Chassalia chartacea	chassatide C17	GIPCGESCVYIPCISAVLGCSCQNKVCYR
Chassalia chartacea	chassatide C18	GIPCGESCVFIPCISALLGCSCSNKVCYNN



Figura 3.4 Estructura tridimensional de Ciclótido predicha por el servidor Robetta.

Una vez obtenidas las estructuras tridimensionales de los 78 ciclótidos se realizó en el programa Chimera la unión de puentes disulfuro entre las cisteínas, característicos de los ciclótidos, y también del enlace de la N- y C- terminal, que le confiere la forma cíclica al ciclótido (ver Figura 3.5); debido a que el servidor Robetta no reconoce estas peculiaridades que tienen los ciclótidos.





Figura 3.5 Ciclótido con puentes disulfuro y con enlace C- y N- terminal

## 3.2. Optimización y Validación de las estructuras terciarias

## 3.2.1. Beta amiloide

Una vez obtenida la estructura de la Beta amiloide, con el uso del programa computacional GROMAC'S se procedió a realizar una minimización de energías, haciendo uso del integrador *steepest descent*, con solvente explícito (modelo de agua SPC216), en donde se tiene una estructura más relajada con respecto a sus enlaces, ángulos, diedros, etc.

Después de tener a la estructura en un estado relajado, se realizó la dinámica molecular de la estructura durante un tiempo de 100 ns, para observar la variación de la estructura con respecto al tiempo, en la cual se observa una variación entre la estructura inicial y final (ver Figura 3.6).

Así mismo se observa que la región donde se presentan los 10 primeros aminoácidos de los monómeros de beta amiloides, al parecer se acumulan durante la simulación de dinámica molecular; esto corresponde al mal plegamiento de la proteína; debido a que son proteínas ricas en láminas beta, su conformación produce esta anomalía; y es este mal plegamiento proteico que presentan las Beta amiloides no puedan ser procesadas en el cerebro causando la neurotoxicidad y muerte neural dando paso a que se desarrolle la enfermedad del Alzheimer en las personas.



Figura 3.6 Comparación entre la estructura inicial de Beta amiloide con la estructura final después de una dinámica molecular de 200 ns. A) Estructura inicial de Beta amiloide. B) Estructura final después de 200 ns de Dinámica Molecular.

En la Figura 3.7 se observa la desviación media cuadrática (RMSD) de la estructura de Beta amiloide determinada con el programa GROMAC´S, utilizando los datos obtenidos a partir de la dinámica molecular, en la cual se muestra que está dentro del rango de los 0.3nm lo cual es indicativo de que la Beta amiloide se encuentra estable a partir de los 3 ns hasta los 100 ns; con este dato se pudo calcular la estructura promedio para usarla en el análisis de acoplamiento molecular (Docking). Además, se determinó la fluctuación de la desviación media cuadrática (RMSF) (ver Figura 3.8), en donde se observa que los aminoácidos que tiene mayor fluctuación son las asparraginas (ASP), aminoácido con el que inicia cada monómero y algunas que se encuentran dentro de la estructura, esto es dado a que la asparragina ayuda a la formación de las láminas beta, teniendo como consecuencia la formación de puentes hidrógeno entre los monómeros del dodecámero de la Beta amiloide.
Desviación media cuadrática (RMSD)



Figura 3.7 Desviación media cuadrática (RMSD) de la Beta amiloide



Figura 3.8 Fluctuación de la desviación media cuadrática (RMSF) de la Beta amiloide

El análisis de la gráfica de Ramachandran para la estructura de la Beta amiloide nos da un 84% para las regiones favorecidas y 97.5 para las regiones permitidas (ver Figura 3.9), lo cual nos indica que esta estructura es posible y que es apta para poder realizar análisis in silico con esta conformación.



Figura 3.9 Gráfica de Ramanchandran para el dodecámero de la Beta amiloide



#### 3.2.2. Ciclótidos

Las estructuras de las ciclótidos, tienen cualidades tales como el enlace del N- y Cterminal, que le confiere su forma cíclica, y los puentes disulfuro. El programa computacional Gromac's no es capaz de reconocer estos detalles, por lo cual se hicieron algunas modificaciones a los archivos de la raíz del programa; el archivo specbond.dat es un archivo que especifica los enlaces especiales entre átomos de aminoácidos, aminoacids.c.tdb es el archivo que contiene las formas del C-terminal de los aminoácidos y el archivo aminoacids.n.tdb presenta las formas de los átomos en el N-terminal de los aminoácidos (ver Figura 3.10).



**Figura 3.10** Archivos de Gromac's modificados para poder analizar ciclótidos.A) Archivo animoacids.n.tdb. B) Archivo aminoacids.c.tdb. C) Archivo specbond.dat

Posteriormente, ya con estas características agregadas a Gromac's se procedió a realizar una minimización de energías a las proteínas, para empezar con una estructura relajada a realizar la dinámica molecular. El resultado de la Dinámica molecular (ver Figura 3.11) se puede observar que, el ciclótido varió un poco su conformación, esto es debido a que la presencia de los puentes disulfuro produce un plegamiento en el ciclótido dando lugar a los lazos (*loop*) muy característicos de esta proteína.



Figura 3.11 A) Ciclótido Caripe1 antes de la dinámica molecular. B) Ciclótido Caripe1 después de la dinámica molecular.

El análisis de la desviación media cuadrática (RMSD) determinó que todos los ciclótidos se encontraban en zona estable ya que se encuentra del rango permitido de fluctuación de 0.3 nm y, para ver mejor las gráficas se separó por tipos los 78 ciclótidos para observar los resultados obtenidos en grupos similares (ver Figura 3.12 - 3.16), y con los datos obtenidos en el RMSD se obtuvo una estructura promedio desde el tiempo en el que empieza a ser estable el ciclótido.(4ns a 200ns) para el acoplamiento molecular con la Beta amiloide (ver Figura 3.17).





Figura 3.13 Desviación media cuadrática de los ciclótidos tipo Caripe





Figura 3.15 Desviación media cuadrática de los ciclótidos tipo Chassatide

Time (ps)

1000

1500

500

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos En su investigación no olvide referenciar esta tesis

0

1



## RMSD

Ciclotidos Psyle



Figura 3.16 Desviación media cuadrática de los ciclótidos tipo Psyle



Figura 3.17 Estructura promedio del ciclótido Caripe1 de los 4ns a 200ns

En la fluctuación de la desviación media cuadrática (RMSF) (ver tabla 3.2) se observa que los aminoácidos mayor fluctuación son la fenilalanina, lisina, glicina, asparragina; mientras que los de menor fluctuación son las cisteínas de la proteína, y esto prueba a que las císteinas realmente le confieren gran estabilidad al ciclótido ya que casi no tienen modificaciones o alteraciones en su estructura durante el tiempo dado de dinámica molecular.

Tipo de Ciclótidos	Aminoácidos		
	Mayor fluctuación	Menor Fluctuación	
Kalata	Glicina, prolina, asparragina, fenilalanina	Cisteína	
Psyle	Glutamina, fenilalanina, lisina, triptofano	Cisteína	
Circulin	Glicina, lisina, asparragina, triptófano	Cisteína	
hcf	Glicina, arginina, treonina	Cisteína	
htf	Arginina, isoleucina, treonina	Cisteína	
Cycloviolacin	Isoleucina, glicina, asparragina, leucina, treonina, prolina	Cisteína	
Ps	Triptofano, lisina, histidina, alanina	Cisteína	
Cd	Alanina, ácido glutámico, tirosina	Cisteína	
Vibi 196	Asparragina, valina, lisina, leucina	Cisteína	
Chassatide	Fenilalanina, lisina, glicina, leucina	Cisteína	
Caripe	Fenilalanina, lisina, glutamina	Cisteína	

Tabla 3.2. Animóacidos de mayor y menorfluctuación por tipos de Ciclótidos

Las energías obtenidas de los 78 ciclótidos se encontraron estables durante todos 200ns de las Dinámica molecular, lo que es indicativo de la alta estabilidad de los ciclótidos durante el tiempo, además de ser estas energías óptimas al tener un valor negativo (ver tabla 3.3).

	Fnorgia	Fnorgía		Fnorgia	Fnorgía
Ciclotido	(kJ/mol)	(kcal/mol)	Ciclotido	(kJ/mol)	(kcal/mol)
Caripe 1	-4.66474	-1.119538	Chassatide 1	-45.1732	-10.84157
Caripe 2	-16.1438	-3.874512	Chassatide 2	-6.22843	-1.494823
Caripe 4	-34.9117	-8.378808	Chassatide 3	-102.909	-24.69816
Caripe 6	-7.49638	-1.799131	Chassatide 4	-13.5185	-3.24444
Caripe 7	-92.9425	-22.3062	Chassatide 5	-23.0292	-5.527008
Caripe 8	-26.2484	-6.299616	Chassatide 6	-34.7259	-8.334216
cd1	-48.6525	-11.6766	Chassatide 7	-32.557	-7.81368
cyclopsychotride A	-34.7191	-8.332584	Chassatide 8	-15.7839	-3.788136
hcf1	-16.2952	-3.910848	Chassatide 9	-15.7839	-3.788136
hcf1 variant	-57.0895	-13.70148	Chassatide 10	-67.2226	-16.13342
htf1	-59.5769	-14.29846	Chassatide 11	-45.6569	-10.95766
palicourein	-42.9879	-10.3171	Chassatide 12	-4.20794	-1.009906
Paltet	-21.6485	-5.19564	Chassatide 13	-36.0465	-8.65116
parigidin br1	-26.2681	-6.304344	Chassatide 14	-55.4033	-13.29679
ps1	-14.3284	-3.438816	Chassatide 15	-79.6596	-19.1183
psybra1	-13.5259	-3.246216	Chassatide 16	-90.6558	-21.75739
psyle A	-50.4752	-12.11405	Chassatide 17	-13.5278	-3.246672
psyle B	-79.526	-19.08624	Chassatide 18	-10.0076	-2.401824
psyle C	-65.5611	-15.73466	Katala b1	-38.5696	-9.256704
psyle D	-41.6332	-9.991968	Katala b2	-42.1922	-10.126128
psyle E	-21.5937	-5.182488	Katala b3	-91.9381	-22.065144

60

 Tabla 3.3 Tabla de energía obtenida del software Gromacs después de la Dinámica

 Molecular



psyle F	-80.1197	-19.22873	Katala b4	-24.7423	-5.938152
vibiB	-64.0179	-15.3643	Katala b5	-51.0974	-12.263376
vibiG	-21.9776	-5.274624	Katala b6	-49.4575	-11.8698
vibiH	-16.0005	-3.84012	Katala b7	-25.4599	-6.110376
vitriA	-21.7534	-5.220816	Katala b8	-9.5587	-2.294088
circulin A	-2.74201	-0.658082	Katala b9	-38.9172	-9.340128
circulin B	-3.4361	-0.824664	Katala b10	-9.66517	-2.3196408
circulin C	-34.8362	-8.360688	Katala b11	-13.5929	-3.262296
circulin D	-36.5936	-8.782464	Katala b12	-5.64292	-1.3543008
circulin E	-52.0643	-12.49543	Katala b13	-45.0079	-10.801896
circulin F	-54.0686	-12.97646	Katala b14	-5.08892	-1.2213408
Hedyotideb 1	7.63739	1.8329736	Katala b15	-28.2419	-6.778056
Hedyotideb 2	-126.804	-30.43296	Katala b16	-36.4529	-8.748696
oak6	-59.9857	-14.396568	Katala b17	-60.3348	-14.480352
Oak6_2	-39.2458	-9.418992	Katala b18	-14.0055	-3.36132
oak7	-44.9407	-10.785768	Katala b19	-20.6043	-4.945032
oak8	-74.8375	-17.961	Katala S	-26.5288	-6.366912
cycloviolacionO22	-47.1322	-11.311728	chacur	-34.5843	-8.300232

El análisis de Ramachandran nos muestra que los ciclótidos predichos con el servidor Robetta, y luego de una dinámica molecular, tiene en su mayoría mas del 90% de los residuos en la región permitida (ver tabla 3.4), esto quiere decir que la conformación de la estructura de los ciclótidos es apta para poder realizar estudios in silico, en este caso para el acoplamiento molecular con la Beta amiloide.

Ciclótidos	Regiones favorecidas (%)	Regiones permitida (%)s
Caripe 1	82.8	100
Caripe 2	75.9	96.6
Caripe 4	80	92
Caripe 6	88.5	100
Caripe 7	75	96.9
Caripe 8	69	100
cd1	81.3	96.9
cyclopsychotride A	79.3	100
hcf1	78.6	96.4
hcf1 variant	C81.5TOLIC	100
htf1	82.1	92.9
palicourein	91.4	100
paltet	81.5	92.6
parigidin br1	76.7	100
ps1	93.1	100
psybra1	81.5	96.3
psyle A	80.8	96.2
psyle B	84.6	96.2
psyle C	72	100
psyle D	72.4	93.1
psyle E	79.3	93.1
psyle F	75.9	91.1
vibiB	88.9	96.3
vibiG	75.9	100
vibiH	79.3	93.1
vitriA	78.6	92.9
Chassatide 1	74.1	100
Chassatide 2	79.3	96.6
Chassatide 3	85.3	96.3
Chassatide 4	77.8	100
Chassatide 5	79.3	96.6

### Tabla 3.4 Resultados del análisis de Ramanchandra de los 78 ciclótidos.

Chassatide 6	82.8	100
Chassatide 7	74.1	92.6
Chassatide 8	75	96.4
Chassatide 9	78.6	96.4
Chassatide 10	70.4	100
Chassatide 11	69.2	96.2
Chassatide 12	80.8	92.3
Chassatide 13	86.2	100
Chassatide 14	75.9	93.1
Chassatide 15	82.8	96.6
Chassatide 16	72.4	96.6
Chassatide 17	85.2 OLIC	100
Chassatide 18	82.1	100
circulin A	92.9	96.4
circulin B	69	96.6
circulin C	71.4	96.4
circulin D	75	100
circulin E	75	96.4
circulin F	74.1	96.3
Hedyotideb 1	82.1	100
Hedyotideb 2	85.2	100
Katala b1	88.9	96.3
Katala b2	81.5	100
Katala b3	82.1	96.4
Katala b4	93.6	96.3
Katala b5	82.1	100
Katala b6	85.7	100
Katala b7	85.2	96.3
Katala b8	72.4	96.6
Katala b9	89.7	100
Katala b10	92.	100
Katala b11	85.2	100
Katala b12	80.8	96.2

63

4
4
)
)
)
)
4
)
4
4
3
4
)
3

### 3.3. Acoplamiento Molecular

El análisis de los sitios de interacción de la proteína de Beta amiloide, con el servidor PockDrug, se ve en la Tabla 3.5 los primeros 5 sitios de interacción que nos da el servidor basado en la probabilidad de drogabilidad; y también en la Figura 3.18 se puede observas los sitios de interacción que nos proporcionó PockDrug.

 Tabla 3.5 Tabla de información proporcionada por PockDrug para el dodecámero de Beta

 amiloide

Pockets	Vol. Hull*	Hydroph. Kyte*	Polar res.*	Aromati c res.*	Otyr atom	Nb. Res.*	Drugg prob*	Standard deviation
P 0	4337.05	0.42	0.46	0.33	0.03	46.0	0.98	0.0
P 11	924.37	0.79	0.26	0.11	0.0	19.0	0.96	0.0
P 12	715.74	0.87	0.47	0.33	0.03	15.0	0.99	0.0
P 13	496.8	3.73	0.0	0.29	0.0	14.0	1.0	0.0
P 18	554.24	1.76	0.17	0.22	0.0	18.0	1.0	0.0

Vol. Hull\* = Volumen Hull; Hydrophob. Kyte\*= Hidrofobicidad Kyte; Polar Res.\*= Proporcion de Residuos polares; Aromatic Res.\*= Proporción de residuos Aromaticos; Drugg Prob\*= Probabilidad de Drogabilidad; Nb. Res.\*= Número de residuos en el sitio activo.



Figura 3.18 Se observan los sitios activos de la beta amiloide dados por el servidor PockDrug desde dos vistas de la proteína; P0-rojo, P11-amarillo, P12-rosado, P13verde, P18-celeste.

Con las estructuras promedio obtenidas tanto de la B-amiloide como de los ciclótidos, se procedió a hacer un acoplamiento molecular con el programa Hex, que este nos predice el lugar más probable en el que se pueden unir estas dos estructuras.

De los 20000 sistemas de acoplamiento otenido de Hex, se escogió el complejo ciclótido –  $\beta$ amiloide de menor energía, se puede observar en los complejos mediante el visualizador Chimera que los ciclótidos se unen en los sitio de interacción obtenidos anteriormente con PockDrug (ver Figura 3.19-3.27). Para validar esta predicción se hizo un post procesamiento con una dinámica molecular de 10 ns, esto es para observar si el ciclótido se mantiene en el sitio de interacción con respecto al tiempo, ya que Hex es solo un predictor. En la dinámica se observa que el lugar de acoplamiento de la Beta amiloide con el ciclótido no varía, y también el análisis de desviación media cuadrática (RMSD) se observó que el complejo ciclótido- $\beta$ amiloide alcanza la estabilidad al no tener mas 0.3 nm de fluctuación durante su trayectoria.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA



**Figura 3.19** Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Caripe.



Figura 3.20 Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Vibi.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA



**Figura 3.21** Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Psyle.



Figura 3.22 Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo PS.



UNIVERSIDAD Católica De Santa M<u>aría</u>



Figura 3.23 Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Circulin.



Figura 3.24 Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Kalata.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA



Figura 3.25 Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Hedyoide.



Figura 3.26 Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo Chassatide.





Figura 3.27 Acoplamiento molecular (Docking) entre la Beta amiloide (azul) y el ciclótido (verde) tipo CD.

El análisis que se hizo al acoplamiento molecular (Docking), entre las estructuras de la Beta amiloide y cada uno de los ciclótidos, para ver la interacción existente entre estas moléculas fue evaluar la presencia de puentes hidrógenos. En la gráfica de puentes hidrógeno de los ciclótido por tipo (ver Figura 3.28-3.36) que se obtuvo con ayuda del programa Gromac's, se observa que durante la trayectoria existe la formación de esos puentes; con ayuda del visualizador Chimera se pudo observar y determinar cuales son los aminoácidos interaccionantes entre la Beta amiloide y los ciclótidos; todos los cilótidos presentaron al menos un puente hidrógeno con respecto a la Beta amiloide, excepto el ciclótido CycloviolacinO22, en la Tabla 3.6 se relaciona los aminoácidos que interaccionan tanto como de la Beta amiloide como del Ciclótido englobados por tipo de ciclótido.

UNIVERSIDAD Católica De Santa María







Figura 3.29 Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la

Beta amiloide y el ciclótido Vibi.



Figura 3.30 Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido Psyle.









Figura 3.32 Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la

Beta amiloide y el ciclótido Circulin.



Figura 3.33 Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido kalata.









Figura 3.35 Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido Chassatide.



Figura 3.36 Análisis de los puentes hidrógeno en el acoplamiento molecular entre la Beta amiloide y el ciclótido CD.





Figura 3.37 Puentes hidrógeno formados entre la Glutamina 305 de la Beta amiloide y la Arginina 30 del ciclótido Caripe



Figura 3.38 Puentes hidrógeno formados entre la Asp253, Glu179, Arg257 de la Beta amiloide y la Arg28, Tyr23, Cys19 del ciclótido Vibi.



Figura 3.39 Puentes hidrógeno formados entre la Asp421 de la Beta amiloide y la

Lys23, Ser22 del ciclótido Vibi.



**Figura 3.40** Puentes hidrógeno formados entre la Asp421, Glu221 de la Beta amiloide y la Asn31, Arg30, Lys13, Asn36 del ciclótido PS.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA



Figura 3.41 Puentes hidrógeno formados entre la Arg341, Asp301 de la Beta amiloide

y la Gly11, Trp23 del ciclótido Circulin.



Figura 3.42 Puentes hidrógeno formados entre la Asp421 de la Beta amiloide y la Lys23, Ser22 del ciclótido Kalata.



Figura 3.43 Puentes hidrógeno formados entre la Asp253, Asp211 de la Beta amiloide y la Arg29 del ciclótido Hedyotide.





Figura 3.44 Puentes hidrógeno formados entre la Arg257, Arg199, Arg173 de la Beta amiloide y la Cus23, Lys24, Phe4, Cys9 del ciclótido Chassatide.



**Figura 3.45** Puentes hidrógeno formados entre la Asn363, Lys364, Lys322, Lys280, Lys238 de la Beta amiloide y la Tyr11, Glu18, Ser9, Glu28 del ciclótido CD.

**Tabla 3.6** Relación de aminoácidos interactuantes entre la beta amiloide y los ciclótidos,

 englobados por tipos de ciclótidos.

Tipo de Ciclótidos	Aminoácidos			
	Ciclótidos	Beta amiloide		
Kalata	Arginina, glutamina, treonina, glicina,	Aspartato, alanina, lisina, glicina, tirosina, histidina		
Psyle	Lisina, Serina, asparragina, tirosina	Aspartato, glutamato,		
Circulin	Arginina, leucina, asparragina, lisina	Aspartato, glutamato, fenilalanina, serina		
Hediotide	Arginina	Aspartato		
Cycloviolacin	- /0	-		
Ps	Asparragina, arginina, lisina	Aspartato, glutamato		
Cd Delos II	Tirosina, serina, glicina, glutamato	Lisina		
Vibi	Arginina, tirosina, cisteína, lisina, serina	Aspartato, glutamato, arginina, serina		
Chassatide	Cisteína, lisina, fenilalanina	Arginina		
Caripe	Glutamato, leucina, asparragina,	Arginina, aspartato, fenilalanina		

Y el resultado de las energías de interacción nos muestra que le energía entre los ciclótidos y la beta amiloide es óptima, al observar que toda las energías obtenidas son negativas (ver tabla 3.7).

 Tabla 3.7 Energías de interacción entre los 78 ciclótidos y la Beta amiloide.

Ciclotido	Energia (kJ/mol)	Energía (kcal/mol)	Ciclotido	Energia (kJ/mol)	Energía (kcal/mol)
Caripe 1	-402.4	-96.2	Chassatide 1	-481.8	-115.2
Caripe 2	-395	-94.4	Chassatide 2	-266.7	-63.7
Caripe 4	-478.2	-114.3	Chassatide 3	-366.6	-87.6
Caripe 6	-305.2	-72.9	Chassatide 4	-586.3	-140.1
Caripe 7	-466.6	-111.5	Chassatide 5	-486.1	-116.2

Caripe 8	-472.2	-112.9	Chassatide 6	-416.5	-99.5
cd1	-330.5	-79.0	Chassatide 7	-483.2	-115.5
cyclopsychotride A	-497.2	-118.8	Chassatide 8	-325.4	-77.8
hcf1	-410.3	-98.1	Chassatide 9	-322.1	-77.0
hcf1 variant	-357	-85.3	Chassatide 10	-360.7	-86.2
htf1	-408.6	-97.7	Chassatide 11	-342.2	-81.8
palicourein	-318.4	-76.1	Chassatide 12	-335.4	-80.2
Paltet	-351.2	-83.9	Chassatide 13	-432.9	-103.5
parigidin br1	-329.5	-78.8	Chassatide 14	-596.7	-142.6
ps1	-476.3	-113.8	Chassatide 15	-360.7	-86.2
psybra1	-350	-83.7	Chassatide 16	-327.4	-78.3
psyle A	-358.1	-85.6	Chassatide 17	-310.3	-74.2
psyle B	-505.9	-120.9	Chassatide 18	-381.3	-91.1
psyle C	-427.2	-102.1	Katala b1	-568.5	-135.9
psyle D	-335.4	-80.2	Katala b2	-534.4	-127.7
psyle E	-357.2	-85.4	Katala b3	-561	-134.1
psyle F	-290.3	-69.4	Katala b4	-512.6	-122.5
vibiB	-251.6	-60.1	Katala b5	-573.2	-137.0
vibiG	-465.1	-111.2	Katala b6	-411.6	-98.4
vibiH	-418.2	-100.0	Katala b7	-496.5	-118.7
vitriA	-470.8	-112.5	Katala b8	-434.7	-103.9
circulin A	-526.1	-125.7	Katala b9	-345.1	-82.5
circulin B	-440.5	-105.3	Katala b10	-372.9	-89.1
circulin C	-436.1	-104.2	Katala b11	-561	-134.1

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

circulin D	-310.6	-74.2	Katala b12	-512.6	-122.5
circulin E	-416.5	-99.5	Katala b13	-473.2	-113.1
circulin F	-411.8	-98.4	Katala b14	-341.5	-81.6
Hedyotideb 1	-440.9	-105.4	Katala b15	-496.3	-118.6
Hedyotideb 2	-412.4	-98.6	Katala b16	-307.3	-73.4
oak6	-336.6	-80.4	Katala b17	-333.1	-79.6
oak6_2	-487	-116.4	Katala b18	-320.9	-76.7
oak7	-462.2	-110.5	Katala b19	-490.5	-117.2
oak8	-403.8	-96.5	Katala S	-574.3	-137.3
chacur1	-375	-89.6	chacur1	-575	-137.4



80



# Conclusiones

- Con las Bases de datos NCBI y Cybase se pudo recopilar las estructuras de la Beta amiloide y los ciclótidos pertenecientes a la familia *Rubiaceae*, en formato ".pdb" y ".fasta" respectivamente.
- 2. Con ayuda del programa computacional Gromacs se obtuvieron estructuras minimizadas y estables tanto para la Beta amiloide, como para los 78 ciclótidos obtenidos, teniendo gráficas de con fluctuaciones menores a 0.3nm.
- **3.** Se acoplaron las estructuras de la Beta amiloide con cada uno de los 78 ciclótidos, mostrando afinidad por parte de estos últimos para la Beta amiloide.
- 4. Se obtuvo el mejor complejo ciclótido-βamiloide para cada uno de los 78 ciclótidos, además que permanecieron acoplados después de una dinámica de 10ns, demostrando la alta energía de interacción que tiene este complejo.
- 5. Se analizó la interacción entre la Beta amiloide y los ciclótidos mediante la presencia de puentes hidrógeno.



# Recomendaciones

1. Se recomienda continuar la presente investigación con la determinación del  $\Delta G$ , ya que de esta forma se podrá tener en forma cuantitativa la energía de unión que existe entre la Beta amiloide y los ciclótidos.





#### Bibliografías

- [1] Pradeep Kumar, Viness Pillay, Yahya E Choonara, Girish Modi, Dinesh Naidoo, and Lisa C Du Toit. In silico theoretical molecular modeling for alzheimer's disease: the nicotine-curcumin paradigm in neuroprotection and neurotherapy. International journal of molecular sciences, 12(1):694–724, 2011.
- [2] Joseph El Khoury and Andrew D. Luster. Mechanisms of microglia accumulation in alzheimer's disease: therapeutic implications. Trends in Pharmacological Sciences, 29(12):626 – 632, 2008.
- [3] Rudolph E Tanzi. A brief history of alzheimer's disease gene discovery. Journal of Alzheimer's Disease, 33(s1), 2013.
- [4] Alzheimer's Association. 2013 alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & Dementia, 9 (2):208 245, 2013.
- [5] Gabriele Cipriani, Cristina Dolciotti, Lucia Picchi, and Ubaldo Bonuccelli. Alzheimer and his disease: a brief history. Neurological Sciences, 32(2):275–279, 2011.
- [6] Constantine G. Lyketsos, Maria C. Carrillo, J. Michael Ryan, Ara S. Khachaturian, Paula Trzepacz, Joan Amatniek, Jesse Cedarbaum, Robert Brashear, and David S. Miller. Neuropsychiatric symptoms in alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, 7(5):532 – 539, 2011.
- [7] JoAnn T. Tschanz, Chris D. Corcoran, Sarah Schwartz, Katherine Treiber, Robert C. Green, Maria C. Norto, Michelle M. Mielke, Kathleen Piercy, Martin Steinberg, and Peter V. Rabins. Progression of cognitive, functional, and neuropsychiatric symptom domains in a population cohort with alzheimer dementia: the cache county dementia progression study. The American Journal of Geriatric Psychiatry, 19(6):532–542, 2011.
- [8] Yonas E. Geda, Lon S. Schneider, et al. Neuropsychiatric symptoms in alzheimer's disease: Past progress and anticipation of the future. Alzheimer's & Dementia, 9(5):602 – 608, 2013.
- [9] Eloise Kok. Alzheimer's disease neuropathology and inflammation: A genetic and immunohisto-chemical study. PhD thesis, School of medicine, 2011.
- [10] Kevin Mullane and Michael Williams. Alzheimer's therapeutics: Continued clinical failures ques-tion the validity of the amyloid hypothesis—but what lies beyond? Biochemical Pharmacology, 85(3):289 305, 2013.

- [11] Stephanie JB. Vos, Chengjie Xiong, Pieter J. Visser, Mateusz S. Jasielec, Jason Hassenstab, Elizabeth A. Grant, Nigel J. Cairns, John C. Morris, David M. Holtzman, and Anne M. Fagan. Preclinical alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study. The Lancet Neurology, 12(10):957–965, 2013.
- [12] Kristiina Karttunen, Pertti Karppi, Asta Hiltunen, Matti Vanhanen, Tarja Välimäki, Janne Martikai-nen, Hannu Valtonen, Juhani Sivenius, Hilkka Soininen, and Sirpa Hartikainen. Neuropsy-chiatric symptoms and quality of life in patients with very mild and mild alzheimer's disease. International journal of geriatric psychiatry, 26(5):473–482, 2011.
- [13] Harald Hampel, David Prvulovic, Stefan Teipel, Frank Jessen, Christian Luckhaus, Lutz Frölich, Matthias W. Riepe, Richard Dodel, Thomas Leyhe, Lars Bertram, Wolfgang Hoffmann, and Frank Faltraco. The future of alzheimer's disease: The next 10 years. Progress in Neurobiology, 95(4):718 – 728, 2011.
- [14] Ana Luisa Sosa-Ortiz, Isaac Acosta-Castillo, and Martin J Prince. Epidemiology of dementias and alzheimer's disease. Archives of medical research, 43(8):600– 608, 2012.
- [15] Guy M. McKhann, David S. Knopman, Howard Chertkow, Bradley T. Hyman, Clifford R. Jack Jr., Claudia H. Kawas, William E. Klunk, Walter J. Koroshetz, Jennifer J. Manly, Richard Mayeux, Richard C. Mohs, John C. Morris, Martin N. Rossor, Philip Scheltens, Maria C. Carrillo, Bill Thies, Sandra Weintraub, and Creighton H. Phelps. The diagnosis of dementia due to alzheimer's disease: Recommendations from the national institute on aging-alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, 7(3):263 – 269, 2011.
- [16] Clifford R Jack Jr, Marilyn Albert, David S Knopman, Guy M McKhann, Reisa A Sperling, Maria Carillo, William Thies, and Creighton H Phelps. Introduction to revised criteria for the diagnosis of alzheimer's disease: National institute on aging and the alzheimer association workgroups. Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association, 7(3):257, 2011.
- [17] Christiane Reitz and Richard Mayeux. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochemical pharmacology, 88(4):640–651, 2014.
- [18] Piotr Lewczuk, Barbara Mroczko, Anne Fagan, and Johannes Kornhuber. Biomarkers of alz-heimer's disease and mild cognitive impairment: A current perspective. Advances in medical sciences, 60(1):76–82, 2015.
- [19] David Lira, Nilton Custodio, Rosa Montesinos, Liliana Bendezú, and Patricia Cortijo. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de alzheimer en países en vías de desarrollo: Aproximación a nuestra realidad. Interciencia, 1:11–21, 2010.
- [20] Richard Mayeux and Yaakov Stern. Epidemiology of alzheimer disease. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2(8), 2012.



- [21] Domenico Praticò. Oxidative stress hypothesis in alzheimer's disease: a reappraisal. Trends in pharmacological sciences, 29(12):609–615, 2008.
- [22] Marco A. Meraz-Ríos, Danira Toral-Rios, Diana Franco-Bocanegra, Juana Villeda-Hernández, and Victoria Campos-Peña. Inflammatory process in alzheimer's disease. Beyond the borders: The gates and fences of Neuroimmune interaction, 2014.
- [23] Thomas J. Esparza, Hanzhi Zhao, John R. Cirrito, Nigel J. Cairns, Randall J. Bateman, David M. Holtzman, and David L. Brody. Amyloid-beta oligomerization in alzheimer dementia versus high-pathology controls. Annals of neurology, 73(1):104–119, 2013.
- [24] Tara L. Spires-Jones and Bradley T. Hyman. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in alzheimer's disease. Neuron, 82(4):756–771, 2014.
- [25] Celeste M. Karch and Alison M. Goate. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. Biological psychiatry, 77(1):43–51, 2015.
- [26] Paula Grammas. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: impli-cations for the pathogenesis of alzheimer's disease. J Neuroinflammation, 8(26):2094–8, 2011.
- [27] Jun-Xia Lu, Wei Qiang, Wai-Ming Yau, Charles D Schwieters, Stephen C Meredith, and Robert Tycko. Molecular structure of  $\beta$ -amyloid fibrils in alzheimer's disease brain tissue. Cell, 154(6): 1257–1268, 2013.
- [28] Yadong Huang and Lennart Mucke. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. Cell, 148(6):1204–1222, 2012.
- [29] Kim A. Bruggink, Wesley Jongbloed, Elisanne ALM. Biemans, Rob Veerhuis, Jurgen AHR Claassen, H. Bea Kuiperij, and Marcel M. Verbeek. Amyloid- $\beta$  oligomer detection by elisa in cerebrospinal fluid and brain tissue. Analytical biochemistry, 433(2):112–120, 2013.
- [30] Anil Kumar and Arti Singh. A review on alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. Pharmacological Reports, 67(2):195–203, 2015.
- [31] D Allan Butterfield, Aaron M Swomley, and Rukhsana Sultana. Amyloid  $\beta$ -peptide (1-42)-induced oxidative stress in alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression. Antioxidants & redox signaling, 19(8):823–835, 2013.
- [32] David Eisenberg and Mathias Jucker. The amyloid state of proteins in human diseases. Cell, 148(6):1188–1203, 2012.
- [33] Mathias Jucker. The amyloid state of proteins in human diseases. Cell, 148(6), 2012.

- [34] Peizhong Mao and P Hemachandra Reddy. Aging and amyloid beta-induced oxidative dna da-mage and mitochondrial dysfunction in alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1812(11): 1359–1370, 2011.
- [35] AD Randall, J Witton, C Booth, A Hynes-Allen, and JT Brown. The functional neurophysiology of the amyloid precursor protein (app) processing pathway. Neuropharmacology, 59(4):243–267, 2010.
- [36] Clifford R. Jack, David S. Knopman, William J. Jagust, Ronald C. Petersen, Michael W. Weiner, Paul S. Aisen, Leslie M. Shaw, Prashanthi Vemuri, Heather J. Wiste, and Stephen D. Weigand. Tracking pathophysiological processes in alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. The Lancet Neurology, 12(2):207–216, 2013.
- [37] Rudolph E. Tanzi. The genetics of alzheimer disease. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2(10), 2012
- [38] Erik Portelius, Eric Price, Gunnar Brinkmalm, Mark Stiteler, Maria Olsson, Rita Persson, Ann Westman-Brinkmalm, Henrik Zetterberg, Adam J Simon, and Kaj Blennow. A novel pathway for amyloid precursor protein processing. Neurobiology of aging, 32(6):1090–1098, 2011.
- [39] Marcus Fändrich, Matthias Schmidt, and Nikolaus Grigorieff. Recent progress in understanding alzheimer's  $\beta$ -amyloid structures. Trends in biochemical sciences, 36(6):338–345, 2011.
- [40] Kazuma Murakami, Nakaba Murata, Yoshihiro Noda, Kazuhiro Irie, Takuji Shirasawa, and Takahiko Shimizu. Stimulation of the amyloidogenic pathway by cytoplasmic superoxide radicals in an alzheimer's disease mouse model. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 76(6):1098–1103, 2012.
- [41] Berislav V. Zlokovic. Neurovascular pathways to neurodegeneration in alzheimer's disease and other disorders. Nature Reviews Neuroscience, 12(12):723-738, 2011.
- [42] Patrick Droste, André Frenzel, Miriam Steinwand, Thibaut Pelat, Philippe Thullier, Michael Hust, Hilal Lashuel, and Stefan Dübel. Structural differences of amyloid- $\beta$  fibrils revealed by antibodies from phage display. BMC biotechnology, 15(1):1, 2015.
- [43] Isabel Morgado and Marcus Fändrich. Assembly of alzheimer's  $a\beta$  peptide into nanostructured amyloid fibrils. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 16(6):508–514, 2011.
- [44] Elzbieta Glaser, Catarina Moreira Pinho, and Pedro Filipe Teixeira. Mitochondrial import and degradation of amyloid- $\beta$  peptide. BBA-Bioenergetics, 1837(7):1069–1074, 2014.

- [45] Jessica Nasica-Labouze, Phuong H. Nguyen, Fabio Sterpone, Olivia Berthoumieu, Nicolae-Viorel Buchete, Sébastien Coté, Alfonso De Simone, Andrew J. Doig, Peter Faller, and Angel Garcia. Amyloid  $\beta$  protein and alzheimer's disease: When computer simulations complement experimental studies. Chemical reviews, 115(9):3518–3563, 2015.
- [46] Jan Stöhr, Joel C. Watts, Zachary L. Mensinger, Abby Oehler, Sunny K. Grillo, Stephen J. DeArmond, Stanley B. Prusiner, and Kurt Giles. Purified and synthetic alzheimer's amyloid beta  $(a\beta)$  prions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(27):11025–11030, 2012.
- [47] Xinglong Wang, Wenzhang Wang, Li Li, George Perry, Hyoung-gon Lee, and Xiongwei Zhu. Oxi-dative stress and mitochondrial dysfunction in alzheimer's disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1842(8):1240–1247, 2014.
- [48] Ryan A. Picou, Indu Kheterpal, Amber D. Wellman, Madhavi Minnamreddy, Ginger Ku, and S. Douglass Gilman. Analysis of  $a\beta$  (1-40) and  $a\beta$  (1-42) monomer and fibrils by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography B, 879(9):627–632, 2011.
- [49] Mary E. Lame, Erin E. Chambers, and Matthew Blatnik. Quantitation of amyloid beta peptides  $a\beta$  1-38,  $a\beta$  1-40, and  $a\beta$  1-42 in human cerebrospinal fluid by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical biochemistry, 419(2):133–139, 2011.
- [50] Lloret, T. Fuchsberger, E. Giraldo, and J. Vina. Molecular mechanisms linking amyloid  $\beta$  toxicity and tau hyperphosphorylation in alzheimer's disease. Free Radical Biology and Medicine, 83:186–191, 2015.
- [51] John E Morley and Susan A Farr. The role of amyloid-beta in the regulation of memory. Biochemical pharmacology, 88(4):479–485, 2014.
- [52] Carolyn C Rudy, Holly C Hunsberger, Daniel S Weitzner, and Miranda N Reed. The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of alzheimer's disease. Aging and disease, 6(2):131, 2015.
- [53] R Anand, Kiran Dip Gill, and Abbas Ali Mahdi. Therapeutics of alzheimer's disease: Past, present and future. Neuropharmacology, 76:27–50, 2014.
- [54] Dimitrios Kapogiannis and Mark P Mattson. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and alzheimer's disease. The Lancet Neurology, 10(2): 187–198, 2011.
- [55] Russell H Swerdlow, Jeffrey M Burns, and Shaharyar M Khan. The alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1842(8):1219–1231, 2014.
- [56] Reisa A. Sperling, Paul S. Aisen, Laurel A. Beckett, David A. Bennett, Suzanne Craft, Anne M. Fagan, Takeshi Iwatsubo, Clifford R. Jack, Jeffrey Kaye, and
Thomas J. Montine. Toward defining the preclinical stages of alzheimer's disease: Recommendations from the national institute on aging-alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, 7(3):280–292, 2011.

- [57] Russell H Swerdlow. Brain aging, alzheimer's disease, and mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1812(12):1630–1639, 2011.
- [58] Clifford R Jack, Marilyn S Albert, David S Knopman, Guy M McKhann, Reisa A Sperling, Maria C Carrillo, Bill Thies, and Creighton H Phelps. Introduction to the recommendations from the national institute on aging-alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, 7(3):257–262, 2011.
- [59] Christian Haupt and Marcus Fändrich. Biotechnologically engineered protein binders for applica-tions in amyloid diseases. Trends in biotechnology, 32(10):513–520, 2014.
- [60] Jun Wang, Mario G. Ferruzzi, Lap Ho, Jack Blount, Elsa M. Janle, Bing Gong, Yong Pan, G. A. Gowda Nagana, Daniel Raftery, and Isabel Arrieta-Cruz. Braintargeted proanthocyanidin metabolites for alzheimer's disease treatment. The Journal of Neuroscience, 32(15):5144–5150, 2012.
- [61] Aaron G Poth, Michelle L Colgrave, Reynold Philip, Bomai Kerenga, Norelle L Daly, Marilyn A Anderson, and David J Craik. Discovery of cyclotides in the fabaceae plant family provides new insights into the cyclization, evolution, and distribution of circular proteins. ACS chemical biology, 6(4):345–355, 2011a.
- [62] Clarence TT Wong, Misako Taichi, Hideki Nishio, Yuji Nishiuchi, and James P Tam. Optimal oxidative folding of the novel antimicrobial cyclotide from hedyotis biflora requires high alcohol concentrations. Biochemistry, 50(33):7275–7283, 2011.
- [63] David J Craik. Advances in botanical research Plant Cyclotides, volume 76. ACADE-MIC PRESS LTD-ELSEVIER SCIENCE LTD, 2015.
- [64] William Farias Porto, Vivian de Jesus Miranda, Michelle Flaviane Soares Pinto, Stephan Macha-do Dohms, and Octavio Luiz Franco. High-performance computational analysis and peptide screening from databases of cyclotides from poaceae. Peptide Science, 2015.
- [65] Conan KL Wang, Richard J Clark, Peta J Harvey, K Johan Rosengren, Masa Cemazar, and David J Craik. The role of conserved glu residue on cyclotide stability and activity: a structural and functional study of kalata b12, a naturally occurring glu to asp mutant. Biochemistry, 50 (19):4077–4086, 2011.
- [66] Robert Burman, Mariamawit Y Yeshak, Sonny Larsson, David J Craik, K Johan Rosengren, and Ulf Göransson. Distribution of circular proteins in plants: large-scale mapping of cyclotides in the violaceae. Frontiers in plant science, 6, 2015.



- [67] Johannes Koehbach, Alfred F. Attah, Andreas Berger, Roland Hellinger, Toni M. Kutchan, Eric J. Carpenter, Megan Rolf, Mubo A. Sonibare, Jones O. Moody, and Gane Ka-Shu Wong. Cyclotide discovery in gentianales revisited—identification and characterization of cyclic cystine-knot peptides and their phylogenetic distribution in *rubiaceae* plants. Peptide Science, 100(5):438–452, 2013.
- [68] David J. Craik. Discovery and applications of the plant cyclotides. Toxicon, 56(7):1092–1102, 2010.
- [69] David J. Craik, Maša Cemažar, Conan K. L. Wang, and Norelle L. Daly. The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. Peptide Science, 84(3): 250–266, 2006.
- [70] Robert Burman, Sunithi Gunasekera, Adam A Strömstedt, and Ulf Göransson. Chemistry and biology of cyclotides: circular plant peptides outside the box. Journal of natural products, 77 (3):724–736, 2014.
- [71] Amanda B Smith, Norelle L Daly, and David J Craik. Cyclotides: a patent review. Expert opinion on therapeutic patents, 21(11):1657–1672, 2011.
- [72] Sungkyu Park, Adam A. Strömstedt, and Ulf Göransson. Cyclotide structureactivity relationships: qualitative and quantitative approaches linking cytotoxic and anthelmintic activity to the clustering of physicochemical forces. PloS one, 2014.
- [73] Maria Pränting, Camilla Lööv, Robert Burman, Ulf Göransson, and Dan I Andersson. The cyclotide cycloviolacin o2 from viola odorata has potent bactericidal activity against gram-negative bacteria. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2010.
- [74] Aaron G. Poth, Joshua S. Mylne, Julia Grassl, Russell E. Lyons, A. Harvey Millar, Michelle L. Colgrave, and David J. Craik. Cyclotides associate with leaf vasculature and are the products of a novel precursor in petunia (solanaceae). Journal of Biological Chemistry, 287(32): 27033–27046, 2012.
- [75] Rasmus Eliasen, Norelle L. Daly, Birgitte S. Wulff, Thomas L. Andresen, Kilian W. Conde-Frieboes, and David J. Craik. Design, synthesis, structural and functional characterization of novel melanocortin agonists based on the cyclotide kalata b1. Journal of Biological Chemistry, 287(48):40493–40501, 2012.
- [76] Norelle L. Daly and David J. Craik. Bioactive cystine knot proteins. Current opinion in chemical biology, 15(3):362–368, 2011.
- [77] David J Craik. Host-defense activities of cyclotides. Toxins, 4(2):139–156, 2012
- [78] Teshome Leta Aboye, Richard J. Clark, Robert Burman, Marta Bajona Roig, David J. Craik, and Ulf Göransson. Interlocking disulfides in circular proteins: toward efficient oxidative folding of cyclotides. Antioxidants & redox signaling, 14(1):77–86, 2011.

- [79] Michelle F. S. Pinto, Isabel C. M. Fensterseifer, and Octavio L. Franco. Plant Defence: Biological Control. Springer, 2012.
- [80] Andrew Gould, Yanbin Ji, Teshome L Aboye, and Julio A Camarero. Cyclotides, a novel ultrastable polypeptide scaffold for drug discovery. Current pharmaceutical design, 17(38): 4294, 2011.
- [81] Giang Kien Truc Nguyen, Sen Zhang, Wei Wang, Clarence Tsun Ting Wong, Ngan Thi Kim Nguyen, and James P Tam. Discovery of a linear cyclotide from the bracelet subfamily and its disulfide mapping by top-down mass spectrometry. Journal of Biological Chemistry, 286(52): 44833–44844, 2011.
- [82] Samantha L Gerlach, Robert Burman, Lars Bohlin, Debasis Mondal, and Ulf Göransson. Iso-lation, characterization, and bioactivity of cyclotides from the micronesian plant psychotria leptothyrsa. Journal of natural Products, 73(7):1207– 1213, 2010.
- [83] Aaron G Poth, Lai Y Chan, and David J Craik. Cyclotides as grafting frameworks for protein engineering and drug design applications. Peptide Science, 100(5):480– 491, 2013.
- [84] David J Craik and Uru Malik. Cyclotide biosynthesis. Current opinion in chemical biology, 17(4):546–554, 2013.
- [85] David J Craik, Joshua S Mylne, and Norelle L Daly. Cyclotides: macrocyclic peptides with applications in drug design and agriculture. Cellular and molecular life sciences, 67(1):9–16, 2010.
- [86] David J Craik. Joseph rudinger memorial lecture: Discovery and applications of cyclotides. Journal of Peptide Science, 19(7):393–407, 2013.
- [87] Aaron G Poth, Michelle L Colgrave, Russell E Lyons, Norelle L Daly, and David J Craik. Discovery of an unusual biosynthetic origin for circular proteins in legumes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(25):10127– 10132, 2011b.
- [88] Brendon F Conlan, Amanda D Gillon, Barbara L Barbeta, and Marilyn A Anderson. Subcellular targeting and biosynthesis of cyclotides in plant cells. American journal of botany, 98(12): 2018–2026, 2011
- [89] Teshome L Aboye and Julio A Camarero. Biological synthesis of circular polypeptides. Journal of Biological Chemistry, 287(32):27026–27032, 2012.
- [90] David J Craik, Joakim E Swedberg, Joshua S Mylne, and Masa Cemazar. Cyclotides as a basis for drug design. Expert opinion on drug discovery, 7(3):179– 194, 2012.

- [91] Sónia Troeira Henriques, Yen-Hua Huang, Stephanie Chaousis, Marc-Antoine Sani, Aaron G Poth, Frances Separovic, and David J Craik. The prototypic cyclotide kalata b1 has a unique mechanism of entering cells. Chemistry & biology, 22(8):1087–1097, 2015.
- [92] Samantha L. Gerlach and Debasis Mondal. The bountiful biological activities of cyclotides. Chronicles of Young Scientists, 3(3):169, 2012.
- [93] Robert Burman, Adam A Strömstedt, Martin Malmsten, and Ulf Göransson. Cyclotide-membrane interactions: Defining factors of membrane binding, depletion and disruption. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1808(11):2665–2673, 2011.
- [94] Diogo Ribeiro Demartini, Giancarlo Pasquali, and Célia Regina Carlini. An overview of pro-teomics approaches applied to biopharmaceuticals and cyclotides research. Journal of proteomics, 93:224–233, 2013.
- [95] Blazej Slazak, Erik Jacobsson, Elzbieta Kuta, and Ulf Göransson. Exogenous plant hormones and cyclotide expression in viola uliginosa (violaceae). Phytochemistry, 117:527–536, 2015.
- [96] Apiwat Sangphukieo, Wanapinun Nawae, Teeraphan Laomettachit, Umaporn Supasitthimethee, and Marasri Ruengjitchatchawalya. Computational design of hypothetical new peptides based on a cyclotide scaffold as hiv gp120 inhibitor. PloS one, 10(10), 2015.
- [97] Yanbin Ji, Subhabrata Majumder, Melissa Millard, Radhika Borra, Tao Bi, Ahmed Y Elnagar, Nouri Neamati, Alexander Shekhtman, and Julio A Camarero. In vivo activation of the p53 tumor suppressor pathway by an engineered cyclotide. Journal of the American Chemical Society, 135(31):11623–11633, 2013.
- [98] Roland Hellinger, Johannes Koehbach, Albert Puigpinós, Richard J Clark, Teresa Tarragó, Ernest Giralt, and Christian W Gruber. Inhibition of human prolyl oligopeptidase activity by the cyclotide psysol 2 isolated from psychotria solitudinum. Journal of natural products, 78(5): 1073–1082, 2015.
- [99] Jennifer A Getz, Olivier Cheneval, David J Craik, and Patrick S Daugherty. Design of a cyclotide antagonist of neuropilin-1 and-2 that potently inhibits endothelial cell migration. ACS chemical biology, 8(6):1147–1154, 2013.
- [100] Teshome L Aboye, Helen Ha, Subhabrata Majumder, Frauke Christ, Zeger Debyser, Alexander Shekhtman, Nouri Neamati, and Julio A Camarero. Design of a novel cyclotide-based cxcr4 antagonist with anti-human immunodeficiency virus (hiv)-1 activity. Journal of medicinal chemistry, 55(23):10729–10734, 2012.
- [101] Hao Gong, Xin Yang, Yudan Zhao, Robert B Petersen, Xinran Liu, Yang Liu, and Kun Huang. Amyloidogenicity of p53: a hidden link between protein misfolding and cancer. Current Protein and Peptide Science, 16(2):135–146, 2015.

- [102] Conan K Wang, Susan E Northfield, Yen-Hua Huang, Mariana C Ramos, and David J Craik. Inhibition of tau aggregation using a naturally-occurring cyclic peptide scaffold. European Journal of Medicinal Chemistry, 2016.
- [103] Nsikan Akpan. Mining protein interactions for smarter drug design. Genetic Engineering & Biotechnology News, 2014.
- [104] Michael J Espiritu, Abby C Collier, and Jon-Paul Bingham. A 21st-century approach to age-old problems: the ascension of biologics in clinical therapeutics. Drug discovery today, 19(8): 1109–1113, 2014.
- [105] Eirik Falck da Silva. Computational chemistry study of solvents for carbon dioxide absorption. PhD thesis, Fakultet for naturvitenskap og teknologi, 2005.
- [106] CA Downing. Investigating catalytic activity at oxide surfaces using a QM/MM methodology. PhD thesis, UCL (University College London), 2015.
- [107] KI Ramachandran, Gopakumar Deepa, and Krishnan Namboori. Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications. Springer Science & Business Media, 2008.
- [108] Patrik Åkesson. Molecular dynamics of the adsorption of organic molecules on organic substrates. Master's thesis, Linköping University, 2013.
- [109] Andrew R Leach. Molecular modelling: principles and applications. Pearson education, 2001.
- [110] Errol G Lewars. Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. Springer Science & Business Media, 2010.
- [111] BJ Jaidhan and P Srinivasa Rao2 Prof Allam Apparao. Energy minimization and conformation analysis of molecules using steepest descent method. International Journal of Computer Science and Information Technologies, 5:3525–3528, 2014.
- [112] Mats Linder. Computational Studies and Design of Biomolecular Diels-Alder Catalysis. PhD thesis, KTH Royal Institute of Technology, 2012.
- [113] David Young. Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems. John Wiley & Sons, 2004.
- [114] Rui Lai. Development and application of combined quantum mechanical and molecular mecha-nical methods. Master's thesis, University of Nebraska, Nebraska, 2014.
- [115] Joel Keizer. Statistical thermodynamics of nonequilibrium processes. Springer Science & Business Media, 2012.

- [116] Ken Dill and Sarina Bromberg. Molecular driving forces: statistical thermodynamics in biology, chemistry, physics, and nanoscience. Garland Science, 2010.
- [117] Berendsen, HJC, Postma, JPM, van Gunsteren, WF, Hermans, J. Fuerzas intermoleculares, capítulo Modelos de interacción para agua en relación con la hidratación de proteínas, 331-342.Dordrecht: D. Reidel Publishing Company Dordrecht, 1981.
- [118] Kabsch, W., Sander, C. Diccionario de estructura secundaria de proteínas: Reconocimiento de patrones de las características geométricas y de enlace de hidrógeno.Biopolímeros 22, 2577-2637, 1983.
- [119] Mierke, DF, Kessler, H. Dinámica molecular con dimetilsulfóxido como disolvente. Conformación de un hexapéptido cíclico. Chem. 113, 9446, 1991
- [120] Stryer, L. Bioquímica vol. 1, 211. Nueva York: Freeman, 3 edición, 1988.
- [121] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE J Comput Chem, 1605-120, 2004.
- [122] Hertig S, Goddard TD, Johnson GT, Ferrin TE., Biophys J., 2097-102, 2015.
- [123] Chen JE, Huang CC, Ferrin TEDistancia de proteínas. Bioinformática, 1484-6, 2015.
- [124] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD Visual Molecular Dynamics", J. Molec. Graphics, vol. 14, pp. 33-38, 1996.
- [125] Ultra-Fast FFT Protein Docking On Graphics Processors. D.W. Ritchie, V. Venkatraman (2010).
- [126] G. Macindoe, L. Mavridis, V. Venkatraman, M.-D. Devignes, D.W. Ritchie, HexServer: an FFT-based protein-docking server powered by graphics processors,
- [127] D.W. Ritchie and S. Grudinin, Spherical Polar Fourier Assembly of Protein Complexes with Arbitrary Point Group Symmetry, 158-167, 2016.
- [128] D.W. Ritchie, D. Kozakov, and S. Vajda, 241865-1873, 2008.
- [129] D.W. Ritchie,
- [130] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242, 2000.
- [131] Wang CK, Kaas Q, Chiche L, Craik DJ, CyBase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering, Nucleic Acids Res, 206-10, 2008.

- [132] Mulvenna JP, Wang C, Craik DJ, CyBase: a database of cyclic protein sequence and structure, Nucleic Acids Res, 192-4, 2006.
- [133] Kim, David E.; Chivian, Dylan; Baker, David. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. Nucleic acids research, vol. 32, 526-531, 2004.
- [134] Chen et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica, 66:12-21, 2010.
- [135] Borrel, A., Regad, L., Xhaard, H.G., Petitjean, M. and Camproux, A.-C. PockDrug: a model for predicting pocket druggability that overcomes pocket estimation uncertainties. J. Chem. Inf. Model., 55(4), 882-895, 2015.
- [136] Racine, J. gnuplot 4.0: a portable interactive plotting utility. Journal of Applied Econometrics, 21(1), 133-141, 2006.

