

# Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y  
Biotecnológicas

Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica



**DETERMINACIÓN POR SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR DEL EFECTO DEL pH EN LAS INTERACCIONES APOE4 –  $\beta$ - AMILOIDE Y APOE4 - HEPARINA Y SU INFLUENCIA EN LAS ENERGÍAS DE ACOPLAMIENTO CORRELACIONADO CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Tesis presentada por la  
Bachiller:

**Paco Coralla, Silvana  
Guadalupe**

para optar al título profesional  
de **Química Farmacéutica**

Asesor:

**Dr. Gómez Valdez, Badhin**

**Arequipa - Perú**

**2022**

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FARMACIA Y BIOQUIMICA**  
**TITULACIÓN CON TESIS**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 04 de Abril del 2022

Dictamen: 004186-C-EPFyB-2022

Visto el borrador del expediente 004186, presentado por:

**2015101452 - PACO CORALLA SILVANA GUADALUPE**

Titulado:

**DETERMINACIÓN POR SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR DEL EFECTO DEL PH EN LAS  
INTERACCIONES APOE4 ? -AMILOIDE Y APOE4 - HEPARINA Y SU INFLUENCIA EN LAS  
ENERGÍAS DE ACOPLAMIENTO CORRELACIONADO CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**0737 - PAZ ALIAGA CARLOS EITEL IVAN  
DICTAMINADOR**



**2782 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY  
DICTAMINADOR**



**9564 - ORTIZ ROMERO DERLY DAVID  
DICTAMINADOR**

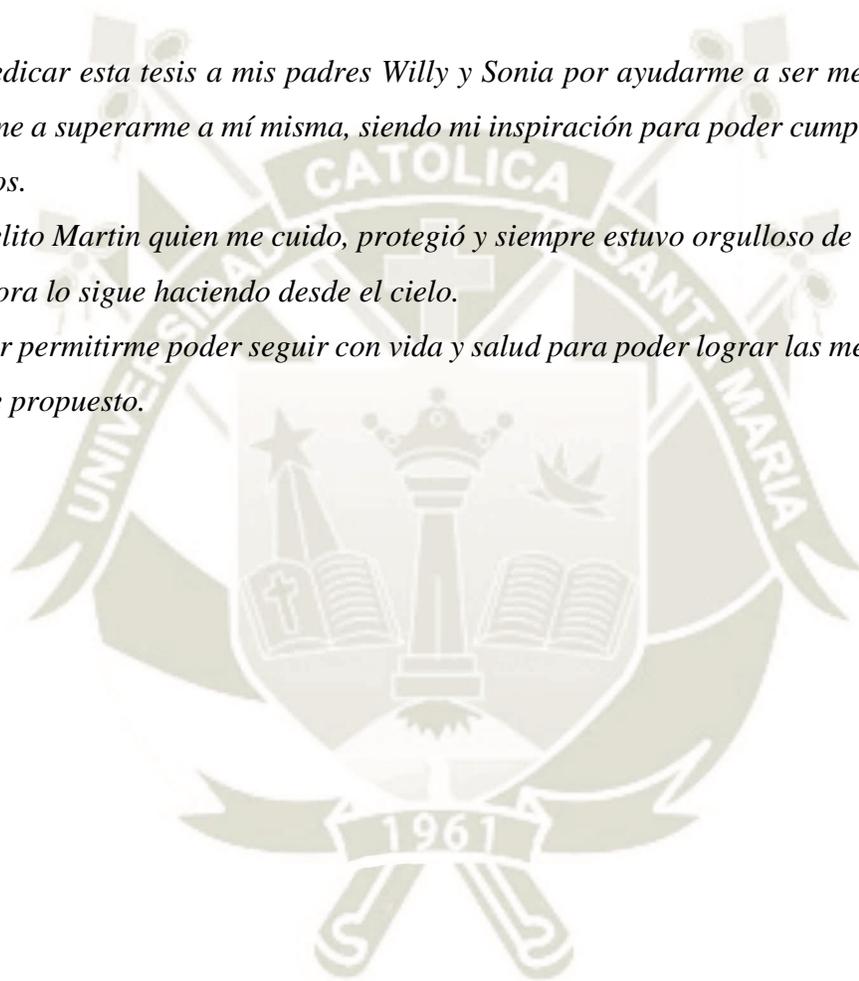


## Dedicatoria

*Quiero dedicar esta tesis a mis padres Willy y Sonia por ayudarme a ser mejor cada día e impulsarme a superarme a mí misma, siendo mi inspiración para poder cumplir mis anhelos y proyectos.*

*A mi abuelito Martin quien me cuidó, protegió y siempre estuvo orgulloso de mis logros que sé que ahora lo sigue haciendo desde el cielo.*

*A Dios por permitirme poder seguir con vida y salud para poder lograr las metas y objetivos que me he propuesto.*



## Agradecimientos

*Este trabajo de tesis deriva del Proyecto de investigación “Diseño y elaboración de una prueba de diagnóstico basada en nuevos biomarcadores para la detección y monitoreo de la enfermedad de Alzheimer” por lo que agradezco a todos los investigadores asociados a este Proyecto, quienes me guiaron en todo el proceso de realización de este trabajo, brindándome sus conocimientos, sugerencias, observaciones y me dieron todo el apoyo para crecer tanto como persona y profesional.*

*Del mismo modo, agradecer infinitamente al Dr. Jorge Aguilar Pineda quien fué y es aquella persona que me enseñó y me sigue enseñando día a día lo que es trabajar con pasión, coraje y convicción, quien me ayudó a fortalecer mis conocimientos y a inducirme al mundo de la Bioinformática, área en la cual no tenía conocimiento alguno, pero hoy por hoy he aprendido gracias a él, conocimientos y consejos que sé que me ayudaran ahora y por el resto de mi vida.*

*Agradecer a la Universidad Católica de Santa María y a todos los docentes que pasaron por mi vida universitaria quienes ayudaron a mi formación profesional y a crecer como persona, a quienes estaré eternamente agradecida.*

*A mis padres, Willy y Sonia, quienes me impulsaron a luchar cada día por mis sueños y me dieron las fuerzas y herramientas necesarias para poder lograr mis objetivos, quienes me enseñaron a no rendirme y a seguir siempre adelante.*

*Al Dr. Badhin Gómez Valdez y al CIIM, quienes me brindaron todo su apoyo y conocimientos, siendo de gran ayuda para el Desarrollo de esta investigación.*

## Agradecimientos

*“Este proyecto ha sido financiado por el Proyecto Concytec - Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia. [contrato número 024-2019], con el objetivo de desarrollar la investigación titulada: “Determinación por simulación de dinámica molecular del efecto del pH en las interacciones ApoE4 –  $\beta$ -Amiloide y ApoE4 - Heparina y su influencia en las energías de acoplamiento correlacionado con la enfermedad de Alzheimer”, mediante el proyecto: “Diseño y elaboración de una prueba de diagnóstico basada en nuevos biomarcadores para el diagnóstico y monitoreo de la Enfermedad de Alzheimer”*”

Proyecto  
**Concytec**  
**Banco Mundial**



# Contenido

<b>Contenido</b> .....	I
<b>Siglas y abreviaturas</b> .....	V
<b>Resumen</b> .....	VII
<b>Abstract</b> .....	IX
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Hipótesis</b> .....	3
<b>Objetivos</b> .....	4
<b>Objetivo general</b> .....	4
<b>Objetivos específicos</b> .....	4
<b>1. Marco Teórico</b> .....	5
<b>1.1 Enfermedad de Alzheimer</b> .....	5
<b>1.1.1 Definición</b> .....	5
<b>1.1.2 Aproximación histórica a la enfermedad de Alzheimer</b> .....	6
<b>1.1.3 Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer</b> .....	8
<b>1.1.4 Patogenia de la Enfermedad</b> .....	9
<b>1.1.4.1 Beta amiloide</b> .....	9
<b>1.1.4.1.1 Estructura</b> .....	10
<b>1.1.4.2 Tau</b> .....	12
<b>1.1.4.3 Apolipoproteína E</b> .....	12
<b>1.1.4.3.1 Estructura</b> .....	14
<b>1.1.5 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Alzheimer</b> .....	15
<b>1.1.6 Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer</b> .....	17
<b>1.1.7 Tratamiento</b> .....	18
<b>1.1.7.1 Fármacos aprobados por la FDA</b> .....	19
<b>1.1.7.2 Heparina como tratamiento alternativo</b> .....	19
<b>1.2 Influencia de la Heparina en el Alzheimer</b> .....	20
<b>1.2.1 Interacción Heparina-ApoE</b> .....	20
<b>1.2.2 Interacción Heparina- Beta Amiloide</b> .....	21
<b>1.3 Influencia del pH</b> .....	22
<b>1.3.1 El pH en las enfermedades neurovasculares</b> .....	22

<b>1.4 Química Computacional</b> .....	23
<b>1.4.1 Modelado molecular</b> .....	25
<b>1.4.2 Mecánica Molecular</b> .....	27
<b>1.4.3 Dinámica molecular</b> .....	28
<b>1.4.3.1 Ensamblés</b> .....	29
<b>1.4.3.1.1 Ensamble NVE</b> .....	29
<b>1.4.3.1.2 Ensamble NVT</b> .....	29
<b>1.4.3.1.3 Ensamble NPT</b> .....	30
<b>1.4.3.2 Integradores</b> .....	30
<b>1.4.3.2.1 Steepest descent</b> .....	30
<b>1.4.3.2.2 Integrador MD</b> .....	30
<b>1.4.3.3 Campo de fuerza</b> .....	31
<b>1.4.3.3.1 OPLS-AA</b> .....	31
<b>1.4.3.4 Teoría Funcional de la Densidad</b> .....	31
<b>1.4.3.5 Cargas Hirshfeld</b> .....	32
<b>1.4.3.6 Condiciones periódicas de contorno</b> .....	32
<b>1.4.4 Acoplamiento Molecular</b> .....	33
<b>1.4.5 Minimización de energía potencial</b> .....	34
<b>1.4.6 La desviación cuadrática media ( RMSD )</b> .....	35
<b>1.4.7 Fluctuación cuadrática media (RMSF)</b> .....	35
<b>1.4.8 Radio de giro</b> .....	35
<b>1.4.9 H-bonds</b> .....	36
<b>1.4.10 SASA</b> .....	36
<b>1.4.11 Aproximación de Poisson-Boltzmann en el cálculo de energías libres (MM/PBSA)</b> ..	36
<b>Capítulo 2</b> .....	38
<b>2.1. Detalles Computacionales</b> .....	38
<b>2.1.1 Hardware</b> .....	38
<b>2.1.2 Base de Datos</b> .....	38
<b>2.1.2.1 UniProt</b> .....	38
<b>2.1.2.2 PDB</b> .....	39
<b>2.1.3 Software</b> .....	39
<b>2.1.3.1 Gromacs</b> .....	40
<b>2.1.3.2 UCSF Chimera</b> .....	40
<b>2.1.3.3 VMD</b> .....	40
<b>2.1.3.4 LigPlot</b> .....	41

2.1.3.5 Putty .....	41
2.1.3.6 WinSCP .....	42
2.1.3.7 ConText .....	42
2.1.3.8 APBS.....	42
2.1.4 Servidores.....	43
2.1.4.1 PatchDock .....	43
2.4.1.2 FireDock.....	43
2.4.1.3 AutoDock Vina .....	43
2.4.1.4 I-TASSER .....	44
2.2 Metodología .....	44
2.2.1 Obtención de estructuras.....	45
2.2.1.1 Apolipoproteína E4 .....	45
2.2.1.2 Beta Amiloide.....	45
2.2.1.3 Heparina.....	45
2.2.2 Propka .....	45
2.2.3 Simulación de Dinámica Molecular .....	46
2.2.4 Acoplamiento molecular .....	47
2.2.4.1 Apolipoproteína E4 – Beta Amiloide .....	47
2.2.4.2 APOE4- Heparina .....	48
2.2.5 Simulación de Dinámica Molecular de los complejos .....	49
2.2.6 Análisis de energías a través de la metodología de MM/PBSA .....	50
Capítulo 3.....	51
3. Resultados y Discusión.....	51
3.1 Obtención de las estructuras moleculares.....	52
3.1.1 ApoE4 .....	53
3.1.2 $\beta$ -amiloide de 42 residuos.....	54
3.1.3 Heparina (enoxaparina).....	55
3.2 Análisis de estabilidad de las estructuras aisladas .....	56
3.2.1 Estructuras iniciales de la proteína ApoE.....	57
3.2.2 Obtención de las estructuras proteicas para estudios de pH.....	60
3.2.3 Comparación entre las proteínas ApoE3 y la ApoE4 a pH7 .....	61
3.2.4 Comparación entre las proteínas ApoE3 y la ApoE4 a pH5 .....	66
3.3 Efecto del pH en la estructura del $\beta$ -amiloide.....	70
3.4 Acoplamiento Molecular.....	74
3.4.1 Análisis energético de los complejos a pH7 .....	75

3.4.2 Análisis energético de los complejos a pH5 .....	78
4. Conclusiones .....	82
5. Recomendaciones .....	84
6. Referencias Bibliográficas .....	85



## Siglas y abreviaturas

- ◆ ApoE: Apolipoproteína E
- ◆ ApoE: Gen de la Apolipoproteína E
- ◆ APP: Proteína Precursora Amiloidea
- ◆ A $\beta$ : Péptido Beta Amiloide
- ◆ BFE: Energías libre de enlace
- ◆ DFT: Teoría Funcional de la Densidad
- ◆ DM: Dinámica Molecular
- ◆ EA: Enfermedad de Alzheimer
- ◆ FDA: Administración de medicamentos y alimentos (*Food and Drug Administration*)
- ◆ GROMACS: *Groningen Machine for Chemical Simulations*
- ◆ LDL: Lipoproteína de baja densidad
- ◆ Minsa: Ministerio de Salud
- ◆ MM/PBSA : Aproximación de Poisson-Boltzmann
- ◆ MM: Mecánica Molecular
- ◆ NPT: Número constante de partículas, volumen y temperatura.
- ◆ ns: Nanosegundos
- ◆ NVE: Número constante de partículas, volumen y energía.
- ◆ NVT: Número constante de partículas, volumen y temperatura.
- ◆ OPLS: Campo de fuerza, Potenciales optimizados para simulaciones de líquidos (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*)
- ◆ PBC: Condiciones Periódicas de Contorno
- ◆ PDB: Banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*)
- ◆ Rg: Radio de giro
- ◆ RMN: Resonancia Magnética Nuclear
- ◆ RMSD: Desviación cuadrática media
- ◆ RMSF: Fluctuación cuadrática media

- ◆ SASA: Área de superficie accesible al solvente
- ◆ SNC: Sistema Nervioso Central
- ◆ UniProtKB: Base de conocimientos de recursos universales de proteínas (*Universal Protein Resource Knowledgebase*)
- ◆ VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad
- ◆ VMD: Dinámica Molecular Visual (*Visual Molecular Dynamics*)



## Resumen

El Alzheimer es una enfermedad que afecta la memoria, las funciones ejecutivas y el lenguaje, siendo la forma más común de demencia. Diversos estudios muestran que la proteína ApoE está relacionado con la amiloidosis y en particular, la isoforma ApoE4 es considerada como uno de los factores genéticos de mayor riesgo en el desarrollo de la enfermedad. En este trabajo de tesis se presenta los resultados obtenidos de la investigación realizada sobre el efecto que tiene el pH en las estructuras e interacciones de la ApoE4, el  $\beta$ -amiloide y la heparina, utilizando herramientas de la química computacional. En esta investigación se analizó la afinidad energética que tiene el péptido de  $\beta$ -amiloide, en su isoforma de 42 residuos, con la ApoE4 y se propone a la heparina como fármaco candidato a tomar en cuenta para tratamientos que ayuden a paliar la enfermedad. La elección de la heparina para este estudio se debe a que esta molécula tiene asociada gran cantidad de propiedades terapéuticas entre las que destacan sus propiedades anticoagulantes, modulación de diversas proteasas y actividad antiinflamatoria. Para solventar los objetivos planteados, se usaron diversas metodologías que consistieron en la optimización y estabilización de las estructuras mediante métodos de Dinámica Molecular (ApoE3, ApoE4 y  $\beta$ -amiloide) y de química cuántica (heparina). Además, se realizaron acoplamiento moleculares entre la ApoE4 y el  $\beta$ -amiloide como de la ApoE4 y la heparina a pH5 y pH7. Finalmente se realizó el análisis energético de estas interacciones haciendo uso de la metodología MM/PBSA. Los resultados mostraron que a pH7 la ApoE4 es menos estable, más compacta y tiene una mayor fluctuación que la ApoE3. Mientras que a pH5, la ApoE4 tiene una mayor vibración estructural y una lenta convergencia con respecto a la ApoE3. En el estudio de sus propiedades electrostáticas a pH7 ambas estructuras mostraron una mayor proporción de zonas nucleofílicas, mientras que a pH5, ambas proteínas ApoE mostraron una mayor proporción de zonas electrofílicas. Con respecto al  $\beta$ -amiloide, se evidenció que ésta es una estructura que estabiliza rápidamente a pH7, mientras que a pH5 la fluctuación es alta. En ambos pH's su compactación fue alta. En el caso de las superficies electrostáticas se observó que a pH7 las interacciones del  $\beta$ -amiloide con las zonas electrofílicas son más fuertes, mientras que a pH5 el  $\beta$ -amiloide está más dispuesto a interactuar con estructuras electrostáticas. A partir del análisis energético de los complejos analizados, se observó que a

pH7 la heparina puede ser un fármaco capaz de bloquear los sitios de interacción del  $\beta$ -amiloide pudiendo impedir la interacción directa con la ApoE4. Mientras que a pH5 la heparina sigue siendo afín a la estructura de la ApoE4, presentando energías que pudieran competir en los cuatro sitios de interacción analizados, lo cual nos indica que la heparina representa una buena opción para posibles tratamientos contra el Alzheimer.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer, dinámica molecular, apolipoproteína E,  $\beta$ -amiloide



## Abstract

Alzheimer's disease is a disease that affects memory, executive functions and language, being the most common form of dementia. Several studies show that the ApoE protein is related to amyloidosis and in particular, the ApoE4 isoform is considered one of the major genetic risk factors in the development of the disease. This thesis work presents the results obtained from the research carried out on the effect that pH has on the structures and interactions of ApoE4,  $\beta$ -amyloid and heparin, using computational chemistry tools. In this research, the energetic affinity that the  $\beta$ -amyloid peptide, in its 42-residue isoform, has with ApoE4 was analyzed and heparin is proposed as a candidate drug to be taken into account for treatments to help alleviate the disease. The choice of heparin for this study is due to the fact that this molecule has a large number of therapeutic properties associated with it, including its anticoagulant properties, modulation of various proteases and anti-inflammatory activity. In order to solve the proposed objectives, several methodologies were used, consisting of the optimization and stabilization of the structures by means of Molecular Dynamics (ApoE3, ApoE4 and  $\beta$ -amyloid) and quantum chemistry (heparin) methods. In addition, molecular couplings were performed between ApoE4 and  $\beta$ -amyloid as of ApoE4 and heparin at pH5 and pH7. Finally, the energetic analysis of these interactions was performed making use of the MM/PBSA methodology. The results showed that at pH7 ApoE4 is less stable, more compact and has a greater fluctuation than ApoE3. While at pH5, ApoE4 has a greater structural vibration and slower convergence with respect to ApoE3. In the study of their electrostatic properties at pH7 both structures showed a greater proportion of nucleophilic zones, while at pH5, both ApoE proteins showed a greater proportion of electrophilic zones. With respect to  $\beta$ -amyloid, it was evidenced that this is a structure that stabilizes rapidly at pH7, whereas at pH5 the fluctuation is high. At both pH's its compaction was high. In the case of electrostatic surfaces it was observed that at pH7 the interactions of the  $\beta$ -amyloid with the electrophilic zones are stronger, while at pH5 the  $\beta$ -amyloid is more willing to interact with electrostatic structures. From the energetic analysis of the complexes analyzed, it was observed that at pH7 heparin

can be a drug capable of blocking the interaction sites of the  $\beta$ -amyloid and preventing direct interaction with ApoE4, whereas at pH5 heparin continues to be similar to the ApoE4 structure, presenting energies that could compete in the four interaction sites analyzed, which indicates that heparin represents a good option for possible treatments against Alzheimer's disease.

**Keywords:** Alzheimer's disease, molecular dynamics, apolipoprotein E,  $\beta$ -amyloid



# Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un tipo de demencia progresiva que afecta a la memoria, las funciones ejecutivas, el lenguaje, el comportamiento, la orientación y el juicio. La EA es la forma más común de demencia, que representa el 60-70 por ciento de los casos en todo el mundo, según la OMS<sup>1</sup>. América Latina tiene la mayor prevalencia de esta enfermedad entre los adultos mayores, con un 8,5%<sup>2</sup>. En 2040, se espera que el número de casos de EA en América Latina alcance los 7,3 millones, un número similar al de Canadá y Estados Unidos<sup>3</sup>. Aunque los datos de Perú son limitados, los estudios muestran una tasa de prevalencia del 6,85% entre los adultos mayores de 65 años y una tasa de incidencia del 17,7% por 1000 personas por año<sup>4,5</sup>. Según el Ministerio de Salud (Minsa) y EsSalud, más de 200000 personas mayores de 60 años tienen EA, con más mujeres (61%) que hombres (39%) que sufren de ella<sup>6,7</sup>. En el mundo, la EA se calcula que es responsable del 4,9% de las muertes en personas mayores de 65 años, con un riesgo que aumenta con la edad, alcanzando el 30% en los hombres mayores de 85 años y el 50% en las mujeres<sup>8</sup>.

A pesar del deseo genuino de incluir las enfermedades crónicas en las estrategias de salud global, incluso en Perú, las enfermedades neurodegenerativas y las demencias no reciben una alta prioridad en países donde la percepción económica es baja, como los países de América Latina<sup>9</sup>. Sin embargo, enfermedades como la EA y el Parkinson causan los mayores costos económicos y sociales, tanto para la familia del paciente como para los gobiernos que no priorizan la detección temprana y la investigación<sup>10</sup>.

Por otro lado, dado que no existe ningún fármaco que pueda detener el progreso de esta enfermedad, existe un gran interés en comprender la función de la proteína ApoE4 en los cambios estructurales del  $\beta$ -amiloide que conlleva a la formación de las placas amiloideas. La EA también se acompaña de una respuesta inflamatoria que contribuye a cambios irreversibles en la viabilidad neuronal y la función cerebral, y la evidencia acumulada respalda el papel fundamental del complemento y los sistemas de contacto en su patogénesis y progresión<sup>11</sup>. La complejidad de la patología de la EA proporciona numerosos objetivos potenciales para las intervenciones terapéuticas.

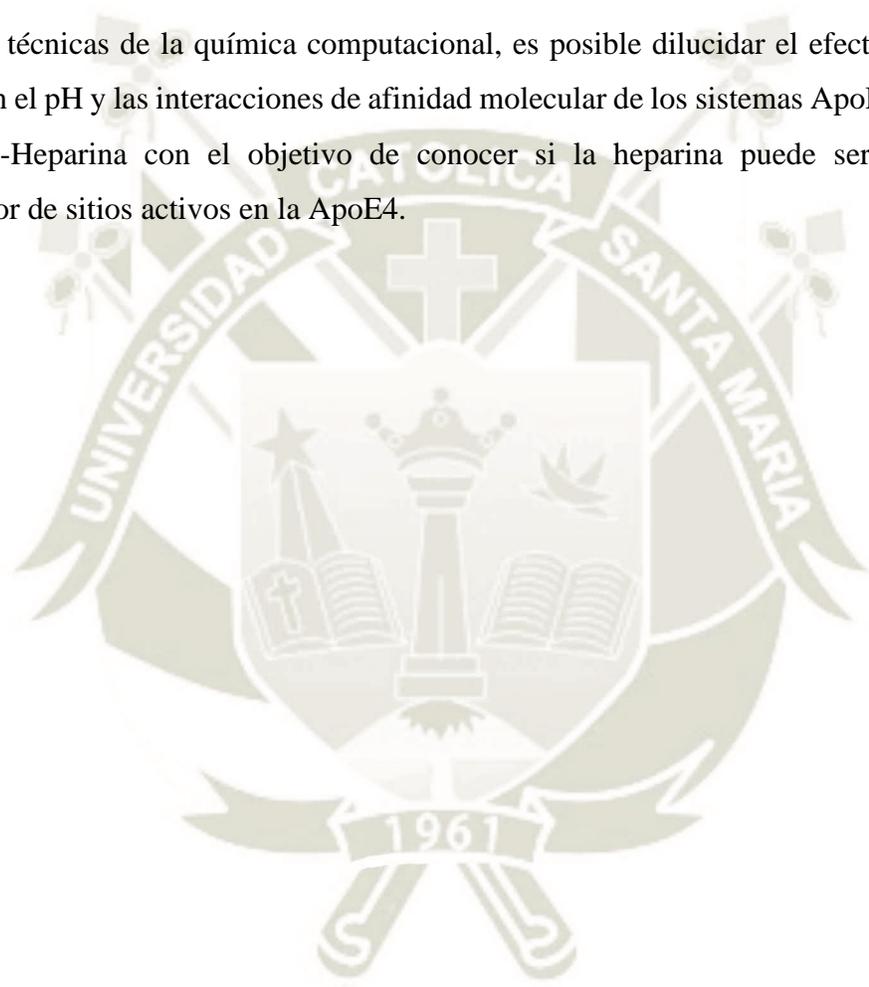
Numerosos estudios han relacionado a los sistemas de complemento y de contacto en el desarrollo y progresión de EA. Debido a la complejidad de la patogenia de AE es que existen varios objetivos potenciales para su tratamiento.

La heparina, una mezcla de glucosaminoglicanos que se usa actualmente en la profilaxis y el tratamiento de la trombosis, podría ser un candidato a considerar, debido principalmente a sus propiedades anticoagulantes, incluida su modulación de diversas proteasas y actividad antiinflamatoria<sup>12</sup>.

Además, es de vital importancia recalcar que existen limitadas investigaciones acerca del efecto del pH sobre los sitios de interacción de la APOE4 con el  $\beta$ -amiloide y de cómo es que se ven afectadas sus interacciones. Este estudio pretende dar una respuesta a estas interrogantes y plantear si la heparina, bajo estos cambios en el pH, es un candidato a tomar en cuenta para tratamientos preventivos o correctivos de los trastornos amiloides.

## Hipótesis

Mediante técnicas de la química computacional, es posible dilucidar el efecto que tiene el cambio en el pH y las interacciones de afinidad molecular de los sistemas ApoE4- $\beta$ -amiloide y ApoE4-Heparina con el objetivo de conocer si la heparina puede ser usada como bloqueador de sitios activos en la ApoE4.



# Objetivos

## Objetivo general

- Determinar el efecto que tiene el pH sobre las estructuras e interacciones moleculares de las proteínas ApoE4,  $\beta$ -amiloide y el fármaco heparina.

## Objetivos específicos

- Obtener las estructuras estables de la proteína ApoE4 y  $\beta$ -amiloide mediante técnicas de Dinámica Molecular a valores de pH 5.0 y 7.0
- Obtener la estructura y cargas atómicas de la heparina por medio de estudios de Química Cuántica.
- Realizar un análisis energético de las interacciones ApoE4 –  $\beta$ -amiloide y ApoE4 – Heparina a diferentes pH, con el fin de determinar aquellos complejos moleculares que compitan por sitios activos de la ApoE4.

# Capítulo 1

## 1. Marco Teórico

### 1.1 Enfermedad de Alzheimer

#### 1.1.1 Definición

La enfermedad de Alzheimer (EA), es un trastorno neurocognitivo siendo la causa más común de demencia. En esta enfermedad las células cerebrales mueren gradualmente, provocando un deterioro progresivo de la memoria, el pensamiento y otras funciones mentales, propiciando cambios en el comportamiento como de la personalidad e incluso la pérdida del lenguaje<sup>13,14</sup>. El riesgo de esta enfermedad aumenta significativamente después de los 65 años<sup>15</sup>.

Por otro lado, las células cerebrales del hipocampo, la región del cerebro responsable de la memoria, suelen ser las primeras en mostrar cierto deterioro en esta enfermedad. Por lo tanto, la pérdida de memoria, y especialmente la dificultad para recordar la información recién aprendida, suele ser el primer signo de enfermedad<sup>16</sup>.

En las primeras etapas los síntomas de la demencia pueden ser mínimos, pero a medida que la enfermedad se va extendiendo a otras áreas y va adquiriendo un efecto creciente en el cerebro, los síntomas empeoran. En primer lugar, se genera un daño en las funciones ejecutivas y después se presentan alteraciones en el lenguaje y la memoria semántica, lo que genera la aparición de la apraxia constructiva e ideomotora lo que implica áreas como lo son las occipitoparietales y las occipitotemporales, lo que va deteriorando y agravando la situación del paciente<sup>13</sup>.

### 1.1.2 Aproximación histórica a la enfermedad de Alzheimer

Médicos y filósofos, tanto de la antigua Grecia como de Roma, asociaron a la vejez con un debilitamiento de la mente, pero no fue hasta 1901 que el psiquiatra alemán Alois Alzheimer notó un caso de esta enfermedad la cual posteriormente recibió su nombre<sup>17</sup>.

Este primer caso fue el de una mujer de 51 años llamada Auguste Deter quien mostro un comportamiento que era incontrolable. Asimismo, su memoria disminuyó dado que ya no recordaba como cocinar u otras actividades que normalmente realizaba con regularidad, tenía problemas para escribir y se pudo observar una gran alteración de su conversación habitual. Otro síntoma observado fue una desorientación grave, es así que esta paciente ingresa al hospital psiquiátrico de Frankfurt en 1901, siendo atendida en primer momento por Alois Alzheimer<sup>17</sup>.

Alois Alzheimer, fue quien supervisó la atención a esta paciente, estudió su informe y analizó el progreso detallado. En un primer momento, él diagnosticó este caso como una demencia presenil, pero después de esto y conforme el tiempo pasaba, observó que, a pesar de los comportamientos agresivos, de llanto fuerte hacia los demás y de quejas por parte de Auguste, en algunos momentos ella se comportaba de forma cortés y amable con las personas que la rodeaban. Al pasar el tiempo, el comportamiento de Auguste se deterioró dado que empezó a murmurar para sí misma, ya no podía realizar tareas y dependía de otras personas para poder realizar algunas actividades habituales como lo era el comer. Es así que Alzheimer registró este proceso, describiendo estos síntomas como discapacidad social psicológica, delirio, alucinación y un trastorno cognitivo progresivo<sup>18</sup>.

Después de ello, Auguste perdió toda capacidad cognitiva, asimismo padeció una septicemia y una neumonía llevándola a la muerte en 1906 a los 55 años, el cerebro de esta paciente fue llevado, junto con sus registros médicos, a Múnich para que fuera analizado por Alois Alzheimer inmediatamente.

Posteriormente, Alzheimer detectó a través de la biopsia, que la corteza cerebral estaba más delgada de lo normal, y que la región que realizaba la función de controlar tanto la memoria,

el lenguaje, juicio y pensamiento estaba afectada de forma muy grave. Del mismo modo, se pudo observar un engrosamiento y adherencia extremadamente característicos de las fibrillas intracelulares (filamentos delgados ubicados dentro del nervio, músculo y algunas otras células), con la formación de figuras especiales en forma de ovillos<sup>17,18</sup>.

Después del análisis realizado por Alzheimer, él informó los resultados que había obtenido, los que incluyeron tanto síntomas como la biopsia que había realizado a Auguste, en la 37ª conferencia de psiquiatría. Alzheimer publicó este trabajo de investigación, en donde se denominó como enfermedad de Alzheimer, en un libro publicado por Kraepelin en 1910<sup>18</sup>.

Es así que, transcurridos los años, aparecieron descripciones más similares en la literatura médica en donde los autores de estas investigaciones ya hacen uso de este término de enfermedad de Alzheimer, lo que indica la gran relevancia del estudio realizado por Alois Alzheimer. En gran parte del siglo XX, esta enfermedad se diagnosticó en pacientes con una edad de 45 a 65 años y se evidenció que las manifestaciones clínicas como patológicas de las demencias, tanto senil como presenil, son casi idénticas por lo que el diagnóstico se empezó a realizar independientemente de la edad<sup>17,18</sup>.

Finalmente, como resultado de las investigaciones realizadas en la genética molecular en 1984 se descubre la presencia de la proteína Amiloide evidenciándose que era una constituyente de las placas seniles. En el año de 1987 se descubre a la Proteína Precursora Amiloidea (APP). En 1991 se encontró el gen de la APP en el cromosoma 21, la cual constituye una mutación en la enfermedad de Alzheimer, en este mismo año se hace una publicación con respecto a la relación que hay entre las proteínas Tau y los ovillos neurofibrilares. En el año de 1993 se evidencia en las placas seniles y los ovillos neurofibrilares la presencia de lo que era la Apolipoproteína E, específicamente su isoforma 4 que era codificado en el cromosoma 19. Posteriormente, en el año de 1995 se descubre la presencia de la mutación del gen S182 (Presenilina 1) como del gen STM2 (Presenilina 2) los cuales se los relacionan con esta enfermedad<sup>19,20</sup>.

### 1.1.3 Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una de las principales causas de demencia en la vejez y la edad senil. Caracterizada por una pérdida gradual de las capacidades mentales (memoria, habla, pensamiento lógico), está asociada con la edad y su prevalencia e impacto se ha visto incrementado a nivel mundial. Un estudio muestra que existe un aumento en países en vías de desarrollo, principalmente en América Latina, el cual menciona que el riesgo de desarrollar EA aumenta después de los 65 años en un 7.1%<sup>21</sup>.

En el Perú, el más reciente estudio publicado de su epidemiología fue en el año 2019, el cual se realizó en una clínica geriátrica en la ciudad de Huancayo, Departamento de Junín. En este estudio se analizó a una población de estudio de 382 personas adultas mayores de 60 años, las cuales contaban con una emisión de su certificado notarial de salud mental para el diagnóstico de demencia. Entre 2016 y 2017, estos pacientes ingresaron a su primera consulta con un diagnóstico de demencia, para lo cual se determinó la gravedad y la funcionalidad. Para el descarte de la demencia este fue realizado por un médico geriatra y para el descarte de la funcionalidad se realizaron los tests neuropsicológicos de Pfeiffer, índice de Katz (evalúa la funcionalidad del adulto mayor en las actividades básicas para la vida diaria, ABVD) e índice de Lawton y Brody, (evalúa la capacidad funcional en las actividades instrumentales de la vida diaria, AIVD)<sup>22</sup>.

En este estudio se pudo determinar que la prevalencia de demencia fue de 9.9%, en actividades básicas de la vida diaria, asimismo hubo un 19,4% que presentaba una dependencia parcial, un 23% de dependencia severa en las actividades instrumentales de la vida y finalmente se observó un 11% de deterioro cognitivo leve en la población analizada<sup>22</sup>. (cuadro1)

Tabla 1. Prevalencia y características de funcionalidad de 382 adultos mayores atendidos en una clínica geriátrica durante los años 2016 – 2017, Huancayo, Perú<sup>22</sup>

	(%)	IC al 95%
Estimación de la prevalencia de demencia (n=382)	(9,9)	(6,94 -12,94)
	(n)	(n)
Deterioro cognitivo (n=382)		
Sin deterioro cognitivo	289	(75,7)
Deterioro cognitivo leve	42	(11,0)
Deterioro cognitivo moderado	28	(7,3)
Deterioro cognitivo grave	23	(6,0)
Demencia (382)		
No	344	(90,1)
Si	38	(9,9)
(ABVD)* (n=382)		
Independencia	285	(74,6)
Dependencia parcial	74	(19,4)
Dependencia total	23	(6,0)
(AIVD)* (n=382)		
Independencia	196	(51,3)
Dependencia leve	15	(3,9)
Dependencia moderada	83	(21,7)
Dependencia severa	88	(23,0)

## 1.1.4 Patogenia de la Enfermedad

### 1.1.4.1 Beta amiloide

La teoría predominante de la aparición de la Enfermedad de Alzheimer (EA) en la actualidad es la "hipótesis amiloide", según la cual la proteína amiloide juega un papel importante en el funcionamiento de las neuronas. Sin embargo, en la EA la Beta-amiloide ( $A\beta$ ), comienza a depositarse en los tejidos cerebrales, formando placas que destruyen las células cerebrales, esto se debe al aumento de la producción de residuos de aminoácidos del péptido  $A\beta$  ( $A\beta_{40}$ -

A $\beta$ 42), lo cual conduce a la pérdida de las conexiones sinápticas de las neuronas en el hipocampo, la corteza y las regiones subcorticales del cerebro.

La acumulación de este péptido A $\beta$  tiene un efecto neurotóxico dentro del cerebro<sup>23</sup>. En primer lugar, el péptido A $\beta$  se produce a partir de la proteólisis de la Proteína Precursora Amiloidea (APP), el cual se transporta desde el aparato de Golgi hasta el axón o puede ser también hacia un compartimiento endosómico del cuerpo celular. Posteriormente la APP es dividida por la  $\alpha$ -secretasa en donde produce tanto un fragmento sAPP $\alpha$  que se difunde, como también otra parte se reinternaliza en los endosomas generando de esta forma el A $\beta$ , posterior a esta proteólisis este endosoma se recicla en la superficie celular generando una liberación tanto de la A $\beta$  como de la sAPP $\beta$ <sup>24</sup>.

Después de este proceso, se produce diferentes péptidos A $\beta$  en donde la A $\beta$ 40 es la especie predominante, mientras que A $\beta$ 42 es uno de los componentes principales de las placas seniles, por lo que este péptido A $\beta$ 42 es el más propenso a la agregación y más neurotóxico que A $\beta$ 40 dado que se oligomeriza auto ensamblándose en oligómeros tóxicos metaestables<sup>25</sup>. Esto genera tanto un daño a las neuronas como en el proceso de sinapsis, lo que ocasiona que haya una ausencia de la comunicación neuronal, causando una neurodegeneración gradual en áreas cerebrales susceptibles en especial aquellas áreas responsables tanto de la memoria como de la función cognitiva. Es importante mencionar que estos oligómeros A $\beta$  siguen asociándose independientemente con otros monómeros y oligómeros A $\beta$  los cuales en su mayoría toman la apariencia de una estructura fibrilar característica del Beta Amiloide. De modo que, esta estructura se acumula como placas seniles tanto en el sistema límbico como en la corteza asociativa generando estos efectos tóxicos neuronales. Este también puede ser debido a través de un mecanismo de apoptosis provocada por el efecto oxidativo de la A $\beta$  y en especial del péptido A $\beta$ 42 como por las especies truncadas, oxidadas e insolubles de A $\beta$  que son causantes de esta toxicidad<sup>26</sup>.

#### **1.1.4.1.1 Estructura**

El beta amiloide es un péptido cuya longitud varía entre 39 y 43 aminoácidos, es un resultado del metabolismo de la proteína precursora amiloide (APP). La APP es una proteína de

membrana con una porción extracelular amino-terminal larga y una sección intracelular carboxilo-terminal corta. El gen APP tiene 18 exones y presumiblemente produce una familia de al menos 8 isoformas transmembrana que se distinguen por los exones 7, 8, 9 y 15. Las isoformas neuronales de APP (695, 714, 751 y 770 aa) con el exón 15 son más amiloidogénicas y emiten más péptido  $\beta$ A (42) que las isoformas no neuronales. La APP se encuentra en numerosas células y tejidos del cuerpo, incluidas las neuronas, las células del músculo liso vascular y las placas. A pesar de muchas investigaciones, el papel de la APP en la célula sigue sin estar claro. Se plantea la hipótesis de que actúa como receptor de las proteínas G de la membrana, enviando señales químicas al interior de la célula. Se sabe que su expresión aumenta durante el estrés celular, pero se desconocen los procesos que causan este aumento o su relevancia para el desarrollo de las enfermedades<sup>27</sup>.

Por otro lado, en la enfermedad de Alzheimer hay una asociación directa entre ApoE4 Y Beta Amiloide. El mapeo de epítomos muestra que los residuos 13-17 del Beta Amiloide y los residuos 144-148 en la porción N-terminal del dominio de unión al receptor de ApoE interactúan<sup>28</sup>. El estudio de Nguyen también encontró que el Beta Amiloide tiene un dominio de unión a heparina en los residuos 12-17 que puede estar involucrado en la interacción de glicosaminoglicanos<sup>29</sup> (Fig 1.1).

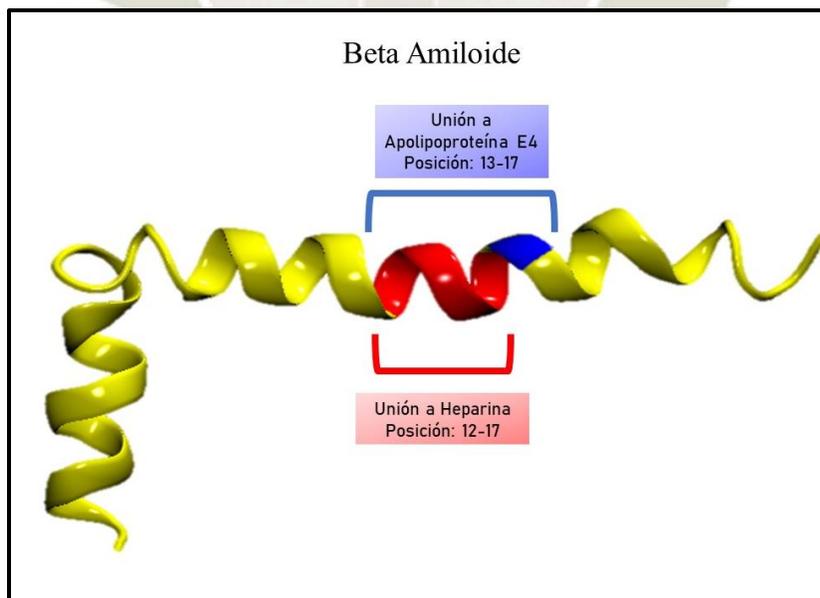


Fig 1.1 Estructura del Beta Amiloide en su conformación tridimensional. Elaboración propia

#### 1.1.4.2 Tau

La hipótesis Tau, el crecimiento y desarrollo de las células cerebrales requiere un suministro regular de nutrientes y si la proteína tau, que es responsable de transportar estas sustancias a las células, deja de funcionar normalmente, las células no reciben alimento y, como resultado, mueren. Es así que, según la patogénesis de la EA sugiere que las alteraciones en el metabolismo de la proteína tau asociada con los micro túbulos conducen a su acumulación y agregación interrumpiendo el transporte axonal y se desarrollan cambios neurodegenerativos en el sistema nervioso central<sup>30</sup>. Del mismo modo, esta proteína Tau da una estabilidad y estructura a los micro túbulos, los cuales son esenciales en la estructura de las células neuronales y son las responsables de poder generar al neurotransmisor denominado Acetilcolina. Este neurotransmisor permite la generación de una adecuada comunicación neuronal favoreciendo la sinapsis, por lo que al verse dañada tanto la Tau como los micro túbulos todo este proceso se ve alterado dañando el proceso de sinapsis en la neurona<sup>31</sup>.

#### 1.1.4.3 Apolipoproteína E

Las Apolipoproteínas son un grupo de proteínas que conforman a las lipoproteínas, este funciona tanto en el transporte de lípidos y del metabolismo de los mismos, esto lo realiza actuando como un ligando para aquellos receptores de las lipoproteínas de baja densidad, una vez realizada dichas interacciones, se inicia la toma y degradación de aquellas lipoproteínas las cuales conducen posteriormente al uso del colesterol favoreciendo del mismo modo la regulación del metabolismo intracelular de éste<sup>32</sup>. La apolipoproteína E (ApoE), que se encuentra en el cromosoma 19, es el principal transportador de colesterol en el sistema nervioso central (SNC), que incluye el cerebro y la médula espinal. La ApoE es producida por los astrocitos, que son células del sistema nervioso central que funcionan para suministrar colesterol a las neuronas. Las neuronas son células del sistema nervioso que reciben y transfieren información, lo que nos permite recibir y responder a la información sensorial<sup>33,34</sup>.

El gen ApoE tiene tres alelos o versiones diferentes: E2, E3 y E4. Las mutaciones del ADN provocaron la aparición de estos polimorfismos de ApoE. Los alelos en los genes son

causados principalmente por una mutación de un solo nucleótido o de una letra. Estas mutaciones se conocen como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)<sup>35</sup>.

Si bien dos letras en un gen pueden parecer insignificantes, pero los alelos ApoE tienen un impacto sorprendente en el riesgo de una variedad de enfermedades, como Alzheimer, Aterosclerosis y Malaria. Se sabe, por ejemplo, que el estado del alelo ApoE es un factor de riesgo genético significativo para la enfermedad de Alzheimer. De hecho, las variaciones en el alelo ApoE podrían representar la diferencia entre un riesgo 20 veces mayor de poder desarrollar esta enfermedad en comparación con el promedio.

En el Alzheimer la ApoE4 es uno de los principales factores de riesgo genético, dado que esta isoforma disminuye la protección o aumenta la toxicidad neuronal en comparación con la ApoE2 y la ApoE3. Se ha demostrado a través del estudio precedido por Mahley, la relación que existe entre la ApoE4 en la enfermedad de Alzheimer, que se traduce como un factor que favorece a la neuropatología, dado que en investigaciones realizadas en ratones se ha podido observar que la ApoE4 exógena causa la apoptosis, la pérdida de lisosomas y genera una mayor alteración a la membrana en comparación con la ApoE3<sup>36</sup>. Esto se debe principalmente a que la ApoE4 experimenta una división proteolítica en mayor grado que la ApoE3, por lo que aquellos fragmentos que se generaron a partir de este proceso presentan truncamientos C-terminales los cuales escapan de la vía secretora y proceden a entrar al citosol. Estos en su mayoría son neurotóxicos, es así que estos fragmentos son producidos en particular por una serina proteasa similar a la quimiotripsina por lo cual estos fragmentos se van acumulando con la edad, generando una neuropatología asociada a ApoE4 deteriorando el aprendizaje y la memoria<sup>37,38</sup>.

Por otro lado, los fragmentos de ApoE generados se encuentran en mayor medida en las mitocondrias y en estructuras filamentosas parecidas a una maraña neurofibrilar que presentan también a la tau fosforilada. Se ha observado también que las anomalías citoesqueléticas asociadas con ApoE4 podrían estar relacionadas con la localización de fragmentos dentro de las inclusiones filamentosas. Para que la ApoE tenga estos efectos perjudiciales tiene que tener una estructura mínima de ApoE requerida que contenga la región de unión al receptor (aminoácidos 136 - 150) y la región de unión de lípidos (aminoácidos

244 - 272), esta región de unión a lípidos al ser hidrófoba es la responsable de la neurotoxicidad como de la disfunción mitocondrial<sup>39</sup>.

#### 1.1.4.3.1 Estructura

Las células del parénquima hepático generan ApoE, al igual que los astrocitos en el SNC, y otros tejidos como el bazo, pulmón, glándulas suprarrenales, ovario, riñón y músculo.

ApoE está conformado por 299 aminoácidos, tiene 62% de hélices alfa, 9% de hojas beta, 11% de giros beta y 18% de estructuras aleatorias. Tiene dos dominios, un dominio amino terminal de 22 kDa (1-191) y un dominio carboxi terminal de 10 kDa (216-299). Una región bisagra conecta estos dominios entre los residuos 165-215. El dominio amino-terminal es rica en residuos básicos cargados positivamente (arginina), lo que facilita las interacciones electrostáticas entre el receptor de ApoE básico y el ácido LDL-R. El sitio de unión al receptor se encuentra entre los residuos 136-150 en el dominio amino-terminal. Sin embargo, el dominio carboxi-terminal se une a los lípidos<sup>40</sup>.

En cuanto a sus isoformas principalmente podemos mencionar a las Apolipoproteínas E3 y E4, ambas proteínas de 34,15 kDa, varían en un aminoácido. La posición 112 de ApoE4 es arginina, mientras que la posición 112 de ApoE3 es cisteína. ApoE4 es el factor de riesgo clave para el Alzheimer de aparición tardía, pero ApoE3, la variante más prevalente, no lo es. Las secuencias de los dominios N- y C-terminales son estructuralmente distintas, pero secuencialmente cercanas. Estas áreas también están cerca de las regiones de unión a lípidos y una región implicada en la interacción de forma de monómero de ApoE a peso molecular superior. Por lo que en la investigación realizada por Friden menciona que estas áreas pueden tener un impacto en la función de ApoE4 más que en la función de apoE3<sup>41</sup>.

Con respecto a los sitios de unión en los cuales la ApoE4 tiende a unirse son: En los sitios 158 a 168 se une a LDL ( lipoproteínas de baja densidad ) y otros receptores de lipoproteínas, en los sitios 162 a 165 como los sitios 229 a 236 tiene tendencia a unirse a heparina, en los sitios 210 a 290 se une a lípidos y lipoproteínas, en los sitios 266 a 317 son aquellos lugares que participan en la homooligomerización, finalmente en los sitios 278 a 290 este es uno de sus lugares específicos de unión con VLDL (lipoproteína de muy baja densidad)<sup>42</sup>(Fig. 1.2).

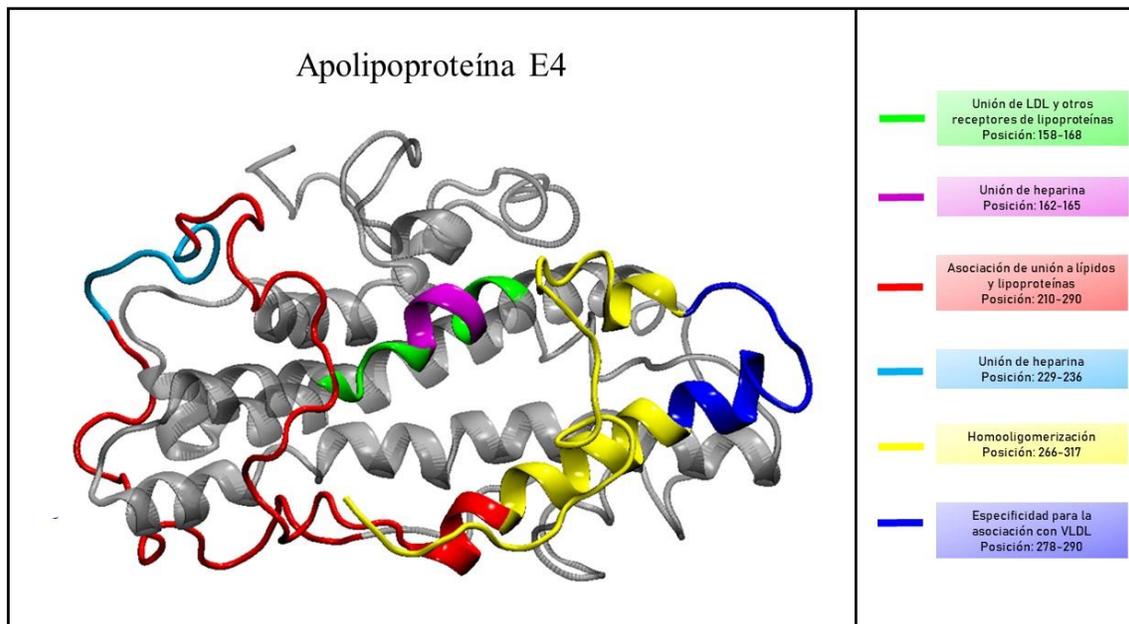


Fig. 1.2 Estructura tridimensional de la Apolipoproteína E4 y sus sitios de unión. Elaboración propia

### 1.1.5 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Alzheimer

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Alzheimer van a depender de la etapa en la que se encuentre la enfermedad. Éstas se clasifican ya sea en una pre demencia, demencia temprana, moderada o grave. Por este motivo es más difícil detectar los signos del deterioro cognitivo, dado que unos de los síntomas iniciales de esta enfermedad suelen ser problemas menores a la memoria y las personas le atribuyen a la edad o a la fatiga. Asimismo, la patología se va a ir caracterizando constantemente por el aumento de los síntomas a través del tiempo.<sup>43,44</sup>

La Tabla 2 muestra las etapas de esta enfermedad y las manifestaciones clínicas que se dan en cada una de ellas.

Tabla 2. Etapas de la Enfermedad de Alzheimer y sus síntomas

<b>Etapas de la enfermedad</b>	<b>Manifestaciones Clínicas</b>
<b>Pre demencia</b>	Deterioro cognitivo básico. Es difícil para el paciente memorizar información nueva, existen problemas menores para reproducir lo que escuchó o leyó. El intervalo de tiempo entre las primeras manifestaciones de demencia y la confirmación del diagnóstico es de 7-8 años <sup>43</sup> .
<b>Demencia temprana</b>	El deterioro de la memoria se vuelve más obvio, es difícil atribuirlo a cambios en el cuerpo debido al envejecimiento. Las funciones mnemotécnicas se degradan a diferentes velocidades. La memoria a corto plazo es la que más sufre. Al mismo tiempo, los recuerdos inconscientes se conservan casi en su totalidad. Aparecen los primeros signos de alteraciones en la percepción auditiva, visual y táctil del mundo circundante <sup>43,44</sup> .
<b>Demencia moderada</b>	El paciente se enfrenta a importantes limitaciones en la capacidad de realizar acciones independientes. Los trastornos del habla y la orientación espacial se vuelven claramente visibles. El paciente comienza a usar las palabras incorrectas en el habla, el significado de las frases a menudo se distorsiona. Hay una pérdida gradual de la capacidad de escritura y lectura <sup>43</sup> .
<b>Demencia severa</b>	Las habilidades del habla del paciente se pierden casi por completo. Se conserva la capacidad de pronunciar palabras sueltas o frases individuales. Durante algún tiempo, el paciente puede mantener un contacto emocional con las personas que lo rodean. Las personas con demencia se vuelven apáticas. La agresión puede ser otra manifestación de la enfermedad de Alzheimer grave. Se vuelve imposible realizar cualquier acción por su cuenta. <sup>43,44</sup>

### 1.1.6 Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

El diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer se basa en los síntomas del paciente y los resultados de varias pruebas y procedimientos que se utilizan para descartar otras causas de demencia. El médico examina el historial médico personal y familiar del paciente antes de realizar pruebas neuropsicológicas para evaluar la memoria, las habilidades del lenguaje y otras habilidades cognitivas. Las tomografías computarizadas y las resonancias magnéticas se utilizan con frecuencia para buscar evidencia de traumatismos, neoplasias malignas y accidentes cerebrovasculares, así como cambios atróficos en el cerebro que ocurren a medida que avanza la enfermedad.<sup>45,46</sup>

Desafortunadamente, no existen pruebas de laboratorio que puedan usarse para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en personas que aún están vivas. El único método confiable para confirmar la presencia de la enfermedad es un análisis histológico post-mortem de una parte del cerebro. La enfermedad de Alzheimer está marcada por placas seniles y ovillos neurofibrilares, según los patólogos. Debido a que las placas y los ovillos ocurren naturalmente a medida que las personas envejecen, la muestra se compara con una muestra de control de tejido cerebral normal de una persona de la misma edad que no tiene la enfermedad de Alzheimer.<sup>46</sup>

La etapa preclínica de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la ausencia de deterioro cognitivo, pero se pueden detectar cuerpos amiloides en el cerebro. La aparición de biomarcadores en la neuroimagen es un precursor de la demencia 10 a 15 años antes de su aparición. Esta etapa se destaca para ayudar a orientar la investigación hacia el diagnóstico temprano de la afección. El deterioro cognitivo moderado debido a la enfermedad de Alzheimer es la presencia de cambios leves en la memoria y la capacidad de pensamiento que no interfieren con las actividades diarias.<sup>47</sup>

### 1.1.7 Tratamiento

Hasta la actualidad, no se ha desarrollado ningún tratamiento que pueda detener o revertir de manera confiable el proceso incipiente de depósito de amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Después de ser diagnosticada con la enfermedad de Alzheimer, las personas tienen una esperanza de vida que varía de 3 a 11 años.

El tratamiento básico moderno permite compensar la deficiencia de acetilcolina en el cerebro (con medicamentos donepezil, rivastigmina, galantamina) y proteger a las neuronas de daños adicionales en una etapa grave (con memantina)<sup>48</sup>. Los medicamentos deben tomarse constantemente durante mucho tiempo, los cursos de tratamiento, que son habituales para muchos, son ineficaces y solo desacreditan los medicamentos. El tratamiento permite a los pacientes permanecer independientes en la vida diaria durante más tiempo, suspender y ralentizar la tasa de deterioro de las funciones cerebrales superiores. La ingesta continua de medicamentos básicos reduce el riesgo de muerte en un 38% durante los próximos 5 años, ralentiza la tasa de progresión en un 30%. Si transferimos estos cálculos estadísticos a la vida, entonces esta desaceleración da de 2 a 5 meses adicionales de estado relativamente estable por año. Es decir, cuanto antes se inicie el tratamiento con fármacos básicos, mejor será el nivel inicial de memoria, atención, orientación, pensamiento, y, por lo tanto, mayor será el período de independencia del paciente en la vida cotidiana. Las medidas adicionales para ayudar a los pacientes pueden ser: tomar vitamina E, corregir el tratamiento concomitante (cancelar o reemplazar medicamentos que agravan el deterioro de la memoria), antidepresivos, garantizar la seguridad del paciente (incluido el control de la ingesta de alimentos y medicamentos), nutrición médica especial, terapia ocupacional, proporcionar actividad física, tratamiento de los trastornos del sueño<sup>49,50</sup>.

A medida que avanza la enfermedad de Alzheimer, la capacidad de pensar disminuye y el comportamiento se altera más. La persona puede volverse muy pasiva y tiene la necesidad de tener ayuda con el cuidado personal y la higiene. Pueden aparecer alucinaciones, agresión. Es posible que se requieran medicamentos antipsicóticos en esta etapa.

### 1.1.7.1 Fármacos aprobados por la FDA

En la actualidad la FDA (*Food and Drug Administration*) solo ha autorizado cinco medicamentos para tratar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. En 2014, se autorizó un nuevo medicamento, Namzaric el cual constituye una combinación de medicamentos colinérgicos y de depleción de glutamato (donepezil y memantina). Los cinco medicamentos funcionan de dos maneras. Uno es la inhibición de la colinesterasa, que ralentiza el Alzheimer al prevenir la degradación de la acetilcolina. Entre estos medicamentos se encuentran donepezil (Aricept), rivastigmina (Exelon) y galantamina (Razadyne). El otro es la memantina (Namenda), un bloqueador de canales de NMDA (N- metil- D- aspartato) no competitivo que reduce la actividad del glutamato, que es vital en el aprendizaje y la memoria al unirse al receptor de NMDA. La excitotoxicidad mesotelial es causada por la afluencia sostenida de  $Ca^{2+}$ , particularmente a través de receptores extra sinápticos, siendo la memantida un inhibidor de este proceso.<sup>51</sup>

### 1.1.7.2 Heparina como tratamiento alternativo

La heparina es una combinación de glicosaminoglicanos siendo usualmente usado para prevenir y tratar la trombosis. Además, la heparina tiene efectos antiinflamatorios y moduladores de proteasas. Podemos mencionar también que las reacciones inflamatorias conducen a alteraciones permanentes en la supervivencia neuronal y la función cerebral por lo que los factores vasculares tienen un papel importante en la etiología de la demencia senil. La alteración endocrina, los proteoglicanos endógenos y las placas seniles y los ovillos neurofibrilares conducen a una mayor lesión neuronal. Por lo que, la inhibición competitiva de la acumulación de antiinflamatorios y proteoglicanos puede ayudar a las neuronas a recuperarse. De esta forma, la heparina y oligosacáridos similares son antiinflamatorios e impiden el ensamblaje de proteoglicanos, lo que los convierte en potenciales agentes neuroprotectores.<sup>52</sup>

Los principios de la producción de oligosacáridos de heparina para el tratamiento de la demencia senil son bastante intrincados. Se sabe que los proteoglicanos, la inflamación y las

anomalías vasculares tienen un papel en la génesis de la enfermedad de Alzheimer. Se cree que este fármaco actúa interfiriendo con las anomalías de amiloide y tau inducidas por proteoglicanos que se producen en esta enfermedad. Investigaciones recientes muestran que las heparinas de bajo peso molecular y oligosacáridos similares pueden reducir la toxicidad de tau asociada a proteoglicanos en el cerebro de rata<sup>51,53</sup>.

Se sabe que la inflamación juega un papel en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Aunque las heparinas y las heparinas de bajo peso molecular tienen importantes propiedades antiinflamatorias, no está claro si los glicosaminoglicanos de bajo peso molecular también las tienen. Un estudio reciente encontró que la heparina y oligosacáridos similares reducen la neurotoxicidad mediada por beta-amiloide en las células PC12, lo que indica un vínculo entre la anti inflamación y la promesa terapéutica de la Heparina en la EA. Estos efectos pueden ser debido a los efectos inhibidores de la heparina sobre mediadores inflamatorios como el sistema del complemento, L-selectina, P-selectina y fosfolipasa A2<sup>54</sup>.

## **1.2 Influencia de la Heparina en el Alzheimer**

### **1.2.1 Interacción Heparina-ApoE**

La ApoE es un factor de riesgo genético importante en las enfermedades cardíacas y neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer. La interacción de ApoE con proteoglicanos de heparán sulfato es fundamental en la captación de los remanentes de lipoproteínas y, en consecuencia, en el desarrollo de la aterogénesis y la enfermedad de Alzheimer, entre otros<sup>55</sup>.

La interacción entre la heparina y la ApoE4 se evidenció a través de una caracterización de la cinética en la que se determinó tanto las constantes de velocidad de asociación y disociación lo cual se utilizó para comprender los eventos en la superficie de una célula dado que muchas interacciones receptor / ligando no ocurren en equilibrio. Se pudo determinar que el mecanismo de unión de la ApoE a la heparina es un proceso de dos estados que implica una unión secuencial y un cambio conformacional, por lo que cuando una proteína se une a

la heparina, puede inducir un cambio en la conformación dentro de la heparina y/o la proteína<sup>55</sup>.

Asimismo, se pudo encontrar que la unión de ApoE con la heparina consiste en 2 pasos. Una unión inicial rápida la cual consiste en una interacción polar y una interacción relativamente lenta no polar. Por otro lado, el tipo de interacción más dominante entre la heparina y las proteínas es iónico y se pudo observar que los grupos de residuos básicos en las proteínas forman pares de iones con grupos ácidos definidos espacialmente en la heparina. De hecho, el modelado molecular de la interacción entre el sitio de unión de heparina de ApoE y el fragmento de heparina sugirió que ocho residuos polares, contactan directamente con grupos sulfato o carboxilo en la cadena de heparina<sup>56</sup>.

### **1.2.2 Interacción Heparina- Beta Amiloide**

La heparina se ha postulado como un fármaco viable debido a sus diversos impactos en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, incluidas posibles interacciones competitivas con proteoglicanos, efectos vasculares, interacciones con serpinas y actividades antiinflamatorias. Al ser la enfermedad de Alzheimer una enfermedad caracterizada por la presencia de placas amiloides en el cerebro con Alzheimer y al estar compuesto principalmente por péptidos  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) de 40 y 42 residuos, se ha podido evidenciar que el heparán sulfato de los proteoglicanos desempeña un papel en la formación y estabilidad de la placa amiloide. Del mismo modo, se ha demostrado que la enoxaparina es tan capaz como la heparina de atenuar la neurotoxicidad y la actividad proinflamatoria de  $A\beta$ <sup>57</sup>.

En el estudio precedido por Nguyen se realizó la caracterización de la interacción por Resonancia Magnética Nuclear de heparina y derivados con la beta amiloide, observando que la unión de  $A\beta$  por heparina y oligosacáridos derivados de heparina depende del pH mediado por interacciones electrostáticas y hay una contribución entrópica significativa a la energía libre de unión. Esta unión disminuye a medida que disminuye el tamaño del oligosacárido derivado de heparina<sup>57,58</sup>.

### **1.3 Influencia del pH**

#### **1.3.1 El pH en las enfermedades neurovasculares**

El pH es uno de los factores que pueden influir tanto en la aparición como en los cambios fisiopatológicos que se producen en aquellos pacientes que presentan la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Se ha observado que la influencia del pH cerebral en las enfermedades neurovasculares es debido a que el plegamiento de las proteínas como la actividad enzimática presentan una alta sensibilidad a los cambios de pH<sup>59</sup>.

Por otro lado, en el estudio realizado por Blennow el cual a través de la espectrometría de masas pudo evaluar los niveles de pH luego de una administración de histidina en pacientes con Alzheimer y otras demencias. Pudo concluir que no se está realmente seguro si las variaciones del pH son la base de la enfermedad de Alzheimer, pero hay diferencias de pH entre sujetos jóvenes y los ancianos. También pudo observar que el pH en los pacientes con enfermedad de Alzheimer es bajo, pero no en otras demencias, por lo que este puede ser uno de los mecanismos potenciales para poder explicar la relación que hay entre el envejecimiento del cerebro y la enfermedad de Alzheimer<sup>58</sup>.

Asimismo, es importante mencionar que la acidosis cerebral está asociada tanto con el envejecimiento como con la agregación beta amiloide y la inflamación en la enfermedad de Alzheimer<sup>60</sup>.

#### **1.3.2 Influencia del pH en el Alzheimer**

En la investigación realizada por Hari en la cual se hizo uso de células cerebrales de ratones cultivadas se determinó que una causa de la enfermedad de Alzheimer puede ser debido a un desequilibrio químico del pH. Se tienen a los denominados astrocitos los cuales permiten la eliminación de las proteínas beta amiloides de los espacios entre las neuronas, pero si este proceso de eliminación sale mal las proteínas amiloides se acumulan formando las placas amiloides características de la enfermedad de Alzheimer.

Para realizar este proceso de transporte y eliminación es necesario de los endosomas los cuales hacen uso de proteínas chaperonas que se unen a cargas específicas y realizan el transporte. Esta unión depende del nivel de pH adecuado dentro del endosoma dado que si mantiene el pH estable esto permitirá que los endosomas floten hacia la superficie y se deslicen hacia la célula, por lo que la cantidad de protones dentro del endosoma determina su pH <sup>61</sup>.

Cuando los fluidos del endosoma se vuelven demasiado ácidos, la carga queda atrapada dentro del endosoma en el interior de la célula permaneciendo dentro de los astrocitos, evitando su función de eliminar las proteínas amiloides generando su acumulación y por lo tanto la formación de las placas amiloideas. Es así que, en el estudio en células cerebrales de ratones se hizo uso de sondas sensibles al pH que eran absorbidas por los endosomas y emiten una luz de acuerdo al nivel de pH, encontrando que aquellas líneas celulares de ratón con Alzheimer tenían más endosomas ácidos en un promedio de pH de 5,37 y aquellas líneas celulares sin la variante genética de Alzheimer tenían como un promedio de 6,21 de pH <sup>61</sup>.

Es por ello que, este estudio se realizará a pH 5 para ver a través de la dinámica molecular como es que este puede influir en las diferentes interacciones APOE4 y Beta amiloide, como para poder determinar cómo es que esta interacción varía en un pH neutro de 7. Por lo cual, es que para hacer este estudio será necesario del uso de la química computacional y los métodos bioinformáticos.

#### **1.4 Química Computacional**

En la actualidad hay una gran revolución que tiene lugar en las ciencias naturales y que está asociada con la introducción generalizada de computadoras en todas las áreas de estas ciencias, tanto experimentales como teóricas. Este proceso ha sido especialmente rápido en los últimos diez años donde la producción de computadoras de alta velocidad ha aumentado significativamente y para casi todos los investigadores interesados se ha hecho posible el acceso a potentes ordenadores.

La consecuencia más importante de la introducción de las computadoras en las ciencias naturales es el surgimiento de nuevas direcciones en estas ciencias. Es así, que tanto para la física como para la química aparece una nueva forma de hacer ciencia como lo es la ciencia computacional. Anteriormente existían dos formas de adquirir conocimiento, ya sea mediante la realización de experimentos o mediante la creación de una teoría, pero hoy podemos hablar de la aparición de una tercera vía asociada al uso de las computadoras. Esta nueva vía nos permite poder realizar diversos estudios de las propiedades físicas y químicas de moléculas, átomos, radicales e iones en las fases gaseosa, líquida y sólida utilizando una computadora lo cual es la esencia de la química informática<sup>62</sup>.

Asimismo, el desarrollo de los métodos de química cuántica, mecánica molecular y modelado molecular, aunado a las enormes capacidades de las computadoras modernas, contribuyen a la creación de la química computacional como una rama independiente de la ciencia química. El poder de cálculo de la química computacional en este momento es prácticamente ilimitado, ésta permite el cálculo no solo de las moléculas individuales más complejas de estructuras monoméricas, sino también las estructuras oligoméricas y poliméricas, en particular las estructuras de varias proteínas<sup>63</sup>.

De igual forma, uno de los aportes que genera la química computacional es poder favorecer el análisis de la estructura geométrica de los compuestos, área conocida como química estructural. Los métodos experimentales más importantes para estudiar la estructura geométrica de las moléculas son la espectroscopia de emisión y adsorción, así como los métodos de difracción, donde las fórmulas estructurales reflejan la unión de diferentes átomos en una molécula entre sí, por lo que se hace necesario mostrar la estructura en forma geométrica. Este problema se vuelve aún más urgente en el estudio de los estereoisómeros por lo que para poder realizar un análisis conformacional de compuestos se requiere el uso de modelos moleculares tridimensionales<sup>64,65</sup>. Estos problemas han dado como resultado el desarrollo y la creación de una gran cantidad de paquetes de softwares diferentes los cuales han podido resolver problemas de edición de fórmulas estructurales y visualización de estructuras espaciales. Actualmente, los más poderosos softwares implementan casi todas las tareas principales de la química informática, incluida la gestión de bases de datos de compuestos químicos, métodos de química cuántica y modelado numérico como por ejemplo

Gromacs, el cual es un software que permite realizar simulaciones de dinámica molecular y minimización de energías, motivo por el cual es uno de los softwares más utilizados en la realización de esta investigación<sup>66</sup>.

#### 1.4.1 Modelado molecular

El modelado molecular es un término amplio que involucra una gran variedad de técnicas tanto teóricas como computacionales que son utilizadas para simular el comportamiento de las moléculas. Permite poder aplicar desde pequeños hasta grandes sistemas dependiendo de las estructuras químicas, este es muy usado tanto en la química computacional, diseño de fármacos, biología computacional e investigación de productos biológicos.

Existe una gran cantidad de metodologías que abordan el modelado de estructuras a escalas microscópicas, entre las más importantes están:

La aplicación de numerosos métodos teóricos para interpretar observaciones experimentales, datos sobre la estructura y reacciones de compuestos químicos como la energía de procesos involucrados con la asociación o disociación de átomos, iones y moléculas se conoce como modelado molecular. En segundo lugar, se utilizan enfoques computacionales para anticipar las estructuras cristalinas y moleculares de compuestos químicos, que se emplean para desarrollar y sintetizar nuevos compuestos y materiales biológicamente activos<sup>67</sup>.

El modelado de estructuras a escalas microscópicas se aborda mediante una variedad de enfoques, los más importantes son:

Métodos de química cuántica (ab initio). Uno de los logros más importantes de la ciencia del siglo XX es el desarrollo de la química cuántica, que se basa en la mecánica cuántica. La mecánica cuántica es ahora la teoría más general y mejor fundada de la estructura de compuestos químicos. Los cálculos moleculares (cálculos químicos cuánticos) son una de las aplicaciones más importantes de la mecánica cuántica, ya que dependen de la solución de la ecuación de Schrödinger, que derivó en 1925. La función de onda, que describe el estado del átomo, es la más importante parte de la ecuación. La ecuación de Schrödinger solo se puede resolver exactamente para el átomo de hidrógeno; para otros sistemas, la ecuación solo se

puede resolver aproximadamente<sup>68</sup>. El enfoque de campo auto consistente de Hartree-Fock-Roothaan es el método principal utilizado para aproximar la solución de esta ecuación.

Teoría funcional de la densidad: Desarrollada por Kohn y Popl en el año de 1964. Demostraron que toda la energía de un sistema puede describirse utilizando la distribución de su densidad electrónica. Teóricamente apoyaron la idea de estimar la estructura electrónica de moléculas sin resolver la ecuación de Schrödinger completa. A pesar de que los métodos modernos de química cuántica se consideran una herramienta equivalente a los enfoques experimentales o analíticos, actualmente solo se pueden aplicar a sistemas diminutos con cientos de átomos debido a su gasto informático<sup>69</sup>.

Métodos semi-empíricos: Han estado en desarrollo desde la década de 1950 y están relacionados principalmente por el alto costo de procesamiento de los cálculos químicos cuánticos. Científicos como Parr, Pople y Dewar hicieron contribuciones significativas al desarrollo de enfoques semi-empíricos. Los enfoques semi-empíricos implican parámetros derivados experimentalmente, así como considerables simplificaciones en la interpretación química cuántica de las interacciones entre los núcleos de átomos y electrones. Por ejemplo, evaluando el potencial de ionización de varios estados electrónicos mediante espectroscopia. Los resultados de los enfoques semi-empíricos están fuertemente influenciados por el sistema molecular bajo investigación<sup>70</sup>.

Mecánica molecular (MM) y dinámica molecular (DM): Una molécula se modela como un modelo mecánico extendido con un conjunto de masas puntuales colocadas en un campo de fuerza representado por un conjunto de potenciales en los cálculos de MM. Los elementos responsables de los valores de equilibrio de las longitudes de enlace, los ángulos de enlace y de torsión, así como las cargas de Coulomb en los átomos y las interacciones de dispersión de van Der Waals, están todos incluidos en los términos del campo de fuerza MM. Asimismo, en la MM también se usa conjuntos de características en los componentes del campo de fuerza que se han determinado experimentalmente. Ahora existen numerosos campos de fuerza. Los cálculos químicos cuánticos se utilizan para derivar algunos parámetros que son experimentalmente inalcanzables para los campos de fuerza<sup>71,72</sup>.

La dinámica molecular es una mezcla del campo de fuerza MM y las leyes clásicas de la dinámica newtoniana. La DM tiene la ventaja de poder evaluar la evolución de un sistema

molecular a lo largo del tiempo, a diferencia de los modelos estáticos utilizados por todos los métodos indicados anteriormente. Vale la pena señalar que los resultados de los cálculos MM y DM de las energías de interacción intermolecular, que son el desafío más crítico en el modelado molecular moderno, están fuertemente influenciados por el campo de fuerza seleccionado<sup>73</sup>.

Métodos combinados: Al analizar grandes conjuntos moleculares, es importante lograr un equilibrio entre el costo computacional y la precisión del método que se emplea. A lo largo del tiempo, los investigadores encontraron una serie de soluciones no estándar que incorporan dos o más métodos de cálculo en un solo modelo. Morokuma, por ejemplo, fue el primero en proponer el uso de un modelo cuántico-mecánico-químico-molecular "multicapa" para calcular un sistema molecular en la década de 1990<sup>74</sup>.

Actualmente se dispone de un número considerable de artículos en los que los autores mezclan la teoría de la química cuántica y la dinámica molecular de diversas formas.

#### 1.4.2 Mecánica Molecular

La mecánica molecular (MM) es un método empírico diseñado para calcular características geométricas y energía molecular<sup>75</sup>. Por lo que, basado en los conceptos y principios de la mecánica clásica, la mecánica molecular plantea la hipótesis de que la energía de las moléculas se puede representar como la suma de las contribuciones debidas a la deformación de las longitudes de enlaces, ángulos de enlace, ángulos diedros, interacciones de Van der Waals, átomos libres de valencia, términos que tienen en cuenta la interacción de los átomos (interacciones coulombicas), debido a la presencia de cargas en los átomos (Fig 1.3). De esta manera, matemáticamente un campo de fuerza se puede expresar según la siguiente ecuación:

$$[H] E_{FF} = \sum_{\text{enlaces}} E_{\text{estrechamiento}} + \sum_{\text{ángulos}} E_{\text{rotación}} + \sum_{\text{diedros}} E_{\text{torsión}} + \sum_{\text{pares}} E_{\text{noenlazantes}}$$

- El primer término, modela las interacciones entre dos átomos enlazados. Así, los incrementos de energía obtenidos cuando la distancia entre dos átomos unidos por un enlace se desvía de la distancia de referencia se modelan mediante un potencial armónico siguiendo la ley de Hooke.

- El segundo término, modela las interacciones de los ángulos entre tres átomos por un potencial armónico, que depende de la desviación en un ángulo de referencia, del ángulo y la rigidez de los enlaces.
- El tercer término modela el potencial de torsión.
- El cuarto término combina los potenciales de interacciones fuera de los enlaces donde las interacciones de Van der Waals están modelados por un potencial de Lennard-Jones y las interacciones electrostáticas están modeladas por el potencial de Coulomb.

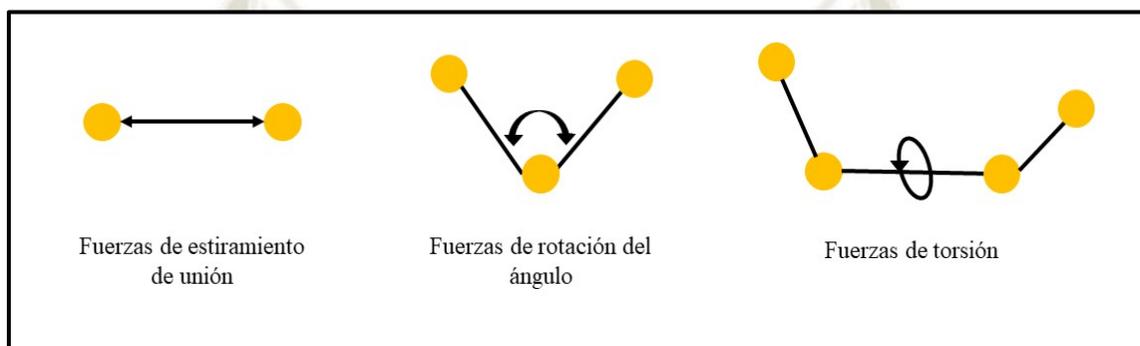


Fig1.3 Representación gráfica de las fuerzas de estiramiento de unión, fuerzas de rotación del ángulo y fuerzas de torsión. Elaboración propia

### 1.4.3 Dinámica molecular

La dinámica molecular (DM) es un método para determinar la evolución temporal de un conjunto de átomos que interactúan integrando las ecuaciones de Newton que gobiernan su movimiento; ésta es una herramienta poderosa para encontrar las trayectorias de movimiento de los átomos. Asimismo, ésta es una ventaja significativa ya que permite el estudio de detalles minuciosos en el movimiento de los átomos a través de los distintos softwares empleados, como VMD o UCSF CHIMERA. De manera similar, la DM es un potente complemento para los cálculos y experimentos teóricos, ya que la escala de simulación puede acercarse a decenas de miles de átomos en una computadora y el período de simulación es del orden de nanosegundos<sup>76</sup>.

### 1.4.3.1 Ensamblajes

El ensamblaje canónico (NVT y NPT) y el ensamblaje microcanónico (NVE) se utilizan en dinámica molecular para describir la mecánica estadística. Aunque se puede simular hacer uso de estos ensamblajes utilizando diferentes herramientas, como el termostato Berendsen o el termostato Nosé-Hoover. El ensamblaje más utilizado se basa en un número fijo de partículas (N) con un volumen (V) a una temperatura dada (T).<sup>77</sup>

#### 1.4.3.1.1 Ensamble NVE

El NVE (número constante de partículas, volumen y energía), también conocido como conjunto microcanónico, se obtiene resolviendo la ecuación de Newton sin ningún control de temperatura o presión. Cuando se crea este ensamblaje, se conserva la energía. Sin embargo, siempre hay una pequeña variación de energía debido a errores de redondeo y truncamiento a lo largo del proceso de integración. Como resultado, las energías potencial y cinética están medio paso fuera de sincronía en cada paso de tiempo. Incluso si el cambio en las energías cinéticas con un intervalo de medio tiempo es menor, contribuye a la fluctuación energética general<sup>78</sup>.

#### 1.4.3.1.2 Ensamble NVT

La fase de equilibrio inicial, NVT (número constante de partículas, volumen y temperatura), sirve para estabilizar la temperatura del sistema. Este ensamblaje también se conoce como "canónico" o "isotérmico-isocórico". El tiempo requerido para este procedimiento varía según la composición del sistema, pero en NVT, la temperatura del sistema debe alcanzar una meseta particular. Será necesario tiempo adicional si la temperatura aún no se ha estabilizado<sup>79</sup>.

#### **1.4.3.1.3 Ensamble NPT**

La segunda fase de equilibrio, NPT (número constante de partículas, presión y temperatura), es responsable de mantener la presión del sistema (y por lo tanto la densidad). Bajo esta disposición, donde el número de partículas, la presión y la temperatura son constantes, se logra el equilibrio de presión. Este ensamble también se conoce como el conjunto "isotérmico-isobárico", ya que imita de cerca las condiciones experimentales. La temperatura y la presión se pueden regular utilizando esta configuración de temperatura constante y presión constante. La presión se cambia alterando el volumen de los vectores de celda unitaria. Este ensamble también se puede utilizar para alcanzar la temperatura y la presión correctas durante el equilibrio antes de cambiar al ensamble de volumen constante o energía constante cuando comienza la recopilación de datos<sup>80</sup>.

#### **1.4.3.2 Integradores**

##### **1.4.3.2.1 *Steepest descent***

Es uno de los algoritmos más simples y mejor conocidos para minimizar una función. La teoría de la convergencia es la base para comprender este algoritmo el cual es sofisticado y conocido. La observación principal es que la dirección de este algoritmo se puede utilizar con un tamaño de paso diferente que puede mejorar sustancialmente la convergencia.<sup>81</sup>

##### **1.4.3.2.2 Integrador MD**

El integrador MD predeterminado en Gromacs es el llamado algoritmo de salto de rana para la integración de las ecuaciones de movimiento. Cuando se requiere una integración extremadamente precisa con el acoplamiento de temperatura y / o presión, los integradores de velocidad Verlet también están presentes y pueden ser preferibles. El algoritmo de salto de rana usa posiciones y velocidades en determinado tiempo.<sup>82</sup>

### 1.4.3.3 Campo de fuerza

Los campos de fuerza se utilizan para determinar las interacciones entre los átomos que provocan el movimiento en las simulaciones tradicionales de dinámica molecular (DM). Los campos de fuerza se componen de funciones de energía potencial emparejadas simplificadas con parámetros relacionados que varían según el tipo de átomo. Se han establecido varios campos de fuerza, cada uno con su propio conjunto de cualidades, como general, engrosamiento, precisión, propiedades ajustables y el conjunto de moléculas empleadas durante la optimización. El campo de fuerza OPLS-AA es uno de ellos.<sup>83</sup>

#### 1.4.3.3.1 OPLS-AA

El campo de fuerza OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) es un campo de fuerza creado para el estudio de proteínas y ácidos nucleicos. La principal distinción es que incluye parámetros de interacción no enlazantes que se derivaron cuidadosamente mediante simulaciones de Monte Carlo, por lo que este campo de fuerza es capaz de caracterizar mejor las simulaciones que incluyen el solvente y las interacciones no vinculantes son vitales en estas simulaciones.<sup>84</sup>

#### 1.4.3.4 Teoría Funcional de la Densidad

La teoría funcional de la densidad (DFT) es una teoría de la mecánica cuántica, que se utiliza para calcular con precisión varias propiedades físicas de los materiales. Estos estudios se extienden desde la construcción de funciones exactas de intercambio-correlación hasta la predicción de configuraciones moleculares y electrónicas de átomos, moléculas, complejos, entre otros.<sup>85</sup>

Esta teoría se basa en la ecuación de Schrodinger para un sistema de muchos cuerpos, que puede reducirse a la ecuación de Kohn-Sham, una ecuación de Schrodinger independiente de

una sola partícula que se puede resolver numéricamente usando la teoría de la función de densidad. Las propiedades físicas de los sólidos son producidas por este proceso computacional; sin embargo, esta idea se basa en la densidad de electrones más que en las funciones de onda. La DFT se fundó en los teoremas de Hohenberg, Kohn y Sham, que establecían que la funcionalidad de la densidad de carga electrónica en el estado fundamental (no degenerado) de un problema de muchos cuerpos puede definir adecuadamente todas las características en ausencia de campo magnético<sup>86</sup>.

#### 1.4.3.5 Cargas *Hirshfeld*

Para poder analizar cuantitativamente cómo se distribuye la carga en los diferentes subsistemas al formarse el enlace entre ellos, se ha empleado el método de las cargas de *Hirshfeld* dado que brinda una alta confiabilidad y una fuerte concordancia entre sus resultados. La integral de la densidad ponderada con un factor de peso igual al cociente entre la densidad de carga inicial no perturbada y la superposición de la suma de las densidades atómicas es la carga de *Hirshfeld* de un átomo. Se puede interpretar como asignar de la densidad para cada átomo la parte que corresponde al átomo en cuestión; esta parte que le corresponde queda determinada por el factor de peso<sup>87</sup>.

#### 1.4.3.6 Condiciones periódicas de contorno

Las condiciones de contorno periódicas (PBC) permiten considerar un "cubo" de espacio pequeño donde está presente la molécula bajo investigación. Las moléculas dentro del cubo experimentan cambios conformacionales a lo largo del tiempo moviéndose dentro del espacio, pudiendo de esta forma cruzar los límites del cubo<sup>88</sup>. Lo esencial del método es que el espacio se divide en cubos idénticos, asumiendo que el contenido de los cubos es el mismo y que los límites de los cubos están en contacto. Una molécula entra en otro cubo cuando cruza el borde de uno, pero la molécula idéntica entra en el primer cubo por el lado opuesto. En este caso, sólo se simula la dinámica de uno de estos cubos (Fig 1.4)<sup>88,89</sup>.

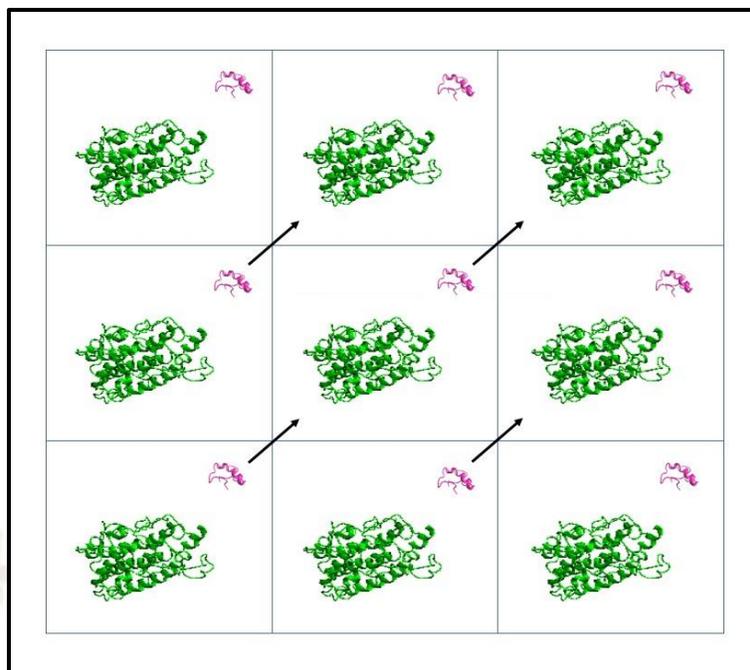


Fig 1.4 Condiciones periódicas de contorno. Elaboración propia

#### 1.4.4 Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular es una técnica de modelado molecular que predice la orientación y posición más adecuadas para la creación estable de una molécula en relación con otra. Este acoplamiento se logra mediante una variedad de algoritmos basados en la idea de que una proteína se fija en el espacio y luego gira a su alrededor de varias maneras. Simultáneamente, se realizan cálculos estimados basados en la función estimada para cada configuración de giros; esta evaluación de la función se basa en la evaluación de superficies complementarias, interacciones electrostáticas y repulsión de Van Der Waals <sup>90,91</sup>.

De manera similar, con el uso de varios cálculos, el conocimiento de la orientación proyectada puede utilizarse para pronosticar la afinidad de los enlaces entre dos moléculas. Este acoplamiento se utiliza con frecuencia para anticipar la afinidad y la actividad de los medicamentos de molécula pequeña en relación con una macromolécula que, en este caso, actúa como receptor y, por lo tanto, juega un papel esencial en el diseño de fármacos <sup>92</sup>.

Es bien sabido que el impacto terapéutico de la mayoría de los medicamentos depende de la regulación de los procesos bioquímicos. Los fármacos (ligandos) a menudo operan sobre proteínas receptoras intracelulares o de membrana (incluidas las cascadas de amplificación) al unirse al sitio de reacción de la proteína. Es factible examinar las interacciones ligando-receptor y seleccionar el ligando requerido usando técnicas como el acoplamiento molecular. Como resultado, el acoplamiento permite una aceleración significativa en el desarrollo de nuevos medicamentos, porque los métodos computarizados pueden clasificar cientos de variantes de medicamentos en una computadora en un solo día, seleccionar la variante más exitosa y solo entonces proceder a la experimentación y verificación de la serie seleccionada<sup>93</sup>.

#### 1.4.5 Minimización de energía potencial

La minimización de energía potencial implica la aplicación de métodos numéricos para encontrar conformaciones de baja energía del sistema molecular. Para determinar los mínimos locales de energía potencial, se utilizan comúnmente métodos basados en el gradiente de energía potencial. La utilización de métodos de minimización global y el cambio en la forma de la función objetivo son los dos enfoques principales utilizados para descubrir el mínimo global. El primer enfoque emplea procedimientos que, en teoría, permiten descubrir el mínimo global de una función de muchas variables durante un tiempo de simulación ilimitado. Esto indica que tales técnicas pueden ir más allá de los mínimos locales y romper las barreras energéticas<sup>94</sup>.

Una modificación en los potenciales de interacción en sí mismos, la inclusión de términos adicionales a la función objetivo o la transferencia a un nuevo modelo de sistema molecular describen el segundo enfoque. Este último enfoque se ha utilizado mucho recientemente y se cree que es muy prometedor. Su concepto es fijar las longitudes y ángulos de los enlaces y explicar los movimientos conformacionales de la molécula modificando los ángulos de torsión. Este enfoque puede minimizar drásticamente el tamaño del problema y la cantidad de tiempo que lleva resolverlo. Aunque se ha demostrado que la reducción de las coordenadas cartesianas e internas conduce a conformaciones distintas en algunos casos<sup>95,96</sup>.

El método de minimización de energía potencial se utiliza para resolver problemas prácticos (por ejemplo, el refinamiento de estructuras basado en análisis estructural de rayos X y datos de espectroscopia de RMN bidimensional) y problemas teóricos (por ejemplo, para estudiar el plegamiento de proteínas y predecir las estructuras de complejos enzima-sustrato)<sup>95,96</sup>.

#### **1.4.6 La desviación cuadrática media (RMSD)**

Uno de los métodos más comunes para evaluar el cambio en la conformación de una macromolécula de proteína es el cálculo de la desviación estándar (RMSD). Este parámetro se utiliza en el análisis de trayectorias de dinámica molecular con el fin de establecer el tiempo del sistema y registrar cambios conformacionales tan significativos en la estructura de la proteína como el plegamiento o la desnaturalización. El RMSD se calcula entre la posición inicial (coordenadas) del átomo y del residuo de aminoácido en la estructura al comienzo de los cálculos, luego el momento del tiempo 0, con cada uno hay una nueva coordenada posterior de los átomos correspondientes obtenido como resultado del cálculo de la dinámica molecular<sup>97,98</sup>.

#### **1.4.7 Fluctuación cuadrática media (RMSF)**

La fluctuación cuadrática media (RMSF) muestra la desviación entre la posición de la partícula en cada paso y la coordenada promediada general durante todo el tiempo de cálculo de la dinámica molecular<sup>99</sup>.

Este parámetro le permite determinar la movilidad de residuos de aminoácidos funcionalmente significativos de la estructura de la proteína. Cuanto menor sea el valor de RMSF para los átomos, menor será su movilidad y mayor será la rigidez de la estructura del complejo<sup>99</sup>.

#### **1.4.8 Radio de giro**

El radio de giro ( $R_g$ ), es una medida de la compactación de la estructura de la proteína: un valor bajo de radio de giro indica una proteína más compacta, mientras que un valor alto de

radio de giro indica una compactación más relajada. Un valor constante de radio de giro a lo largo de las trayectorias de DM indica que la estructura espacial de la proteína es estable a lo largo de la DM, mientras que las proteínas en movimiento producirían un valor fluctuante de Rg a lo largo de la trayectoria.<sup>100</sup>

#### **1.4.9 H-bonds**

En la realización de la Dinámica Molecular se hace el cálculo de lo que son los enlaces puente de hidrogeno, esto se basa en analizar estos enlaces entre todos los posibles donantes y aceptores. Para determinar si existe un enlace puente de hidrogeno, se utiliza un criterio geométrico. Asimismo, se determina todos estos enlaces existentes entre dos grupos de átomos (que deben ser idénticos o no superpuestos) o en tripletes de donante-hidrógeno aceptor especificados.<sup>101</sup>

#### **1.4.10 SASA**

El área de superficie accesible al solvente (SASA) de una proteína se define como la región de la proteína que está lo suficientemente expuesta para interactuar con moléculas de solvente cercanas. SASA es un factor decisivo en la investigación de la estabilidad y el plegamiento de proteínas, y se define por un centro hipotético de la esfera del disolvente con el contacto de Van der Waals con la superficie de la molécula.<sup>102</sup>

#### **1.4.11 Aproximación de Poisson-Boltzmann en el cálculo de energías libres (MM/PBSA)**

El MM - PBSA o denominada la aproximación de Poisson Boltzmann, según el cual la energía libre total de formación de complejos puede ser dividido en varias contribuciones. En primer lugar, la entalpía asociada a la interacción de proteínas y cambios en sus conformaciones durante la formación de un complejo, esta energía es prácticamente igual a

la energía libre correspondiente debido al cambio insignificante en la entropía conformacional. En segundo lugar, el cambio en la energía libre del sistema, asociado con la superficie de proteínas expuestas al solvente por separado y en un complejo. En tercer lugar, la energía electrostática de interacción de grupos ionizados. Por lo que, el análisis de las trayectorias en la dinámica molecular permite que cada grupo químico calcule el área de la superficie de la proteína en estudio y estime la energía de solvatación total de la macromolécula ionizada en agua pura como la suma de las energías libres de solvatación cada grupo químico individual<sup>103</sup>.



# Capítulo 2

## 2. Metodología

### 2.1. Detalles Computacionales

#### 2.1.1 Hardware

Para la realización de esta investigación se hizo uso de 4 estaciones de servicio las cuales se encuentran en el Centro de Investigación de Ingeniería Molecular (CIIM) de la Universidad Católica de Santa María. Estas estaciones cuentan con Ubuntu 20.04 de tipo 64 bits, el cual es un sistema operativo que se asegura de que los programas a utilizar tengan la capacidad de procesamiento, de memoria y cualquier otro recurso que se pueda necesitar para funcionar. Es preciso mencionar que los equipos cuentan con 62,7 GiB de memoria RAM y un procesador Intel® Xeon(R) CPU E5-2640 v3 @ 2.60GHz × 16, dos unidades de procesamiento gráfico GeForce GTX 1080 Ti/PCIe/SSE2, GNOME 3.32.1 además de un disco de 13,0 TB.

#### 2.1.2 Base de Datos

##### 2.1.2.1 UniProt

UniProt es una base de datos que proporciona un compendio completo de todos los datos de secuencias de proteínas conocidas vinculadas a un resumen de la información funcional verificada experimentalmente o predicha computacionalmente sobre cualquier proteína. Esta base de datos contiene las anotaciones de secuencia que describen regiones o sitios de interés en la secuencia de la proteína, como modificaciones postraduccionales, sitios de unión, sitios

activos de enzimas, estructura secundaria local u otras características.<sup>104</sup>. De esta manera se pudo obtener la secuencias de aminoácidos que conformaban la Apolipoproteína E las que fueron empleadas en los modelamientos.

### 2.1.2.2 PDB

Esta base de datos tiene la principal función de organizar los datos estructurales en tercera dimensión de moléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos, estas estructuras tridimensionales han sido determinadas a través de métodos experimentales tales como la cristalografía de rayos X, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear e incluso la microscopía electrónica. La búsqueda en esta base de datos puede ser ya sea por macromoléculas, por secuencia o por ligando, el archivo seleccionado va portar tanto su número de identificación PDB, el nombre de la macromolécula con la fecha de lanzamiento, el nombre de los autores, la clasificación de proteínas, el instrumento utilizado para determinar la estructura y la estructura tridimensional.<sup>105,106</sup>

Por medio de esta base de datos es que se hizo la búsqueda de la proteína Beta Amiloide y la Apolipoproteína E4, obtenida por espectroscopia de RMN, de esta forma se obtuvo su estructura tridimensional y se realizó el modelamiento respectivo por homología.

### 2.1.3 Software

Para poder realizar los análisis *in silico*, análisis como las simulaciones de dinámica molecular, el acoplamiento molecular y las energías libres, se han hecho uso de los siguientes softwares:

### 2.1.3.1 Gromacs

Este es un software libre que permite realizar simulaciones de dinámica molecular y minimización de energías, es decir éste permite calcular las ecuaciones de movimiento de Newton. Este programa ha sido diseñado para moléculas bioquímicas que tienen interacciones enlazantes como no enlazantes tanto entre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Este es un software capaz de soportar una gran cantidad de algoritmos habituales en dinámica molecular, es así que su rendimiento es alto comparado con otros programas similares y esto es debido a que es capaz de incorporar todas estas optimizaciones algorítmicas. Del mismo modo, Gromacs permite la creación de módulos o herramientas de terceros lo que potencializa su eficiencia, al grado de ser considerado como uno de los mejores en cuanto a la química computacional<sup>107</sup>. Es por todo lo expuesto, que en esta investigación es que hizo uso de este software.

### 2.1.3.2 UCSF Chimera

Este es un programa de gráficos moleculares el cual posee una gran variedad de herramientas que permite poder realizar diversos análisis de secuencias como de estructuras. Del mismo modo, este permite poder visualizar de forma interactiva las estructuras moleculares y los datos que se encuentran relacionados, como los mapas de densidad, alineamientos de secuencias, resultados de acoplamiento molecular, las trayectorias, ensamblajes conformacionales, entre otros<sup>108</sup>.

### 2.1.3.3 VMD

VMD (Visual Molecular Dynamics) es un programa que va a permitir tanto la visualización como el modelado molecular de las estructuras analizar. Asimismo, este permite poder observar y analizar aquellos resultados que se obtuvieron después de haber realizado los ensayos de dinámica molecular. Por otro lado, este programa cuenta con herramientas que

permite poder editar que se van a poder aplicar a las geometrías moleculares y controlar detalles de estos, como también permite poder realizar el análisis y las animaciones de las trayectorias de las simulaciones de dinámica molecular, como el de poder visualizar las superficies como el de sombrear las geometrías moleculares e incluso poder saber que tan transparente u opaca es la geometría molecular mostrada. Del mismo modo, este programa permite poder generar imágenes, animaciones y videos de lo que se esté realizando el estudio<sup>109</sup>.

#### 2.1.3.4 LigPlot

Este es un programa cuya finalidad es el de poder generar diagramas de interacción proteína-ligando a partir de archivos estándar de Protein Data Bank, es por ello que este programa ofrece una representación de las interacciones tanto intermoleculares como los enlaces puentes de hidrogeno e inclusive las interacciones hidrófobas de lo que se esté realizando en el análisis. Para poder realizar esta función este cuenta con la herramienta del Dimplot el cual permite a este programa poder trazar estas interacciones proteína-ligando de tal modo que este generara un diagrama que facultara poder visualizar dichas interacciones. Del mismo modo, este es un programa que puede ser utilizado para cualquier ligando por lo que tiene la capacidad de poder mostrar otros tipos de interacción entre proteínas y ácidos nucleicos<sup>110</sup>.

#### 2.1.3.5 Putty

Este es un software de código abierto el cual permite poder conectarse de forma remota y segura a otro ordenador como tomar el control del mismo a través de una terminal a través de protocolos SSH o Secure Shell<sup>111</sup>. Es a través de este software que se pudo realizar el trabajo en forma remota y permitió poder conectarnos a las maquinas del CIIM.

### 2.1.3.6 WinSCP

WinSCP es un software de código abierto cuya función es el de trabajar como un administrador de archivos, el cual permite poder copiar los archivos entre una computadora local y servidores de forma remota<sup>112</sup>. Este programa se complementó junto con el software Putty, permitiendo de esta forma la transferencia de archivos en el trabajo remoto de esta investigación.

### 2.1.3.7 ConText

ConText es un editor de textos que permite poder visualizar una gran variedad de archivos, cuenta con la capacidad de poder abrir un número ilimitado tanto de ficheros, como también no hay límite en el caso del tamaño de archivo a utilizarse, este editor tiene la ventaja de ser versátil, como también el de ser de reducido tamaño por lo cual no ocupa mucho espacio en el ordenador<sup>113</sup>.

### 2.1.3.8 APBS

APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) es un software el cual ha sido desarrollado con el objetivo de poder resolver las ecuaciones referentes a la electrostática continua para los sistemas biomoleculares, de esta forma permite generar modelos eficientes para la generación de la solvatación tanto biomolecular como electrostática. Del mismo modo, este es un software de gran eficiencia que permite poder aplicar estas teorías a estos sistemas biomoleculares conjuntamente con el servidor web PDB2PQR para poder suministrar una interfaz para la configuración, ejecución, y visualización de potenciales electrostáticos calculados por APBS<sup>114</sup>.

## 2.1.4 Servidores

### 2.1.4.1 PatchDock

Este es un servidor utilizado para realizar el acoplamiento molecular haciendo uso de algoritmos los cuales se fundamentan en los principios de complementariedad, es así que este permite poder generar la predicción de aquellos complejos de proteínas, señalando de esa forma los contactos residuo-residuo implicados en la interacción objetivo<sup>115</sup>.

### 2.4.1.2 FireDock

Es un servidor que genera un refinamiento de alto rendimiento de aquellos sitios encontrados por PatchDock. Es así que este aborda tres pasos principales para realizar este refinamiento molecular, las cuales son: La optimización de la cadena lateral, la minimización de cuerpo mínimo y por último la puntuación y clasificación de acuerdo a sus energías de enlace<sup>116</sup>.

### 2.4.1.3 AutoDock Vina

AutoDock Vina es una herramienta de acoplamiento molecular de código abierto. Mejora sustancialmente la precisión de la predicción del modo de enlace. Además, proporciona una aceleración adicional del paralelismo al emplear subprocesos múltiples en procesadores multinúcleo. AutoDock Vina produce automáticamente mapas de cuadrícula y organiza los resultados de una manera fácil de usar.<sup>117</sup>

### 2.4.1.4 I-TASSER

El servidor I-TASSER es una plataforma para la predicción automatizada de la estructura y función de las proteínas utilizando el paradigma de secuencia a estructura a función. I-TASSER produce modelos atómicos 3D utilizando numerosas alineaciones de subprocesos y simulaciones de ensamblaje de estructuras iterativas a partir de una secuencia de aminoácidos. La función de la proteína se deduce haciendo coincidir estructuralmente los modelos 3D con proteínas conocidas. Predice la estructura secundaria y terciaria, y anota los sitios de unión del ligando, los números de comisión de enzimas y las palabras de Ontología genética. La puntuación de confianza del modelo proporciona una medida de la precisión del pronóstico.<sup>118</sup>

## 2.2 Metodología

La metodología utilizada está representada con el siguiente diagrama de flujo (Fig. 2.1).

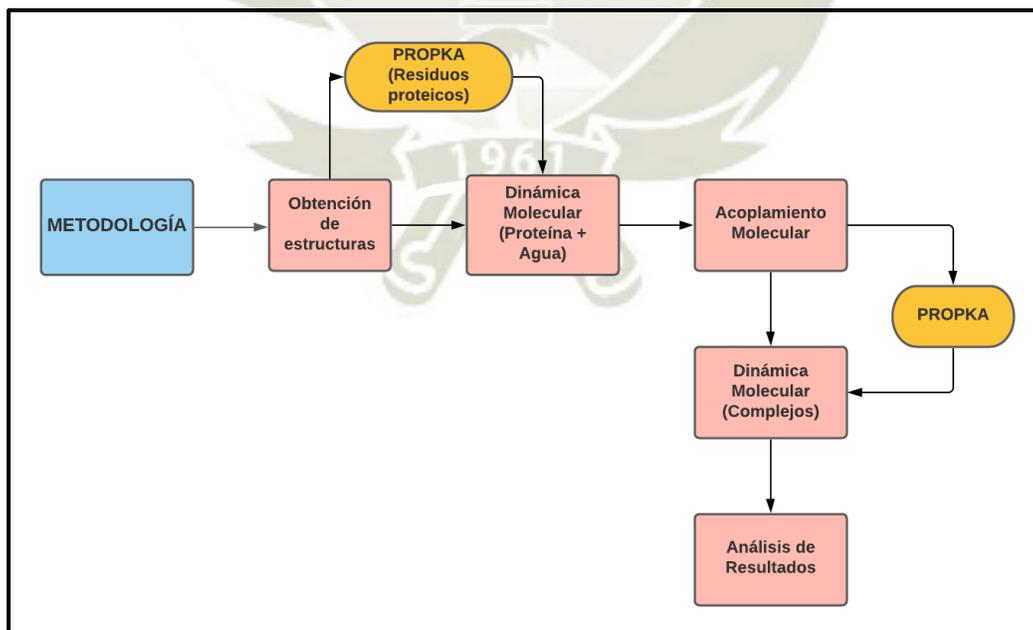


Fig. 2.1 Diagrama de flujo de la metodología utilizada. Elaboración propia

## **2.2.1 Obtención de estructuras**

### **2.2.1.1 Apolipoproteína E4**

Para la obtención de la Apolipoproteína E4 no se encontró la estructura cristalina en ningún banco de datos, por lo que se realizó la construcción del modelo tridimensional partiendo de estructuras secundarias de secuencias de aminoácidos conocidos específicamente la ApoE3.

### **2.2.1.2 Beta Amiloide**

Para la obtención de la estructura del Beta Amiloide se obtuvo su secuencia aminoacídica haciendo usos de banco de datos como el Protein Data Bank (PDB) y el National Center Biotechnology Information (NCBI) para de esta forma poder construir la estructura tridimensional de la proteína.

### **2.2.1.3 Heparina**

Para la obtención de la estructura de la Heparina se hizo uso de la base de datos denominada PubChem la cual proporciona información sobre la composición estructural tridimensional de la Enoxaparina dado que es la heparina sintética fragmentada de bajo peso molecular, haciéndose uso de ella en todo el estudio realizado.

## **2.2.2 Propka**

Una vez obtenidas las estructuras se procedió analizarlas con el uso del servidor Propka el cual posee herramientas que permitieron poder predecir los estados de protonación, es decir

nos permitió poder conocer aquellos residuos protonados según el pH que se quería analizar el cual era correspondiente de cada estructura proteica analizada y de esa forma poder hacer las simulaciones a los diferentes pH's estudiados.

### 2.2.3 Simulación de Dinámica Molecular

Se realizó la simulación de dinámica molecular de cada una de las proteínas a analizar (Apolipoproteína E4 y la Beta Amiloide) con agua. Para la realización de esta Dinámica se hizo uso del programa de alto rendimiento Gromacs con el cual se trabajó en toda la simulación. Se continuo con la selección del campo de fuerza que para este estudio fue el de la OPLS-AA/L, que permitió poder estimar las fuerzas entre los átomos dentro de las moléculas. Posterior a esto, se seleccionó el tipo de agua a utilizar que fue el TIP4P, porque es uno de los modelos que mejor representa a las propiedades del agua.

En el caso del pH 5 se insertaron aquellos residuos protonados según lo obtenido en Propka para darle la simulación correspondiente a este pH, en el caso del pH 7 Gromacs por defecto protona y desprotona a un pH neutro por lo que no fue necesario realizar el cambio de aquellos residuos protonados o desprotonados según Propka.

Se construyó una caja de simulación cuyas dimensiones aseguraban tener una distancia mínima entre la proteína y los bordes de 1nm para evitar problemas periódicos. Además, de con esto nos aseguramos que la caja sea lo suficientemente amplia que permita que las proteínas analizadas puedan moverse. Este sistema trabajado al poseer condiciones periódicas de contorno hace que las moléculas salgan por una cara de la caja y entren por el otro extremo siendo un factor determinante, es por ello que se realizó la solvatación colocando suficientes moléculas de agua rodeando nuestro sistema para evitar que los complejos no interaccionen consigo mismos.

Posterior a esto, se procedió a la adición de iones con el fin neutralizar el sistema trabajado. Después, se llevó a cabo el proceso de minimización de energía, cuyo objetivo es el de poder obtener un sistema razonable según la geometría y orientación del solvente, porque puede

haber algunos defectos como los denominados Choques Estéricos que pueden impedir que haya una adecuada dinámica molecular.

Hasta el momento se tenía un sistema dispuesto a colapsar puesto que no había una integración entre el solvente y la proteína; es por ello que se llevó a cabo la realización del equilibrio isotérmico. El equilibrio isotérmico se dio en dos fases las cuales fueron el NVT (número constante de partículas, volumen y temperatura) y NPT (número constante de partículas, presión y temperatura). Con estas dos fases se logró poder simular a la temperatura deseada que fue de 309.65 k, como también se aplicó la presión al sistema hasta que alcance la densidad adecuada.

Seguidamente se realizó la dinámica molecular propiamente dicha a 50ns para las proteínas analizadas. Al terminar las simulaciones, se procedió al cálculo de los descriptores de estructura, los cuales fueron tanto el RMSD (desviación cuadrática media), RMSF (fluctuaciones cuadráticas medias), radio de giro y enlaces de hidrogeno de los sistemas.

## **2.2.4 Acoplamiento molecular**

### **2.2.4.1 Apolipoproteína E4 – Beta Amiloide**

Para la realización del acoplamiento molecular se hizo uso de las estructuras PDB de la Apolipoproteína E4 y Beta Amiloide obtenidos previamente en la base de datos Protein Data Bank.

En primer lugar, se trabajó con el servidor PatchDock, el cual, haciendo uso de algoritmos basados en la geometría de estas estructuras, permitió poder localizar aquellas transformaciones posibles de acoplamiento que evidenciaran una adecuada complementariedad molecular. Estas transformaciones encontradas se analizaron por este servidor de forma más concienzuda a través de una función de puntuación que consideraba tanto el ajuste geométrico como la energía de solvatación atómica. Finalmente, este servidor

genero una lista de las posibles transformaciones que podría generar esta interacción, seleccionando aproximadamente las primeras 1000 soluciones producidas por este servidor.

Después, a partir de las soluciones seleccionadas anteriormente en el servidor PatchDock, se procedió a realizar el refinamiento molecular haciendo uso del servidor FireDock. Este servidor realizó una optimización completa de la cadena lateral de la interfaz con una escala de radios atómicos de menor, con el fin de reducir la cantidad de choques estéricos. Por lo que, éste las calificó a través de una función de energía dándoles una puntuación de las soluciones de acoplamiento, la penetración y el área de contacto. De esta forma se seleccionó a las primeras 10 soluciones las cuales se procedieron a realizar la correspondiente dinámica molecular para cada una de ellas.

#### **2.2.4.2 APOE4- Heparina**

Para la realización del acoplamiento molecular entre la ApoE4 - Heparina se hizo uso del programa Autodock Vina el cual es un programa anexo a Chimera UCSF y que permitió poder realizar los cálculos de acoplamiento molecular entre el receptor y el ligando. Se colocó como receptor a la ApoE4 y como ligando a la molécula de Heparina.

Para hacer este proceso se creó una caja con dimensiones adecuadas que abarquen las zonas donde se evidenciaba la interacción ApoE4-Beta Amiloide previamente analizada con el programa LigPlot que nos permitió poder saber con más detalle los residuos de aminoácidos que interaccionaban entre la ApoE4 y la Beta Amiloide. Se configuraron tanto las opciones para el receptor como para el ligando, entre otras. Para la configuración del receptor se programó para que Chimera agregue los hidrógenos, ignore las aguas y las cadenas de residuos no estándar. Para las opciones del ligando se programó para que no se fusionen las cargas, no se eliminen los hidrógenos no polares y los pares de iones. Como opciones avanzadas se configuro para que luego del acoplamiento nos diera las 10 posiciones con mayor energía de interacción.

Una vez obtenidas las 10 posiciones de mayor energía de interacción, se escogió a la de mayor energía y se procedió a realizar la dinámica molecular correspondiente.

### 2.2.5 Simulación de Dinámica Molecular de los complejos

Para la realización de la Dinámica Molecular del complejo ApoE4- Beta Amiloide a los diferentes pH's se realizó el mismo procedimiento usado con anterioridad cuando se realizó la dinámica de la interacción de las proteínas con el agua. Es decir, se trabajó con el programa de alto rendimiento Gromacs, como también se siguió haciendo uso del campo de fuerza OPLS-AA/L y el mismo tipo de agua el cual era TIP4P.

Asimismo, se construyó una caja de simulación con una distancia mínima entre el complejo de proteínas y los bordes de 1nm con el objetivo de evitar problemas periódicos. Se realizó la solvatación colocando suficientes moléculas de agua. Después se realizó la neutralización del sistema trabajo con su correspondiente minimización de energía. Posterior a esto se realizó el equilibrio isotérmico en sus dos fases tanto NVT (número constante de partículas, volumen y temperatura) y NPT (número constante de partículas, presión y temperatura). A una temperatura de 309.65 k y presión adecuada.

Finalmente se realizó la dinámica propiamente dicha a 50ns para los diferentes pH's evaluados. Al terminar dichas simulaciones, se procedió al cálculo de los descriptores de estructura, los cuales fueron tanto el RMSD (desviación cuadrática media), RMSF (fluctuaciones cuadráticas medias), radio de giro y enlaces de hidrogeno de los sistemas. Adicionalmente, se estudió la energía libre de unión mediante el método MM/PBSA con la contribución energética de cada residuo, con el objetivo de analizar la fuerza de interacción entre el complejo ApoE4-Beta Amiloide y ApoE4-Heparina.

### 2.2.6 Análisis de energías a través de la metodología de MM/PBSA

Para el análisis de la energía libre de interacción se calculó, en principio, promediando las energías de enlace para las estructuras adquiridas a partir de simulaciones de DM en aquellas zonas estables, para cada uno de los sistemas durante un intervalo de tiempo de 0,5 ns. Estas áreas se identificaron con la ayuda de gráficos RMSD con el fin de verificar que las trayectorias sean las adecuadas y de esa forma permitir estimaciones de energía más precisas.

Para cada una de las interacciones ApoE4-Beta Amiloide y ApoE4-Heparina a diferentes pH's, se obtuvieron tres componentes energéticos: la energía potencial en el vacío, energía de solvatación polar y energía de solvatación no polar. La técnica gmpbsa ofrece un script de Python (MmPbSaStat.py) que debe ejecutarse en una terminal LINUX para calcular la energía de enlace promedio, con dos archivos de salida "full\_energy.dat" y "summary\_energy.dat". En estos dos archivos se evidencian tanto lo que son las desviaciones promedio como las desviaciones estándar de los componentes de energía e inclusive la energía de enlace.

También es factible averiguar cuánto contribuye cada uno de los residuos a las energías de enlace en promedio. El script de Python MmPbSaDecomp.py se utiliza para este paso, y se generan dos archivos, uno llamado "contribenergy.dat" y el otro llamado "energyMapIn.dat", con el primero que contiene la contribución de energía de los tres términos de energía y sus valores medios, incluido su error estándar (sin desviación estándar), así como la energía de enlace para cada residuo. El segundo archivo permite a herramientas como XmGrace graficar estas energías en formato xvg. La herramienta gmpbsa utiliza los archivos pdb para mostrar la contribución de cada residuo en la interacción proteína-ligando en tres dimensiones, reemplazando la columna del factor B con las energías calculadas.

# Capítulo 3

## 3. Resultados y Discusión

La enfermedad de Alzheimer es altamente compleja y multifactorial lo que complica su diagnóstico y posibles tratamientos. De forma general, su diagnóstico está basado en la observación de una patología específica del cerebro en la cual se observa la formación de placas amiloideas extracelulares, compuestas principalmente por péptidos de beta-amiloide, y de ovillos neurofibrilares intracelulares de proteínas tau<sup>119</sup>. Actualmente, solo han sido aprobados cinco fármacos por la FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés), pero éstos son costosos y de difícil acceso a la población en general<sup>120,121</sup>. Ésta es una de las principales razones por lo que es de especial relevancia la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas o incluso, nuevos factores que sean responsables del desarrollo de la EA<sup>122,123</sup>.

Si bien, la edad es el factor de riesgo más importante para generar la EA, tener la variante  $\epsilon 4$  del gen de la apolipoproteína E (ApoE) es el factor de riesgo genético más fuerte para el desarrollo de EA conocida como de aparición tardía<sup>122-125</sup>. Más aún, existe nueva evidencia que apunta a la influencia que tiene el pH en las enfermedades neurodegenerativas como lo es la EA<sup>126-128</sup>. Un estudio reciente ha mostrado que, en los cerebros enfermos de EA, el pH era en promedio de 5.37 lo que sugiere la importancia de éste en la patogénesis de la EA, aunque aún no sea del todo claro su influencia<sup>60</sup>. Aunque se han desarrollado diversas técnicas para el estudio *in situ* de la EA (resonancia magnética o tomografía por emisión de positrones<sup>129</sup>), encontrar o dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la EA es sumamente difícil debido a lo delicado que es acceder a la zona cerebral.

Por estas razones y haciendo uso de técnicas modernas *in silico*, en este trabajo de tesis hemos analizado la influencia que tiene el pH en las estructuras de la proteína ApoE4 y del

péptido de beta-amiloide (1-42) y en varias de las interacciones cuando forman complejos moleculares. Así mismo, se analizaron las interacciones de la ApoE4 con la molécula de heparina para dilucidar si ésta es capaz de formar complejos más estables los cuales compitan energéticamente con los formados entre la ApoE4 y el beta-amiloide con la finalidad de encontrar mecanismos de inhibición de estos últimos complejos.

### 3.1 Obtención de las estructuras moleculares

Una de las primeras tareas que se realizan en el campo de la investigación teórica e *in silico* es la revisión de estructuras cristalinas de los sistemas a estudiar, si éstas existen, entonces se usarán aquellas estructuras con las mejores características de su cristal: número de residuos, resolución, análisis de Ramachandran, entre otros. Sin embargo, se puede dar el caso de que la estructura no se encuentre de forma experimental, en este caso lo que se obtiene es su secuencia aminoacídica para poder construir la estructura tridimensional de la proteína. En ambos casos, se han utilizado bancos de datos para realizar la búsqueda, tanto de la proteína ApoE4 y del péptido de beta-amiloide de 42 residuos. Bancos de datos como el *Protein Data Bank* (PDB) o el *Universal Protein Resource Knowledgebase* (UniProtKB), fueron usados para estos propósitos.

En el caso de estructuras de tamaño pequeño y de origen no proteínico, como son las moléculas de fármacos y particularmente de la heparina en este proyecto, se usan diferentes bancos de datos en los que pueden estar ya registradas sus fórmulas químicas o, en algunos casos, estructuras 2D o 3D. PubChem es un ejemplo de este tipo de servidores el cual ofrece una amplia gama de estructuras químicas y diversas características fisicoquímicas de gran utilidad para investigaciones científicas.

Una vez obtenidas las estructuras tridimensionales de los sistemas en estudio, éstas son sometidas a procesos de simulación computacional con el fin de obtener conformaciones moleculares estables, con el fin de que los análisis sean realizados sobre estructuras de mínima energía. Al tratarse de sistemas dinámicos y en continuo movimiento, estos estados energéticos nos aseguran resultados con alta probabilidad de que existan y que ocurran a las condiciones termodinámicas impuestas en las simulaciones. A continuación, se detallan los

procesos realizados en la obtención de las distintas estructuras moleculares utilizadas en este estudio.

### 3.1.1 ApoE4

La apolipoproteína E (ApoE), es una proteína formada predominantemente por estructuras secundarias del tipo  $\alpha$ -hélice, constituida por 299 aminoácidos (aa) y con tres dominios principales: la región N-terminal (aa 1-191), la región C-terminal (aa 225-299), y la región que une a éstas dos, llamada “bisagra” (aa 192-224), (Figura 3.1 a). La ApoE, en sus tres isoformas, es producida principalmente en el hígado y en el cerebro por los astrocitos, así como en las neuronas, particularmente como una respuesta a condiciones de estrés<sup>130,131</sup>. En el caso de la isoforma E4, no se encontró la estructura cristalina en ningún banco de datos ya que existen investigaciones que mencionan que a 37°C, la ApoE4 muestra una tendencia a formar agregados de alto peso molecular, lo que hace difícil su estudio por metodologías cristalográficas<sup>132,133</sup>. Debido a esto, para la construcción del modelo tridimensional a estudiar, se utilizó la secuencia aminoacídica encontrada en la base de datos UniProt con ID P02649-1, la cual es una estructura de 317 aa ya que cuenta con una secuencia señal de 18 aa<sup>134</sup>.

Una vez obtenida la secuencia, ésta se modeló tridimensionalmente haciendo uso del servidor I-TASSER, el cual usa técnicas conocidas como “*threading*” mediante las cuales, a partir de estructuras secundarias de secuencias de aminoácidos conocidos, construye las conformaciones tridimensionales de las proteínas objetivo. Entre una de sus opciones se encuentra la de asignar restricciones adicionales y *templates* o plantillas de otras proteínas que I-TASSER usará como guía en el modelamiento de las estructuras a construir. Para este estudio, la plantilla que se utilizó fue la estructura cristalina de la ApoE3, la cual se encontró en el *Protein Data Bank* con ID: 2I7b<sup>135</sup>. Esta isoforma, la cual contiene 307 aa, fue obtenida mediante técnicas de resonancia magnética nuclear y en la que los autores tuvieron que hacer modificaciones a su estructura para poder obtener monómeros capaces de cristalizar. Concretamente, las mutaciones que se hicieron a esta estructura fueron cinco, todas ubicadas en el dominio C-terminal, el cual es importante en su unión a las membranas lipídicas, estas

mutaciones fueron: F257A, W264R, V269A, L279Q y V287E. El alineamiento de las secuencias puede observarse en la figura 3.1 b).

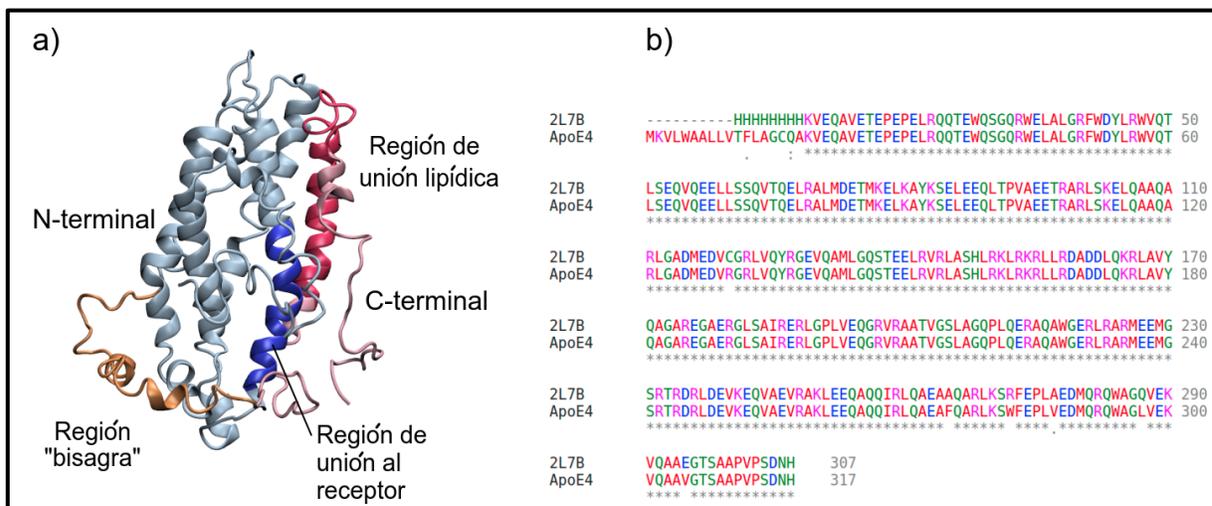


Figura 3.1 Estructura de la proteína ApoE4 obtenida por técnica de *threading* usando el servidor I-TASSER. a) Se muestran los principales dominios de la ApoE4 y las regiones de unión. b) Alineamiento de secuencias de la proteína 217b usada como *template* y la obtenida en el servidor UniProt.

### 3.1.2 $\beta$ -amiloide de 42 residuos

El mayor componente de las placas amiloideas es el péptido  $\beta$ -amiloide constituido por 42 residuos. Formado a partir de la proteína precursora amiloidea (APP, por sus siglas en inglés), la cual es una proteína de membrana que sirve como regulador en la sinapsis y plasticidad neuronal<sup>136-138</sup>. Para esta investigación, la estructura cristalina utilizada de  $\beta$ -amiloide fue obtenida por técnicas de NMR y en solución acuosa (PDB ID 1iyt)<sup>139</sup>. Esta estructura tiene dos alfa-hélices comprendidas entre los residuos 7-26 y 29-39, unidas por medio de una estructura tipo *beta-turn* (figura 3.2).

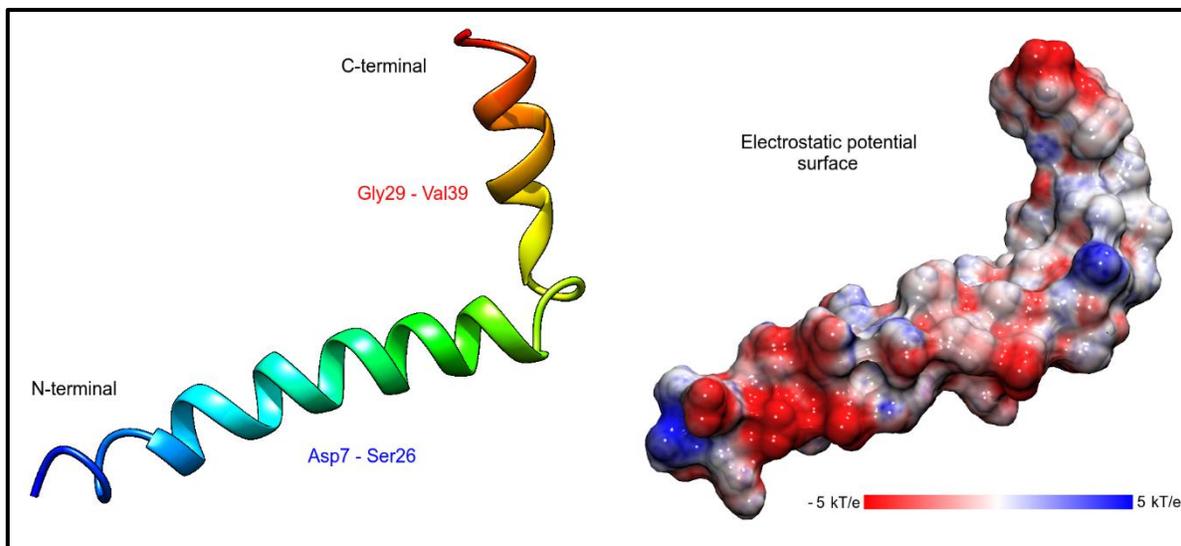


Figura 3.2 Estructura molecular del péptido de 42 residuos del beta-amiloide. Se muestra la estructura cristalina usada en el presente trabajo (PDB ID: 1iyt), la cual consta de 2  $\alpha$ -hélices. A la derecha se puede observar la superficie de energía potencial de la estructura.

### 3.1.3 Heparina (enoxaparina)

La estructura molecular de la heparina fue obtenida a partir de la enoxaparina (PubChem CID: 772)<sup>140</sup>. La enoxaparina es la heparina sintética fragmentada de bajo peso molecular (1134.9 g/mol) y cuya fórmula química es  $C_{26}H_{42}N_2O_{37}S_5$ . La estructura tridimensional se construyó utilizando el paquete de software GaussView v.6 y se optimizó mediante cálculos DFT utilizando el paquete de software Gaussian 16. El proceso de optimización se realizó utilizando la función de correlación de intercambio CAM-B3LYP y el conjunto de bases TZVP. Se realizaron cálculos de las frecuencias vibracionales para asegurar que la conformación obtenida fuera la de mínima energía. Para investigar el efecto electrostático como ligando de la ApoE4, se calcularon las cargas atómicas usando el análisis de población de Hirshfeld con efecto solvente implícito (SCRF = (SMD, Solvent = Water), y se usaron superficies de Potencial Electrostático Molecular (ESP) para visualizar la polaridad y las regiones no polares de este ligando (Figura 3.3). Para obtener sus parámetros y topologías MD, utilizamos el servidor LigParGen, que utiliza los parámetros del campo de fuerza OPLS-AA para generarlos. Estas topologías se reparametrizaron utilizando las estructuras optimizadas y las cargas atómicas obtenidas en cálculos cuánticos anteriores.

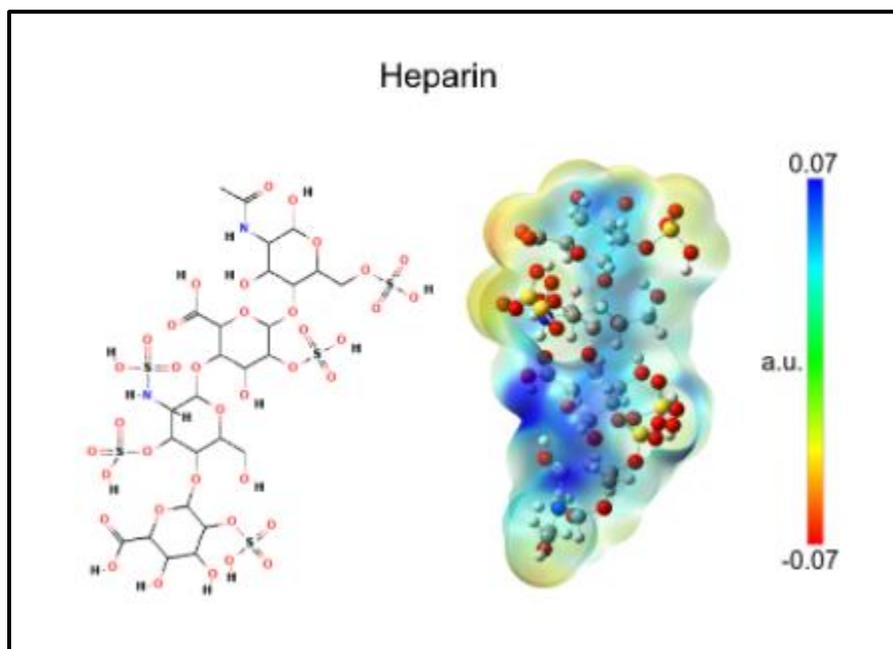


Figura 3.3 Estructura de la molécula heparina usada en el presente trabajo (PubChem ID: 772). Basada en la enoxaparina, la estructura final fue obtenida después de un cálculo cuántico usando la teoría del funcional de la densidad (DFT).

En el presente trabajo se utilizó la misma estructura y parámetros de interacción de la heparina para evaluar los distintos complejos proteína-ligando obtenidos en el acoplamiento molecular con la ApoE4 a los distintos pH evaluados.

### 3.2 Análisis de estabilidad de las estructuras aisladas

Una vez obtenidas las estructuras tridimensionales, el siguiente paso es estabilizarlas mediante simulaciones de dinámica molecular (DM), en el caso de la ApoE4 y del  $\beta$ -amiloide, mientras que para la heparina se realizaron optimizaciones utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT). Las simulaciones de DM se realizaron a 200 ns, 309.65°K de temperatura y un bar de presión.

### 3.2.1 Estructuras iniciales de la proteína ApoE

Para estudiar los cambios en la estructura de la proteína ApoE4, se realizó una comparación con la proteína ApoE3 a las mismas condiciones de simulación, recordando que esta última sirvió como *template* para la construcción de la ApoE4. La figura 3.4 muestra el alineamiento de las dos estructuras ApoE y de los distintos contactos que tiene el residuo 112 en cada una de estas estructuras, estas fueron usadas como conformaciones iniciales para los cálculos de simulación de dinámica molecular.

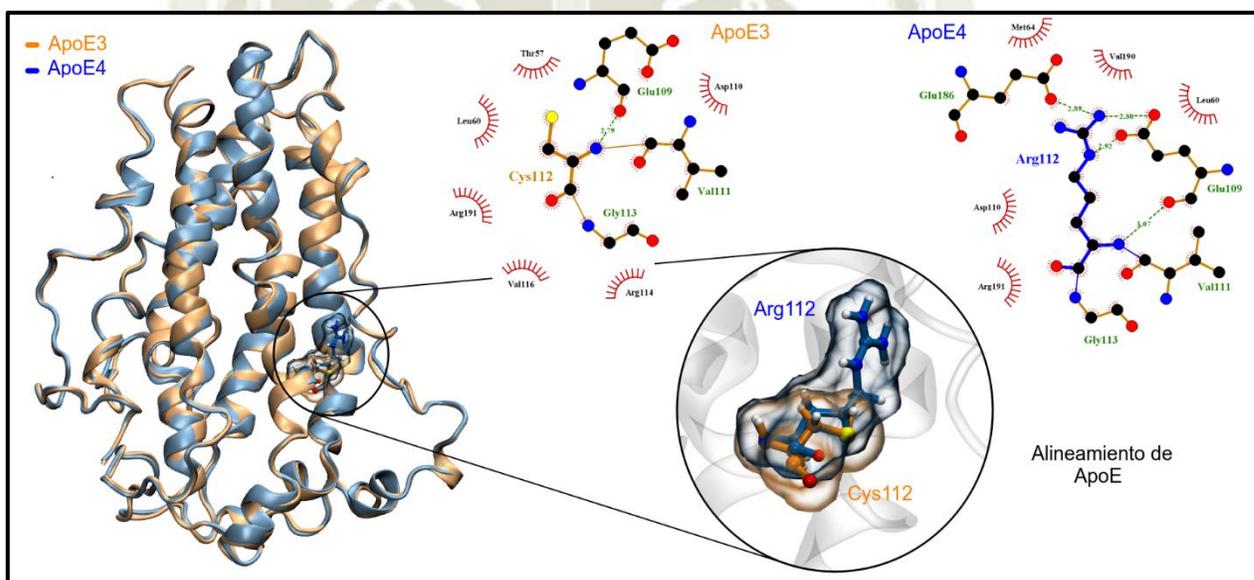


Figura 3.4 Alineamiento de estructuras de la proteína ApoE y las diferentes interacciones del residuo 112 en las proteínas.

En este alineamiento puede observarse que la cisteína, en la posición 112 (ApoE3), ocupa un menor volumen que la arginina de la ApoE4. Esta diferencia en el volumen tiene un efecto directo en las interacciones del residuo 112 con otras regiones de la proteína. En el caso de la ApoE3, las interacciones de la Cys112 son más de carácter hidrofóbico y llegan a formarse con seis residuos, Thr57, Leu60, Asp110, Arg114, Val116 y Arg191; en cambio, sola presenta una interacción de carácter electrostático tipo puente de hidrógeno con la Glu109. Por otro lado, la arginina 112 forma cinco interacciones de carácter hidrofóbico con los

residuos Leu60, Met64, Val90, Asp110 y Arg190. Las interacciones electrostáticas se presentan con los aminoácidos Glu109 y Glu186. Es importante mencionar que, aunque ambos residuos tienen interacciones con la Glu109, la arginina forma tres puentes de hidrógeno con la glutamina, lo que podría provocar una mayor estabilidad estructural en la ApoE4.

Otro de los cambios estructurales importantes provocados por la sustitución cisteína-arginina es referente a las propiedades electrostáticas de las estructuras. Las características electrostáticas de una proteína (y en general cualquier molécula o macromolécula), indican la forma en cómo interactuará con su entorno y son representadas comúnmente sobre sus superficies moleculares. Estas pueden ser de tres tipos: electrofílicas, es decir, zonas con carga positiva y que son representadas por coloraciones azules; nucleofílicas en color rojo las cuales son zonas con cargas negativas y, finalmente, zonas neutras las cuales tienen carácter hidrófobo y son representadas en coloración blanca. Su importancia radica en que generalmente las proteínas interactúan entre ellas mismas mediante interacciones hidrofóbicas, mientras que, con los ligandos y los solventes, las zonas electrofílicas adquieren mayor relevancia.

En el caso de las proteínas ApoE, para la isoforma 3, la cisteína le confiere un mayor carácter nucleófilo a la proteína, principalmente debida a su grupo tiol (-SH). En la figura 3.5a puede observarse como la cisteína presenta coloraciones rojas características de las superficies cargadas negativamente. El efecto de la cisteína sobre la estructura total (figura 3.5b), es contribuir al carácter hidrófobo local, lo cual es debido a que su polaridad se neutraliza con residuos básicos que rodean a la cisteína.

En el caso de la ApoE4, la arginina es un residuo básico con zonas de carácter electrofílico muy marcadas (figura 3.5c), las cuales le confieren una coloración azul. Esta propiedad es debida al grupo guanidinio ( $\text{HN}=(\text{NHR})-\text{NH}_2$ ), contenido en su grupo R. El efecto de carga total en la estructura de la ApoE4 es la de reforzar la polaridad positiva local de la proteína (figura 3.5d).

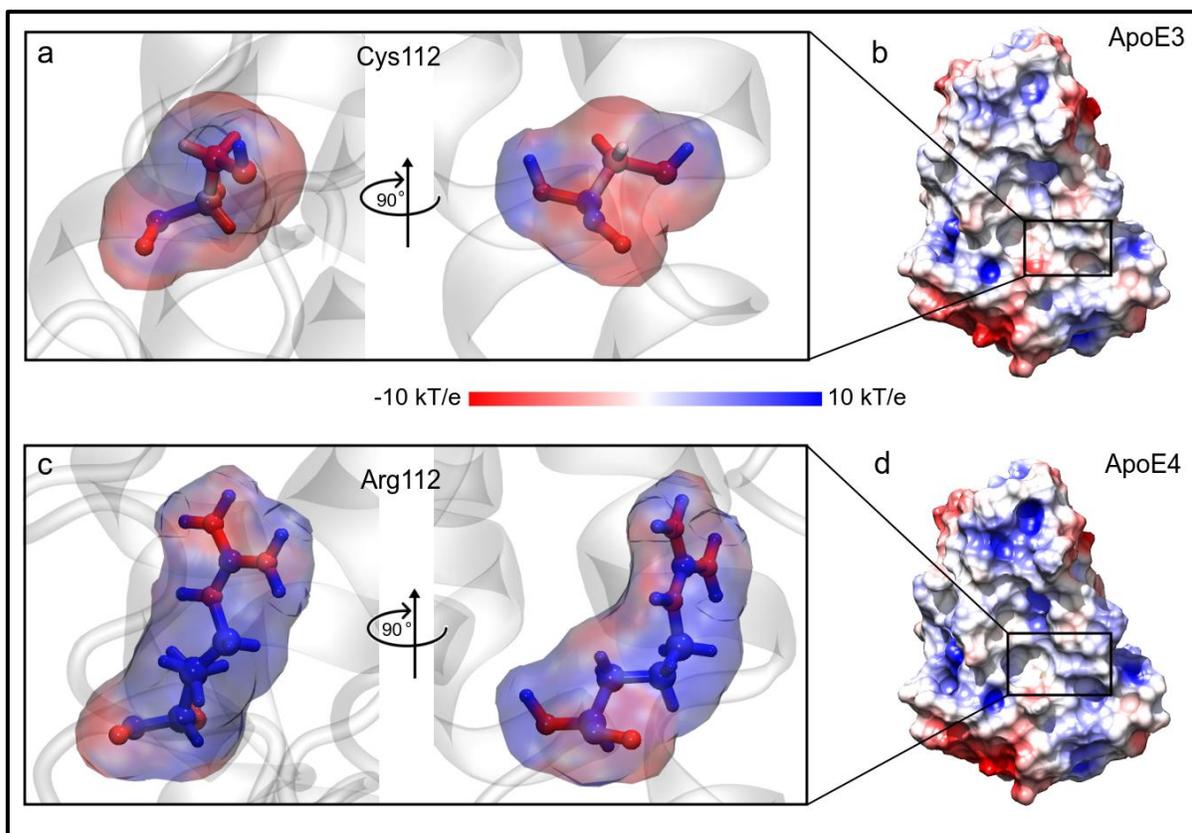


Figura 3.5 Superficies electrostáticas (ESP) de las estructuras ApoE obtenidas por modelamiento a partir de la proteína 217b. a) Superficie del residuo cisteína 112 de la isoforma 3. b) ESP total de la estructura de la ApoE3. c) Superficie de la arginina 112 de la isoforma 4. d) ESP total de la estructura de la ApoE4.

Los resultados anteriores se obtuvieron con tomando como una referencia a una estructura cristalizada, la cual difiere a las estructuras que están sometidas a condiciones fisiológicas. Para analizar los efectos directos de estos residuos, tanto local como general, se realizaron dos simulaciones usando las metodologías de la DM a diferentes pH (7 y 5), en un ensamble NPT, a 309.65K y 1 bar de presión. Los resultados se presentan en la siguiente sección.

### 3.2.2 Obtención de las estructuras proteicas para estudios de pH

El pH (potencial de Hidrógeno), es una medida de concentración de los iones de hidrógeno ( $H^+$ ) en solución, el cual es útil para determinar el grado de basicidad o acidez de dicha solución. Con valores del 1 al 14, esta escala considera que el sistema es neutro si es que tiene un valor de siete, mientras que es ácido si se tienen valores menores ( $<7$ ) y alcalino si son mayores ( $>7$ ).

Experimentalmente, el pH puede ser medido observando el diferencial de potencial entre dos electrodos en el que uno de ellos es sensible al ion de hidrógeno. Su determinación tiene un carácter importante en muchas áreas, incluidas la ciencias químicas y biológicas, ya que el pH determina muchos de los procesos fisiológicos y actividad celular.

Sin embargo, en las simulaciones realizadas en este trabajo, el pH aún no puede ser determinado o medido en base a las características de las moléculas de solvente que se han usado. El proceso por el cual el agua, como solvente, adquiere un determinado pH, implica la formación y rompimiento continua de enlaces, los cuales no son vistos por la dinámica molecular ya que derivaría en un alto costo computacional ya que se tendría que estar actualizando el sistema continuamente. En vez de esto, la metodología empleada para simular el cambio de pH en los sistemas fue el de adecuar al soluto (las proteínas ApoE y los ligandos), de acuerdo al efecto que tendría el pH sobre sus estructuras.

En esta metodología se utiliza el hecho de que algunos de los residuos que conforman a las proteínas tienen grupos ionizables (lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, histidina, arginina y tirosina) y cambian su estructura y sus estados de protonación por efecto del pH. De esta manera, en vez de focalizar el cambio de pH que pueda generar el agua como solvente, las simulaciones correrán con estructuras modificadas (protonadas o desprotonadas), para otorgarle al sistema el efecto de cambio debidas al pH de interés. La protonación/deprotonación de residuos se obtiene basándose en los valores de pKa de estos

residuos y usando el servidor PDB2PQR y el programa PROPKA 3.1, los cuales calculan qué residuos deberán ser modificados en las simulaciones que se llevaron a cabo.

En la tabla 3.1 se muestran los valores de pKa de los residuos susceptibles a ionizarse por los cambios de pH. PROPKA se basa en el valor del pKa de la cadena lateral y el área superficial de cada residuo para predecir los sitios a protonar. Debido a que en este estudio se analizaron los efectos a pH 5 y 7, los residuos que se modificaron fueron las histidinas (pKa = 6.0), los ácidos glutámicos (pKa = 4.1) y los ácidos aspárticos (pKa = 3.9). En la misma tabla se muestran los residuos protonados en cada estructura.

Tabla 3.1 Valores de pKa de los aminoácidos con grupos ionizables y residuos que fueron protonados en cada estructura para simular los sistemas a pH5.

Valores de pKa y residuos protonados				Estructura		
Aminoácido	Carboxilo	Amino	R	ApoE3	ApoE4	$\beta$ -amiloide
Arginina	1.8	9.0	12.5			
Tirosina	2.2	9.2	10.5	Glu45, Glu114,	Glu45, Glu114,	
Lisina	2.2	9.1	10.5	Glu139,	Glu139,	His6, His13,
Cisteína	1.9	10.7	8.4	His158,	His158,	His14
Histidina	1.8	9.3	6.0	Asp169,	Asp169,	
Ac. Glutámico	2.1	9.5	4.1	Glu204, His317	His317	
Ac. Aspártico	2.0	9.9	3.9			

En el caso de las estructuras a pH7, las estructuras no se modificaron con esta metodología, simplemente se compilaron los sistemas con los parámetros por defecto que utiliza el programa GROMACS debido a que éste está diseñado para correr con sistemas neutros a pH7. Todos los sistemas fueron neutralizados por iones cloro o sodio para evitar problemas durante las simulaciones de DM.

### 3.2.3 Comparación entre las proteínas ApoE3 y la ApoE4 a pH7

Una vez terminadas las simulaciones a pH7, se analizaron los resultados tomando como indicadores de estabilidad a los diagramas de RMSD, RMSF, radio de giro y enlaces de hidrógeno (Figura 3.6). Analizando el diagrama de RMSD (Figura 3.6a), se puede observar

que ambas estructuras se encuentran dentro de los parámetros de estabilidad considerados para una proteína pequeña (fluctuaciones no mayores a 0.2 nm), a partir de los 100ns. En el caso de la ApoE4 el valor de su RMSD es ligeramente mayor ( $0.511 \pm 0.095$  nm) respecto a la estructura de la ApoE3 ( $0.436 \pm 0.029$  nm), lo que indica una mayor desestabilización (tabla 3.2). Esta desestabilidad se corrobora con los valores promedio del RMSF, ya que la ApoE4 presenta una mayor fluctuación ( $0.214 \pm 0.131$  nm) respecto al valor de la ApoE3 ( $0.202 \pm 0.108$  nm). En la figura 3.6b puede apreciarse que la mayor fluctuación de la ApoE4 se presenta en los residuos iniciales (Met-17 a Leu-14) y finales de la estructura (Lys281 a His299). En cambio, la ApoE3 presenta una alta fluctuación entre los residuos 207 y 242, que corresponden a las argininas Arg189 y Arg224, ubicadas en el dominio bisagra, el cual es un dominio que por su naturaleza debe vibrar más que el resto de la proteína.

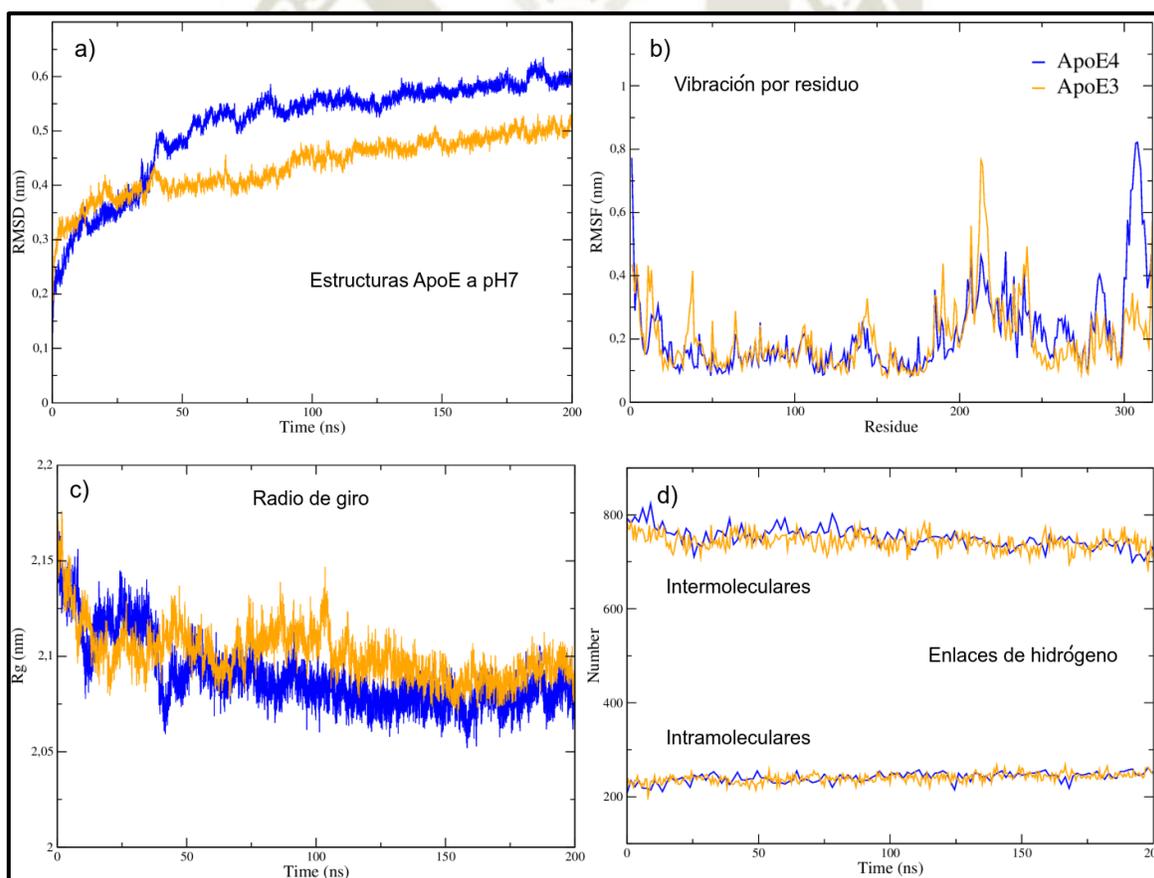


Figura 3.6 Indicadores de estabilidad para las estructuras de ApoE a pH7. Las líneas azules corresponden a la estructura de la ApoE4 mientras que las líneas anaranjadas a la estructura de la ApoE3

A pesar de la alta vibración de los residuos en las "colas" de la ApoE4, el radio de giro (Figura 3.6c), que es un parámetro usado para medir el grado de compactación de una proteína, muestra que la ApoE4 es, por muy poco (0.5%), más compacta que la ApoE3, aunque con una mayor fluctuación. Esta mayor vibración y menor compactación puede ser explicado observando el gráfico de las interacciones por enlaces de hidrógeno de ambas proteínas. La estructura de la ApoE4 tiene esa mayor compactación debida a la mayor interacción intramolecular que se ve reflejada en una mayor cantidad de enlaces de hidrógeno que se están formando a lo largo de la simulación (241 respecto a los 240 de la ApoE3). Ahora bien, su estructura se ve desestabilizada también por su mayor interacción con las moléculas del solvente (752 por los 743 de la ApoE3).

Tabla 3.2 Indicadores de estabilidad para los sistemas estudiados después de 200 ns de simulación de DM a 309.65 K. <sup>a</sup> Resultados en nm. <sup>b</sup> Número de enlaces de H.

Sistema	<sup>a</sup> RMSD	<sup>a</sup> RMSF	<sup>a</sup> RG	<sup>b</sup> Enlaces de Hidrógeno	
				Intra	Inter
<b>pH7</b>					
ApoE4	0.511 ±0.095	0.214 ±0.131	2.090 ±0.018	241 ±11	752 ±22
ApoE3	0.436 ±0.029	0.202 ±0.108	2.101 ±0.014	240 ±9	743 ±17
<b>pH5</b>					
ApoE4	0.504 ±0.095	0.238 ±0.157	2.065 ±0.032	235 ±9	744 ±17
ApoE3	0.483 ±0.068	0.222 ±0.125	2.119 ±0.015	234 ±1	725 ±25

Al realizar un alineamiento entre las estructuras finales de las ApoE a este pH, la diferencia entre las dos fue de 0.129 nm en su RMSD (Figura 3.7), aunque conservan gran parte de sus estructuras. Ahora bien, si se analizan los contactos de los residuos en la posición 112 y se comparan con las estructuras iniciales, puede observarse que la ApoE3 conserva la mayor parte de los contactos (6), a excepción del residuo Thr57, incluyendo la interacción electrostática con la Glu109. En cambio, la Arg112 de la ApoE4 aumenta sus contactos (de 7 a 10 contactos). Aunque pierde interacción con los residuos Glu186 (con enlace de hidrógeno) y Val190, gana otras interacciones con la Thr57, Arg61, Met108, Val116 y Ala193, aumentando también sus interacciones por enlaces de hidrógeno (Thr57 y Ala193).

Estos resultados indican que el cambio de residuo en la posición 112 tiene como consecuencia una mayor estabilidad local en la ApoE4.

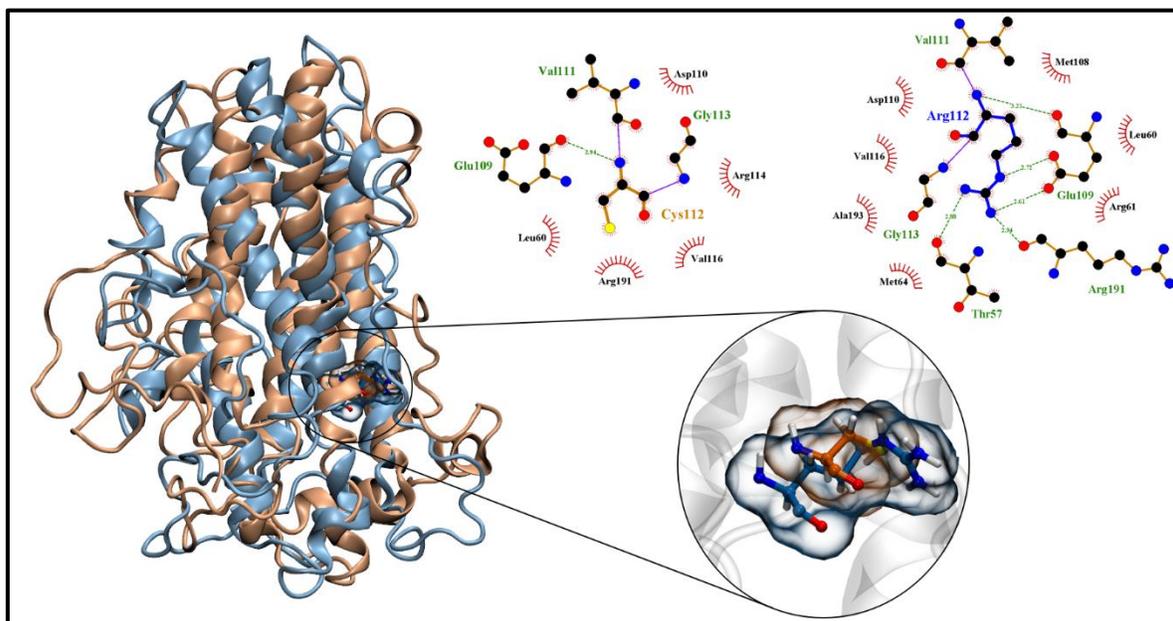


Figura 3.7 Alineamiento de las estructuras finales a pH7 de las ApoE y análisis de contactos de los residuos Cys112 y R112.

La figura 3.8 muestra las superficies del potencial electrostático, ESP, de ambas proteínas. Si se comparan con las ESP calculadas con las estructuras iniciales, pueden observarse efectos menores en cuanto a sus propiedades electrostáticas. Antes y después de las simulaciones, ambas ApoE muestran una diversidad de zonas cargadas y sin cargas que son propias de las proteínas interactuantes, siendo el aumento ligero de coloración en las regiones hidrofílicas de las proteínas finales, el cambio más notable. Esto puede observarse en la coloración de la región en donde se ubica el residuo 112 ya que, mientras que en la ApoE3 la cisteína refuerza el carácter nucleofílico, la arginina aumenta el carácter electrofílico de la ApoE4 en esa región. Si graficamos la ESP de forma local (figuras 3.8b y 3.8d), es posible observar el efecto electrostático de ambos residuos. La cisteína, la cual es un aminoácido polar y nucleofílico (coloración roja en la ESP), modifica de manera menor, el carácter polar de los residuos que la rodean, mientras que la arginina, al ser de carácter básico, modifica su entorno aumentando la nucleofilicidad local. Este efecto se aprecia, por ejemplo, si

observamos la superficie del ácido glutámico 109, este aminoácido cambia su carácter ácido (color rojo) y muestra algunas regiones nucleofílicas en su superficie (color azul).

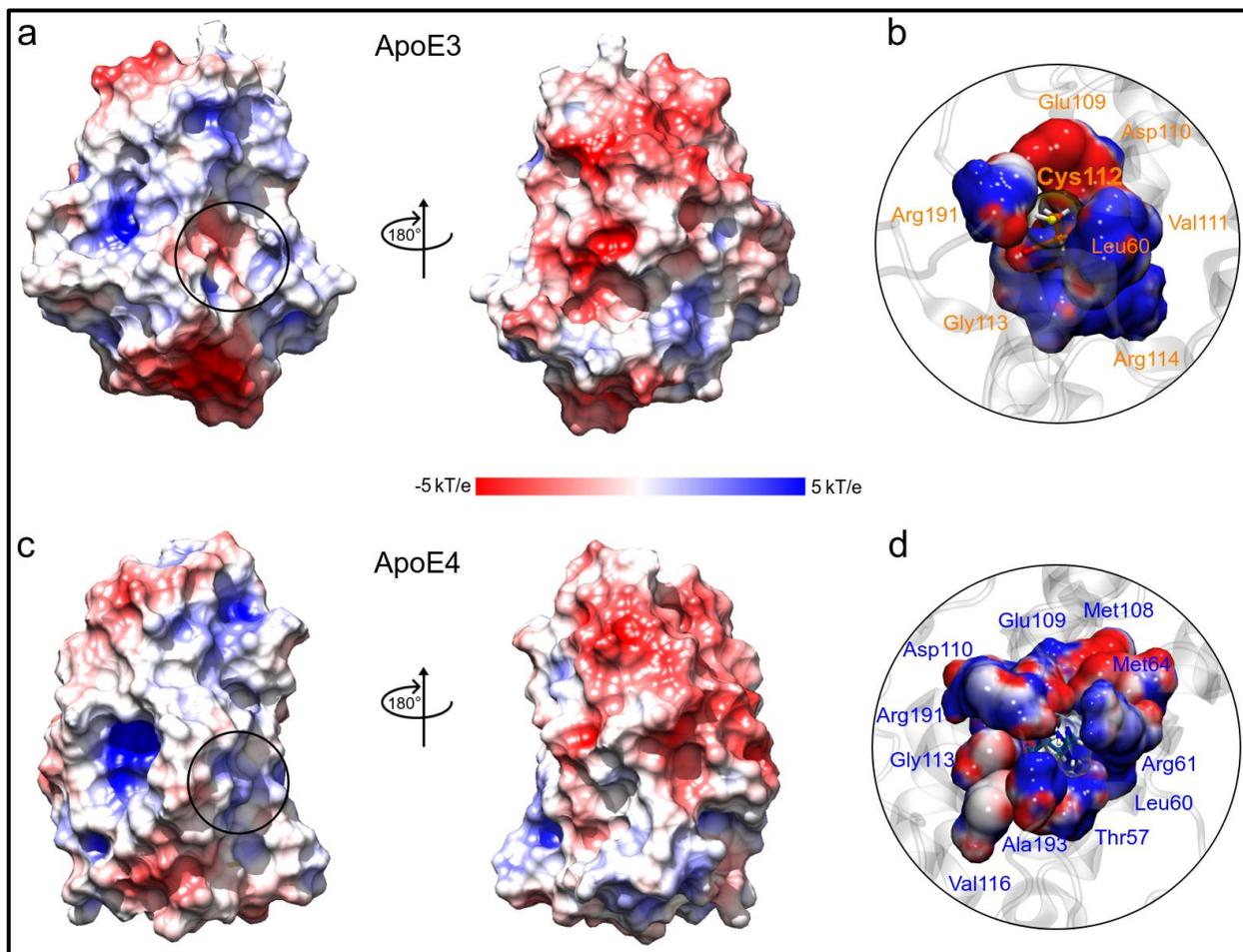


Figura 3.8 Análisis de las superficies electrostáticas de las proteínas ApoE a pH7. Las figuras a y c corresponden a las vistas de frente y reverso, mientras que las figuras b y d corresponden al acercamiento sobre el residuo 112 y su efecto sobre los residuos con los que interacciona.

Además, al ser de mayor tamaño, su efecto local es mayor, lo que puede notarse en la variedad de zonas de diferente carácter electrostático de su entorno. Este efecto local de la arginina podría influir en su capacidad de interactuar con una mayor variedad de moléculas o proteínas que la ApoE3.

### 3.2.4 Comparación entre las proteínas ApoE3 y la ApoE4 a pH5

En el estudio realizado por Prasad et al., los autores hacen mención de la importancia del pH en la función que cumple las proteínas ApoE en la fagocitación y eliminación de  $\beta$ -amiloide. En este estudio, muestran que pHs bajos ( $\sim 5.38$ ), dentro del sistema endolisosomal tiene un rol crítico en la endocitosis mediada de receptores y que está fuertemente vinculado con los trastornos neurodegenerativos y el neurodesarrollo. Esto muestra que existe un indicio de que las interacciones ApoE4- $\beta$ -amiloide cambian por efecto del pH y que sus interacciones deben modificarse a medida que se acidifica su entorno.

Debido a esto y para entender cómo es que el pH modifica las interacciones entre la ApoE4 y el  $\beta$ -amiloide, se realizaron simulaciones moleculares a pH5 (cercano al pH experimental) de las estructuras aisladas con el solvente y se analizaron las estructuras obtenidas. Los resultados muestran que después de 200 ns, la proteína ApoE3 llega a estabilizarse después de los 80 ns de simulación, con un valor de RMSD de  $0.483 \pm 0.068$  nm, sin embargo, para la ApoE4, no alcanza la estabilidad, mostrando una pendiente positiva pronunciada sobre toda la simulación, siendo su valor promedio de  $0.504 \pm 0.095$  (Figura 3.9a y Tabla 3.2). La mayor estabilidad de la ApoE3 se entiende al observar los diagramas de los demás indicadores de estabilidad, por ejemplo, el RMSF muestra una menor vibración promedio por residuo de la ApoE3 (Figura 3.9b), con fluctuaciones menos pronunciadas que las observadas en la ApoE4 ( $0.222 \pm 0.125$  y  $0.238 \pm 0.157$  nm, respectivamente). Aunque de mayor volumen ( $2.119 \pm 0.015$  nm de radio de giro), su compactación no cambia mucho y se mantiene constante a partir de los 70 ns, mientras que, para la ApoE4, la proteína sufre un proceso de compactación que no alcanzó a converger y con una fluctuación mucho mayor ( $2.065 \pm 0.032$  nm. Figura 3.9c). La diferencia importante en los puentes de hidrógeno está en su interacción con el solvente, ya que la ApoE4 presenta un mayor número de enlaces de hidrógeno, lo que explicaría su mayor vibración estructural y su lenta convergencia.

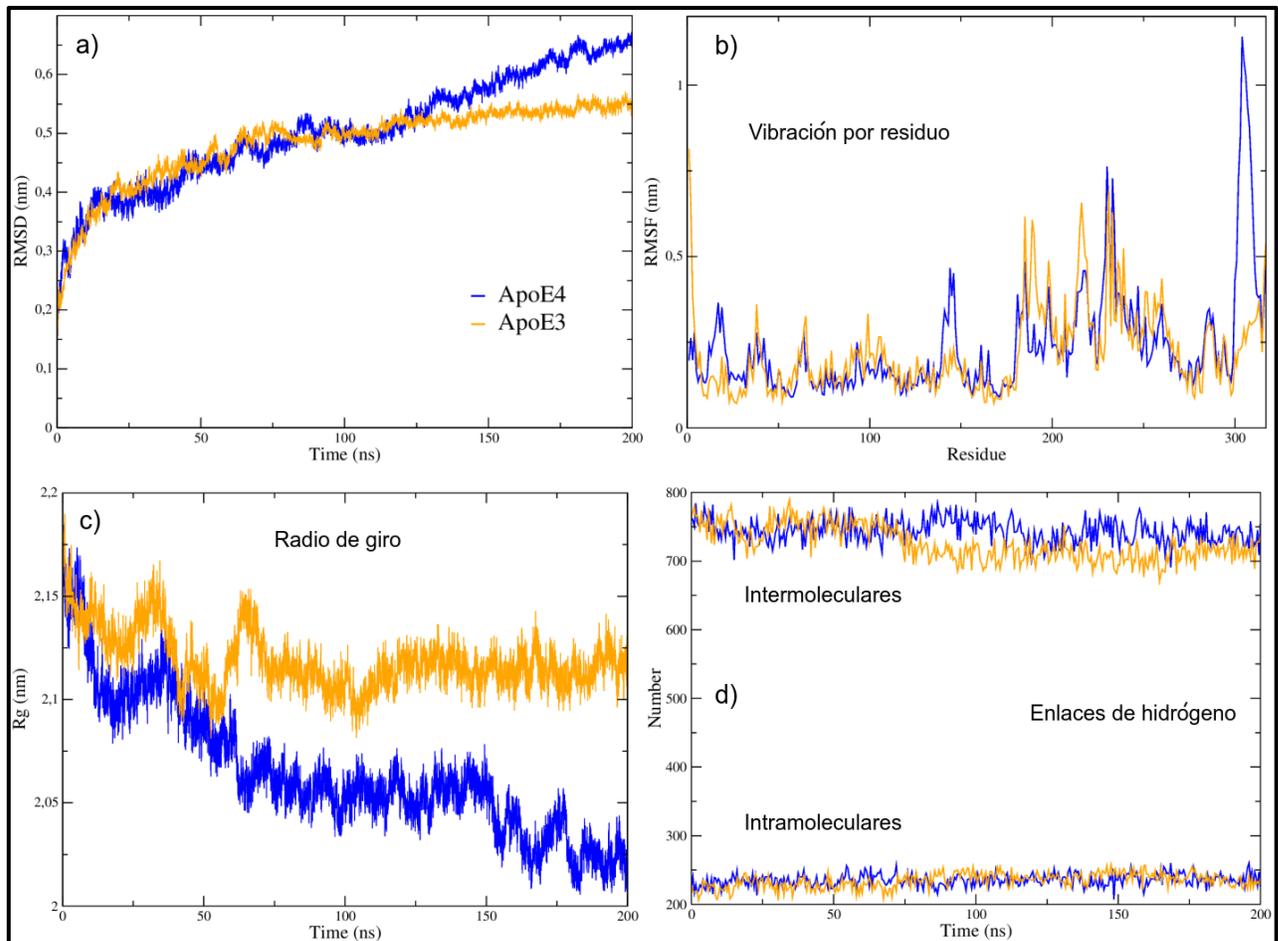


Figura 3.9 Indicadores de estabilidad para las estructuras de ApoE a pH5. Las líneas azules corresponden a la estructura de la ApoE4 mientras que las líneas anaranjadas a la estructura de la ApoE3.

Al observar el alineamiento estructural de las configuraciones finales de las ApoE a pH5 (Figura 3.10), éstas muestran una mayor pérdida de estructura secundaria respecto a las estructuras finales a pH7, sobre todo en las partes finales y en la región bisagra. La pérdida de estructura secundaria tiene repercusiones en las interacciones intermoleculares, lo que altera la conformación cerrada de las ApoE y se ve reflejado en el RMSD del alineamiento ya que a este pH el valor fue 0.136 nm, respecto a los 0.129 nm de las estructuras a pH7.

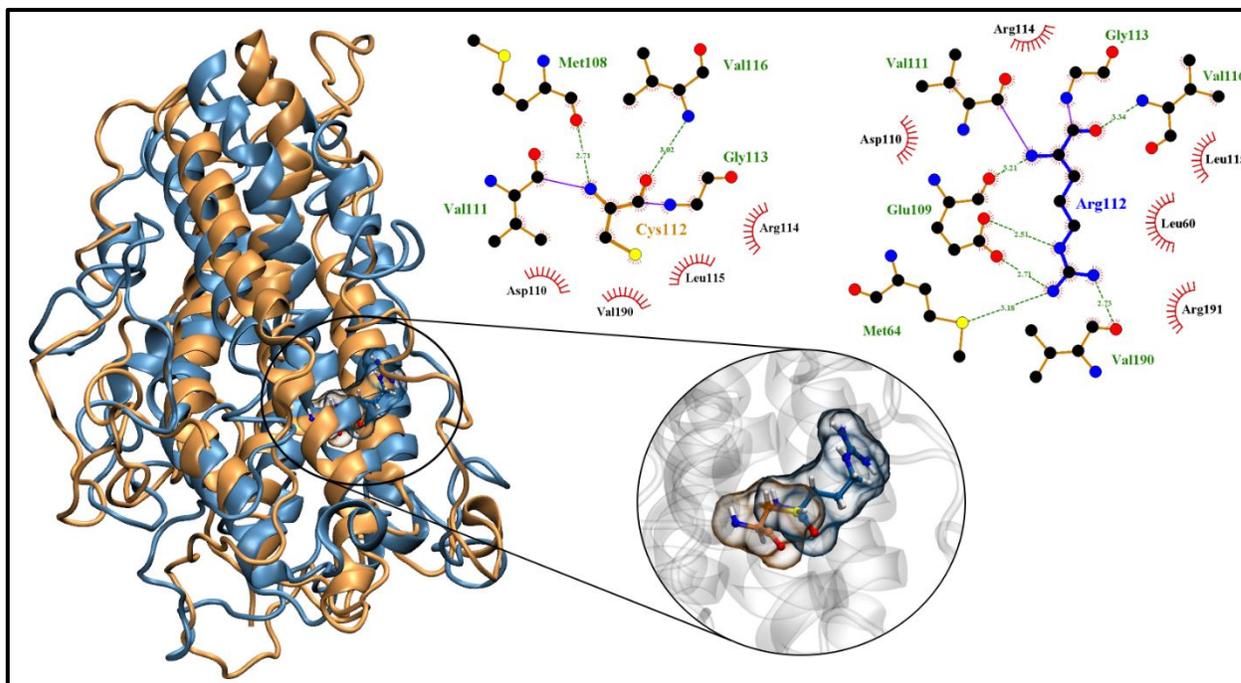


Figura 3.10 Alineamiento de las estructuras finales a pH5 de las ApoE y análisis de contactos de los residuos Cys112 y R112.

A este pH, aunque pierde interacción con la Glu109, las interacciones electrostáticas de la Cys112 aumentan, haciendo enlaces de hidrógeno con la Met107 y la Val116, haciendo más estable esa región de la ApoE3. Para la ApoE4, la Arg112 disminuye el número de interacciones respecto a las encontradas a pH7, pero también se observa un aumento en el número de interacciones electrostáticas, ahora con la Met64, Glu109, Val116 y Val190. Es importante resaltar que, para las estructuras de la ApoE4, la Glu109 siempre interaccionó de forma electrostática y con varios enlaces de hidrógeno con la Arg112, lo que muestra que este ácido glutámico ayuda a la estabilización de la arginina a los diferentes pH.

El cambio más notable producido en los pH estudiados se encuentra al observar las superficies electrostáticas (Figura 3.11). Ambas estructuras de ApoE adquieren una coloración azul sobre gran parte de su superficie, lo que indica que la ApoE se vuelve más electrofílica, es decir, las interacciones que serán más afines a las estructuras serán aquellas que tengan sitios con carga negativa.

En particular, la ApoE3 muestra una región electrofílica muy marcada en la zona central de la cara en donde se encuentra ubicada la Cys112 (Figura 3.11a) y ligeramente nucleofílica en las zonas superior e inferior de su estructura, que es en donde se encuentran ubicados los

“*loops*” u horquillas y la región bisagra de la proteína. El efecto del pH cambia drásticamente la región en donde se encuentra la Cys112, ya que esta región cambia a una coloración azul intenso, incluso en aquellos residuos con propiedades ácidas como lo son la Met108, la Glu109, el Asp110 y la Gly113.

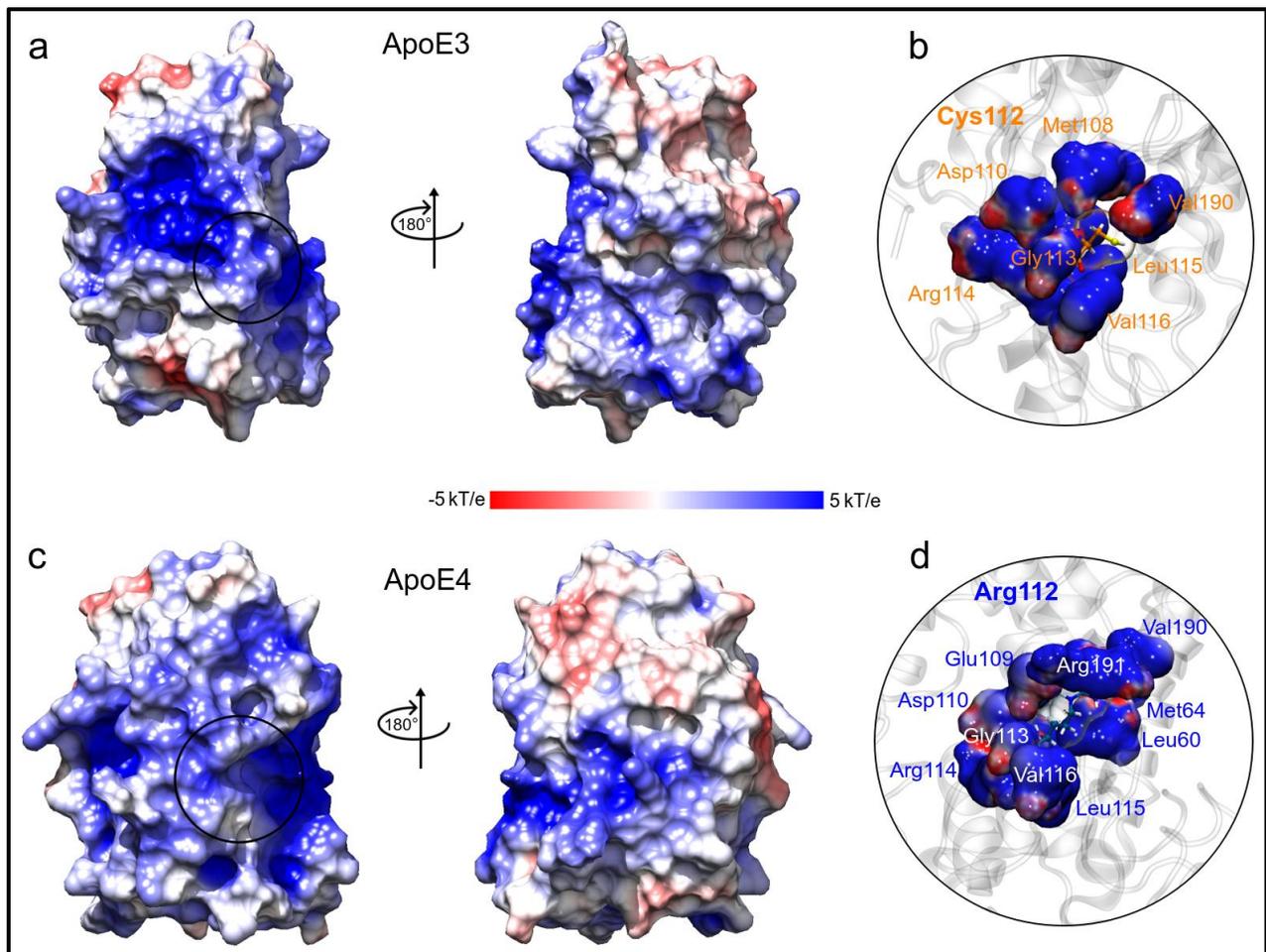


Figura 3.11 Análisis de las superficies electrostáticas de las proteínas ApoE a pH5. Las figuras a y c corresponden a las vistas de frente y reverso, mientras que las figuras b y d corresponden al acercamiento sobre el residuo 112 y su efecto sobre los residuos con los que interacciona.

Para la ApoE4, el cambio producido por el pH es más notorio ya que prácticamente toda la región frontal de la proteína, donde se encuentra ubicada la Arg112, adquiere un carácter electrofílico y las regiones nucleofílicas son menores y de coloraciones menos intensas. Al igual que la ApoE3, estas regiones nucleofílicas caen en las zonas de *loops* de la ApoE4. Si se observa el entorno de la Arg112, también se vuelve electrofílico en gran parte de los

residuos que están en contacto con ella, siendo más notable en los residuos Met64, Met108, Glu109 y Val116.

Los resultados obtenidos en las simulaciones con las estructuras ApoE solas, muestran que, en ambos sistemas, las estructuras son muy estables ya que conservan su forma compacta a través de toda la simulación. La diferencia entre las conformaciones iniciales y finales se debe principalmente a la pérdida de las  $\alpha$ -hélices externas, cambiando a estructuras de tipo *loops*, lo que la hace más flexible y proclives a vibraciones de mayor longitud. El mayor tamaño de la Arg112 provoca una mayor interacción con los residuos circundantes lo que puede ayudar a la estabilidad local de la ApoE4. El cambio de mayor notoriedad se da en las superficies electrostáticas porque estas superficies cambian drásticamente su afinidad ya que a pH7, las ApoE tienen una mayor proporción de zonas nucleofílicas, sin embargo, a pH5 ambas ApoE muestran una mayor proporción de zonas electrofílicas.

### 3.3 Efecto del pH en la estructura del $\beta$ -amiloide

El  $\beta$ -amiloide de 42 residuos es un péptido ampliamente estudiado ya que es uno de los biomarcadores más conocidos y que es considerado como el precursor en gran parte de las enfermedades neurovasculares y demencias. Su tendencia a formar conglomerados de distintos pesos moleculares y que son asociados a la manifestación de la sintomatología característica de la enfermedad de Alzheimer ha derivado a considerarlo como una de las dianas terapéuticas por excelencia en el combate a esta enfermedad. Sin embargo, pocos estudios *in silico* han tomado en cuenta las características estructurales que puedan cambiar debido al efecto que tiene el pH y que pueden repercutir en sus interacciones con otras proteínas [24-26]. Para poder reproducir las interacciones ApoE4- $\beta$ -amiloide, se realizaron dinámicas moleculares tomando en cuenta el efecto del pH en dichos cálculos. Para obtener los sistemas a los pH propuestos, se siguió la misma metodología usada en el análisis de las proteínas ApoE considerando el efecto del pH en la protonación de los residuos ionizables del  $\beta$ -amiloide (Tabla 3.1). Nuevamente, para la simulación a pH7, no se realizaron

modificaciones sobre la estructura del  $\beta$ -amiloide y se trabajó con la estructura proporcionada por Gromacs.

Los resultados de los indicadores de estabilidad se muestran en la Tabla 3.3 y en la Figura 3.12. Como puede observarse, el  $\beta$ -amiloide es una estructura que estabiliza rápidamente a pH7, ya que a partir de los 85 ns, la curva del RMSD converge ( $1.267 \pm 0.179$  nm), mientras que para la estructura a pH5, la fluctuación es alta presentando una ligera convergencia hasta los 170 ns ( $1.146 \pm 0.208$  nm). Esta alta fluctuación es típica de proteínas pequeñas o péptidos que no tienen estructuras secundarias que estabilicen la estructura principal, lo que deriva en valores muy altos en los diagramas RMSF. Como se muestra en la figura 3.2, la estructura cristalina del  $\beta$ -amiloide tiene dos  $\alpha$ -hélices formadas por los residuos Asp7-Ser26 y Gly29-Val39, lo que podría ayudar a su estabilidad. Sin embargo, las vibraciones promedio son altas ( $0.458 \pm 0.164$  y  $0.628 \pm 0.163$  nm), indicando la pérdida de las  $\alpha$ -hélices, sobre todo en la estructura a pH5 que es en la que se observa el valor más alto.

Tabla 3.3 Indicadores de estabilidad para las estructuras de  $\beta$ -amiloide a los pH estudiados después de 200 ns de simulación de DM a 309.65 K. <sup>a</sup> Resultados en nm. <sup>b</sup> Número de enlaces de H.

Sistema	RMSD	RMSF	RG	Enlaces de Hidrógeno	
				Intra	Inter
<b><math>\beta</math>-amiloide</b>					
pH7	$1.267 \pm 0.179$	$0.458 \pm 0.164$	$1.037 \pm 0.115$	$19 \pm 3$	$108 \pm 7$
pH5	$1.146 \pm 0.208$	$0.628 \pm 0.163$	$1.165 \pm 0.202$	$21 \pm 3$	$105 \pm 6$

Ambas estructuras presentan una compactación importante respecto a la estructura cristalina al compactarse cerca del 50% del valor inicial, lo que podría indicar un aumento en las interacciones intramoleculares de los péptidos (Figura 3.12c). Al analizar los enlaces de hidrógeno (Figura 3.12d), tanto los intramoleculares, como los intermoleculares, puede observarse que éstos no cambian mucho y que son prácticamente constantes durante la simulación. Esto indica que, si pierden estructura secundaria, los puentes de hidrógeno se empiezan a generar entre diversas regiones del  $\beta$ -amiloide lo que explicaría su forma compacta.

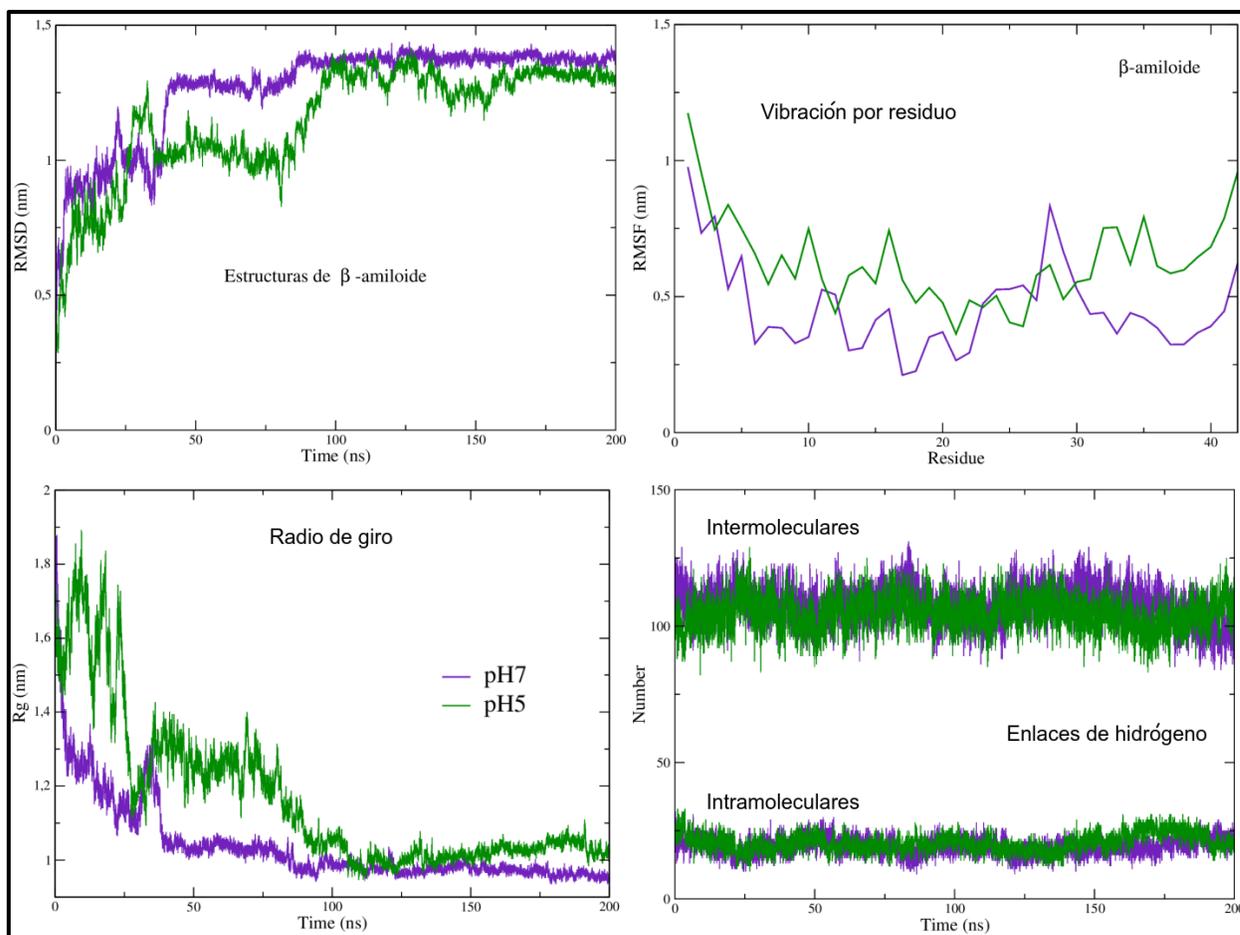


Figura 3.12 Indicadores de estabilidad para las estructuras de  $\beta$ -amiloide a los pH estudiados. Las líneas púrpuras corresponden a la estructura a pH7 mientras que las líneas verdes a la estructura de la pH5

Para verificar la forma de las estructuras finales del  $\beta$ -amiloide, se comprueba la pérdida de las  $\alpha$ -hélices en las dos estructuras, pasando de ser dos hélices largas (20 y 11 residuos) a dos  $\alpha$ -hélices cortas para la estructura a pH5 (Val18-Phe20, Glu11-His13 y Asp23-Gly25) y una larga a pH7 (His14-Val24) (Figuras 3.13a y 3.13b). Estos resultados comprueban que las formas globulares de ambas estructuras se deben a la formación de enlaces hidrógeno entre dominios, es decir, residuos ubicados en la región N-terminal interactúan con residuos en la región C-terminal.

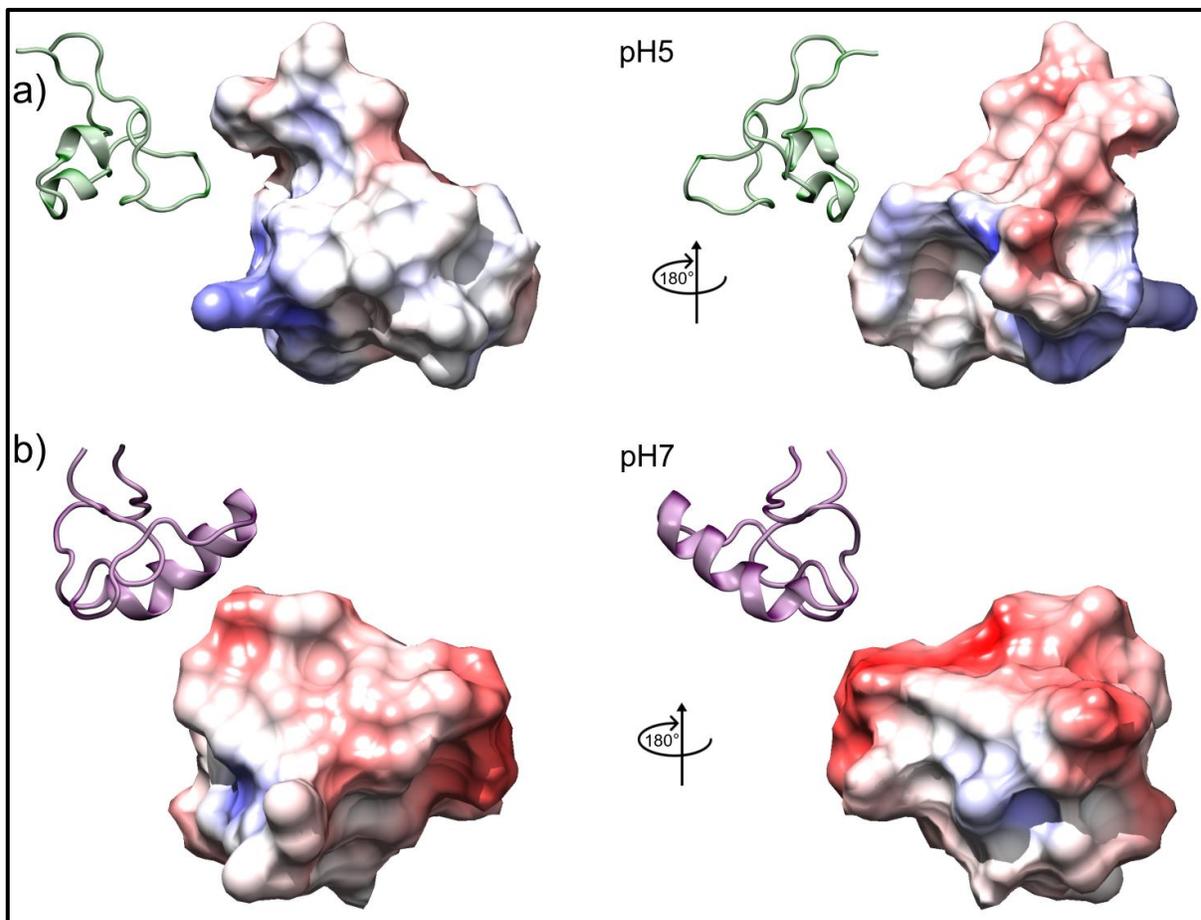


Figura 3.13 Análisis de las superficies electrostáticas del  $\beta$ -amiloide a los diferentes pH. Las figuras pequeñas en verde y púrpura corresponden a la misma orientación que las figuras en superficie.

La misma figura 3.13 muestra los resultados obtenidos en los cálculos de las superficies electrostáticas. A pH7, el  $\beta$ -amiloide presenta una coloración roja en prácticamente toda su superficie, lo que la hace afín a regiones electrofílicas. Las zonas azules y blancas (de carga positiva y neutra) se concentran en los residuos que preceden a la  $\alpha$ -hélice (Tyr10-His13). A pH5, las regiones electrofílicas (azul) y neutras (blancas) aumentan, aunque aún existen zonas nucleofílicas importantes ubicadas en las regiones N y C terminales.

Los resultados sugieren que los monómeros de  $\beta$ -amiloide interactúan con otras especies adquiriendo una conformación compacta y con especies que tengan zonas electrofílicas en su estructura. Mientras que a pH7, estas interacciones  $\beta$ -amiloide-zonas electrofílicas serán más fuertes, a pH5 el  $\beta$ -amiloide será más proclive a interactuar con estructuras de diferente naturaleza electrostática, por lo que será más activo en estas condiciones.

### 3.4 Acoplamiento Molecular

Los acoplamientos moleculares se realizaron tomando a la estructura ApoE4 como receptor y a las moléculas del  $\beta$ -amiloide y la heparina como ligandos. Para cada pH estudiado, se usaron las estructuras finales obtenidas después de cada simulación para realizar los acoplamientos. En el caso de la heparina, se usó la misma estructura para los acoplamientos porque no presenta grupos ionizables diferentes en ambos pH.

Para determinar los complejos que serían estudiados, se realizaron tres tipos de acoplamiento, dos para determinar los complejos ApoE4- $\beta$ -amiloide y uno para los complejos ApoE4-Heparina. En el primer caso, el primer acoplamiento fue realizado usando el servidor PatchDock, el cual realiza una búsqueda exhaustiva de complejos basados en la complementariedad y penetración de los ligandos en la estructura de la ApoE4. En este estudio se obtuvieron 10092 complejos a pH7 y 4950 a pH5, los cuales se sometieron a un refinamiento basado en energías libres con el servidor FireDock, el cual ordena los complejos de acuerdo a un puntaje basado en minimización de energías de interacción receptor-ligando. Basados en los 20 complejos mejor puntuados de este último acoplamiento, cuatro sitios de interacción por cada pH fueron obtenidos y se escogió aquella estructura que mejor puntuación energética tenían en cada uno de estos sitios para los estudios de energía libre de enlace (BFE). Los residuos que interactuaban con el  $\beta$ -amiloide de cada sitio se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 Principales sitios de interacción ApoE4 -  $\beta$ -amiloide encontrados en los cálculos de acoplamiento molecular.

pH	Residuos por sitio de interacción			
	S1	S2	S3	S4
7	Val-15, Trp-13 - Leu-10, Leu28, Arg32, Asp35, Glu59, Gln208, Arg213-Ala216	Ala-12 - Leu-10, Phe-6 - Cys-2, Glu9-Glu13, Arg15-Glu19, Glu27	Arg142, Lys143, Lys146, Ala241, Glu281-Ala285, Val287, Pro295-His299	Trp20, Thr83-Val85, Thr89, Arg92, Leu93, Asp154, Lys157, Arg158, Ala160-Ala164, Arg260, Ser263, Trp264, Leu268, Glu270, Met272, Arg274
	S1	S4	S5	S6
5	Met-16 - Leu-10, Thr-11 - Ala-4, Pro12, Arg15, Gln16, Thr18-Trp20, Gln24, Arg25, Glu27, Leu46	Glu7, Gln258, Leu261, Trp264, Phe265, Pro285-Glu271, Gln273, Arg274, Trp276-Val280, Lys282	Glu45, Gln46, Gln48, Glu49, Leu52, Gln123, Leu126, Gly127, Ser129, Pro202, Leu203	Glu106, Arg112, Gly113, Val116, Gln117, Arg119, Gly120, Arg180-Pro183, Arg189, Arg191-Thr194, Gln204, Ala237, Glu238, Lys242

Una vez identificados los sitios de interacción del  $\beta$ -amiloide, para obtener los complejos ApoE4-Heparina, se realizó un acoplamiento local con el programa AutoDock Vina, y se escogieron aquellas estructuras que mejor puntuación tenía sobre los sitios mencionados. En ambas interacciones, se realizaron dinámicas por 50 ns, guardando las estructuras cada 0.2 ns para su análisis de BFE.

Es importante destacar que en ambos pH estudiados, dos sitios coincidieron en sus interacciones APoE4- $\beta$ -amiloide lo que implica que estos sitios permanecen activos a pesar de los cambios en el pH.

### 3.4.1 Análisis energético de los complejos a pH7

Las figuras 3.14 y 3.15 muestran cada uno de los complejos analizados en este trabajo a pH7. Para cada sitio se analizaron las energías libres de enlace (BFE, por sus siglas en inglés) de ambos ligandos, siguiendo la metodología MM/PBSA y usando el programa g\_mmpbsa, el cual calcula las energías libres como la suma de los términos de energía mecánica, electrónica, de solvatación polar y apolar. Los análisis energéticos se realizaron para estudiar la capacidad que tiene la heparina para competir por los sitios de interacción del  $\beta$ -amiloide y conocer si era una molécula capaz de bloquear estos sitios.

Para determinar si un fármaco puede competir por un sitio de interacción, debe ser capaz de interactuar con energías favorables (de signo negativo) en el sitio de unión al receptor. Dependiendo del tamaño del péptido o la proteína con la que se evaluará esta interacción, el fármaco deberá de igualar la energía, en el mejor de los casos, o al menos deberá representar un porcentaje importante de la energía con la que el péptido interactúa con el receptor. En la tabla 3.5 se presentan los resultados de la evaluación energética de ambos ligandos.

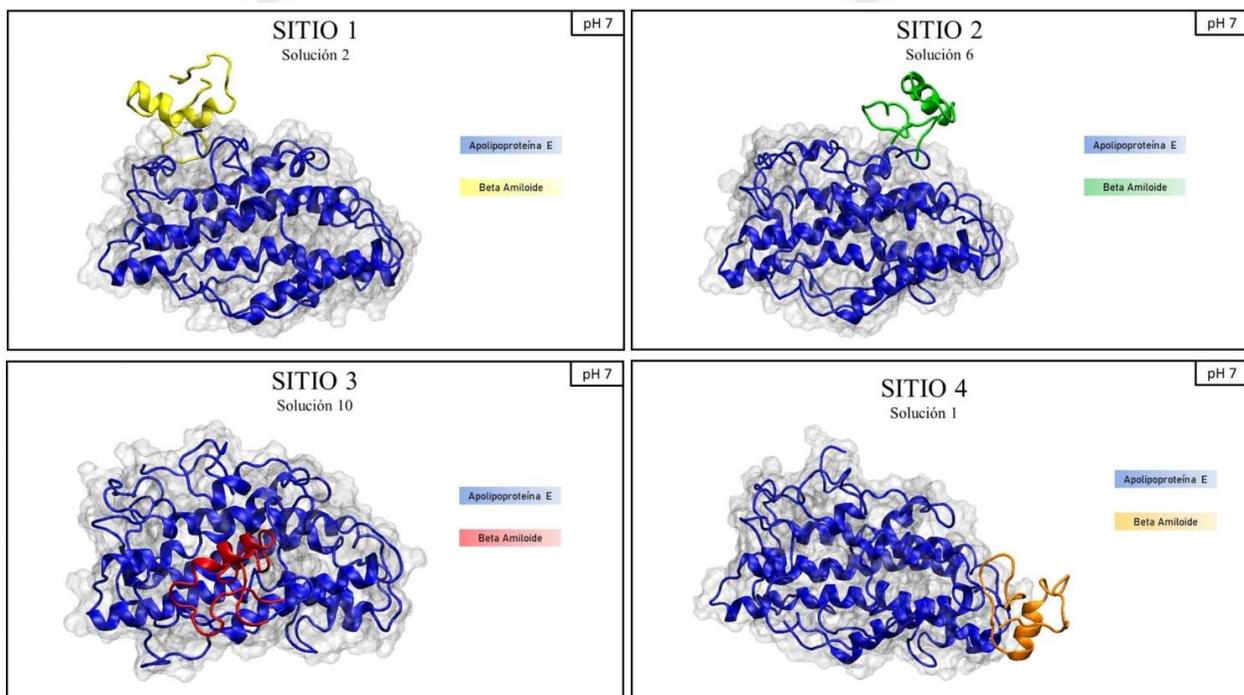


Figura 3.14 Complejos moleculares formados por las interacciones ApoE4- $\beta$ -amiloide a pH7. Las soluciones mostradas corresponden a cuatro diferentes regiones de la ApoE4 y fueron las que mejor puntaje obtuvieron en los cálculos de energía libre obtenidas con el servidor FireDock.

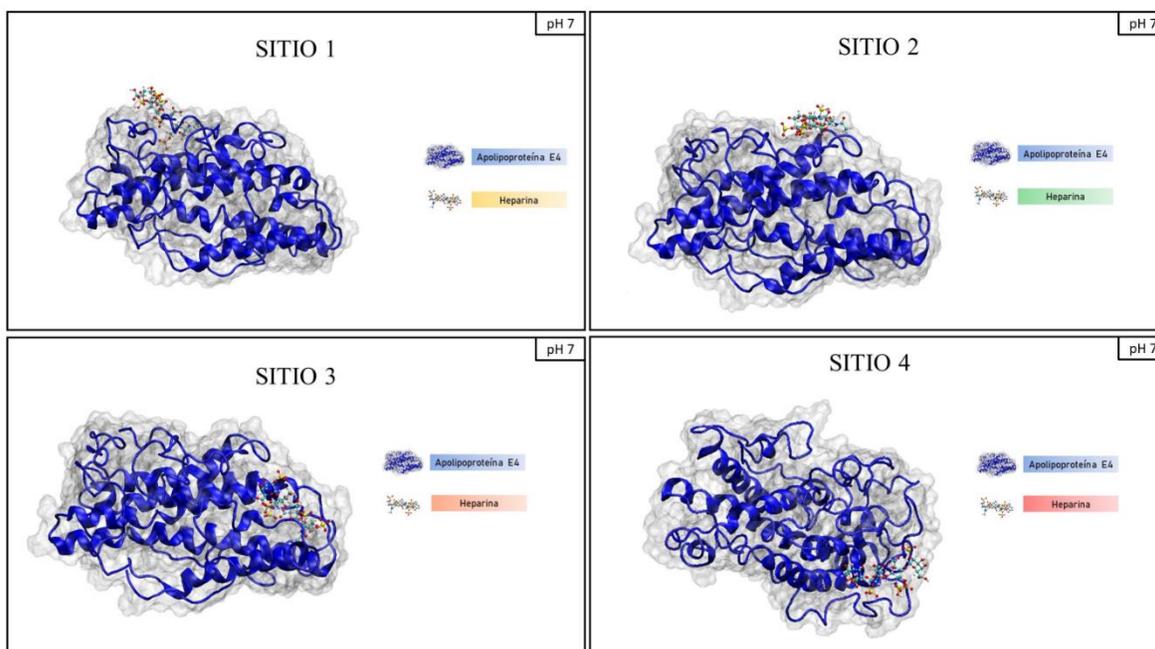


Figura 3.15 Complejos moleculares ApoE4-Heparina a pH7, obtenidos con técnicas de acoplamiento molecular local (AutoDock Vina), tomando como referencia los sitios de interacción de los complejos ApoE4- $\beta$ -amiloide.

De manera general, puede observarse que a pH7, la heparina es altamente competente en las interacciones con la ApoE4. Si se analiza el sitio 1, puede observarse una energía libre de enlace mayor de la heparina que del  $\beta$ -amiloide, siendo un 44% más fuerte con la heparina. En el sitio 2, se obtuvo una energía positiva para la BFE del  $\beta$ -amiloide, lo que significa que este sitio no es afín a esta interacción, y la heparina mostró una energía pequeña (-34.7 kJ/mol), pero favorable a este sitio. En la interacción con el sitio 3, la BFE con el  $\beta$ -amiloide es más favorable sin embargo es por muy poco en comparación a la BFE de la heparina, siendo tan solo un 10.2% mayor, por lo que la heparina también podría competir en este sitio.

Finalmente, para el sitio 4, la energía obtenida para la interacción del  $\beta$ -amiloide vuelve a ser positiva, aunque con un valor no muy alto en comparación con la obtenida para el sitio 2, deduciéndose que este sitio tampoco es afín para este ligando. En cambio, para la heparina, la energía obtenida indica que en este sitio puede haber interacciones competentes. Cabe resaltar que para el sitio 4, la variación del error puede llevar a energías favorables para el  $\beta$ -amiloide, así como a energías no favorables para la heparina, por lo que en este sitio pueden existir interacciones con los ligandos que puedan ser de mayor trascendencia.

Tabla 3.5 Energías libre de enlace (BFE) para las interacciones con la ApoE4 a pH7. Todas las energías están en kJ/mol.

<b>Energías libres de enlace promedio MM/PBSA para los complejos con la ApoE4 - pH = 7.0 50 ns</b>					
<b>System</b>	<b>E vW</b>	<b>E elect</b>	<b>E ps</b>	<b>E sasa</b>	<b>E binding</b>
<b>ApoE4 - <math>\beta</math>-amiloide</b>					
Sitio 1	-236.89 $\pm$ 4.15	-598.11 $\pm$ 22.32	613.67 $\pm$ 15.31	-35.36 $\pm$ 0.510	<b>-256.69</b> $\pm$ 17.87
Sitio 2	-233.49 $\pm$ 3.84	384.64 $\pm$ 14.38	268.33 $\pm$ 8.61	-28.13 $\pm$ 0.43	<b>391.35</b> $\pm$ 17.01
Sitio 3	-268.48 $\pm$ 2.95	25.54 $\pm$ 8.71	142.29 $\pm$ 6.72	-37.66 $\pm$ 0.39	<b>-138.30</b> $\pm$ 12.57
Sitio 4	-226.48 $\pm$ 2.91	-59.49 $\pm$ 21.77	327.27 $\pm$ 10.66	-30.29 $\pm$ 0.36	<b>11.01</b> $\pm$ 20.11
<b>ApoE4 - Heparina</b>					
Sitio 1	-297.07 $\pm$ 1.86	-454.26 $\pm$ 5.31	377.81 $\pm$ 2.54	-31.49 $\pm$ 0.10	<b>-370.01</b> $\pm$ 4.92
Sitio 2	-58.43 $\pm$ 7.68	-127.51 $\pm$ 17.02	123.52 $\pm$ 13.54	-7.28 $\pm$ 0.97	<b>-34.71</b> $\pm$ 22.91
Sitio 3	-125.70 $\pm$ 6.48	-238.19 $\pm$ 12.00	223.01 $\pm$ 8.48	-19.65 $\pm$ 0.95	<b>-125.53</b> $\pm$ 19.22
Sitio 4	-120.17 $\pm$ 15.14	-104.08 $\pm$ 13.58	176.56 $\pm$ 16.74	-14.13 $\pm$ 1.75	<b>-26.81</b> $\pm$ 31.82

### 3.4.2 Análisis energético de los complejos a pH5

Una vez establecido que la heparina a condiciones de pH7 es capaz de interactuar con energía favorables con la ApoE4, el siguiente reto era modificar el ambiente y analizar si a pH ácido, la heparina conservaba esa capacidad de interacción. La heparina es considerada como una molécula con grupos ácidos, por lo que no se modificó su estructura para estos análisis. Las figuras 3.16 y 3.17 muestran los sitios de interacción encontrados en la ApoE4 a pH5. Cada sitio fue nuevamente evaluado a las mismas condiciones de simulación, a excepción del pH, y los resultados se muestran en la tabla 3.6. Cabe mencionar que los sitios de interacción 1 y 4 que se obtuvieron a pH 7, se conservaron en este pH, estos sitios se denotaron en las figuras y en la tabla como sitios 1 y 2 (para el 4). Además, dos sitios de interacción nuevos se obtuvieron y se nombraron como sitios 3 y 4.

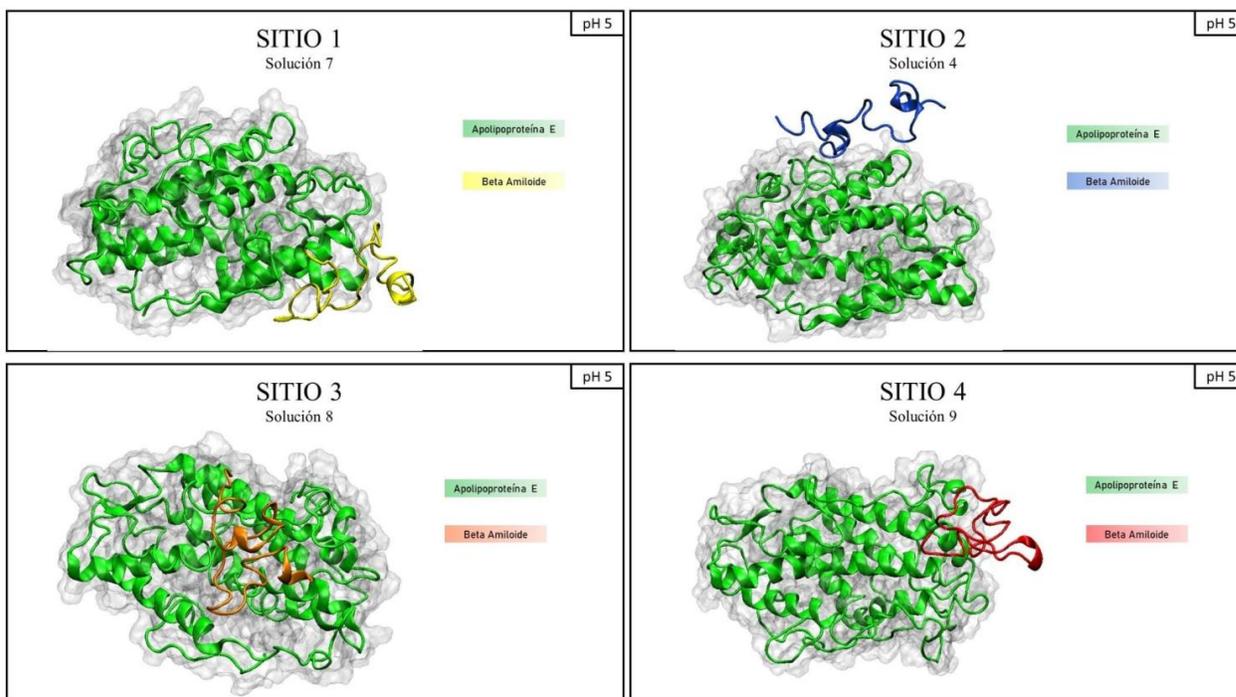


Figura 3.16 Complejos moleculares formados por las interacciones ApoE4- $\beta$ -amiloide a pH5. Las soluciones mostradas corresponden a cuatro diferentes regiones de la ApoE4 y fueron las que mejor puntaje obtuvieron en los cálculos de energía libre obtenidas con el servidor FireDock.

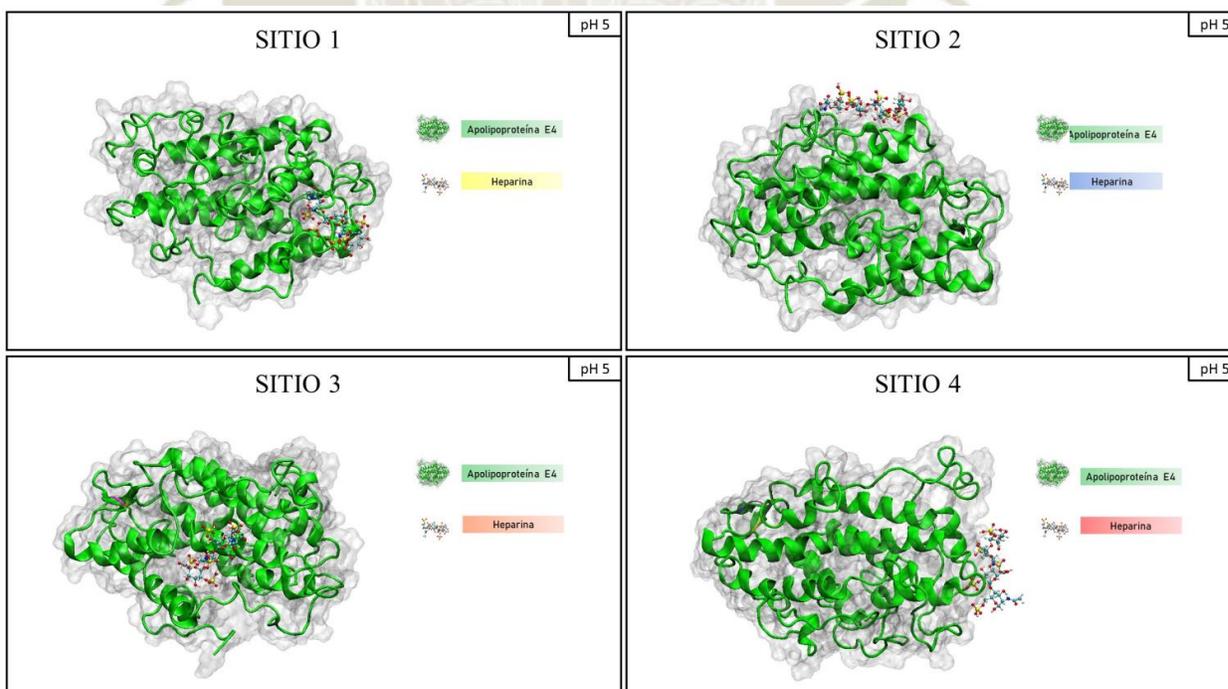


Figura 3.17 Complejos moleculares ApoE4-Heparina a pH5, obtenidos con técnicas de acoplamiento molecular local (AutoDock Vina), tomando como referencia los sitios de interacción de los complejos ApoE4- $\beta$ -amiloide.

Los resultados de las energías libres de enlace se muestran en la tabla 3.6. Es importante resaltar el cambio que existe con el cambio de pH, ya que todas las interacciones del  $\beta$ -amiloides resultaron favorables y con energías considerables. Para el sitio 1, la BFE de la heparina representó tan solo el 38.2% de la BFE de interacción del  $\beta$ -amiloides que, aunque favorable también, no representa una energía que pueda competir o bloquear este sitio. Algo parecido ocurre para el sitio 2, la BFE de la heparina es tan solo el 37.3% de la energía de interacción del  $\beta$ -amiloides. Ambas interacciones podrían no ser suficientes para poder competir en estos sitios o poder bloquearlos. El sitio 3 es el que mostró mayor afinidad por el  $\beta$ -amiloides, ya que se obtuvo un valor considerable en su BFE llegando a los 626.47 kJ/mol, la energía más alta para las interacciones estudiadas. Sin embargo, también para la heparina fue el sitio que más alta BFE se obtuvo (393.86 kJ/mol), lo que representa el 62.9% de la energía del  $\beta$ -amiloides, por lo que la heparina si pudiera competir en este sitio de interacción. Finalmente, el sitio 4 fue la región que presentó las energías BFE más cercanas entre sí para ambos ligandos,  $-222.91 \pm 14.37$  kJ/mol para el  $\beta$ -amiloides, contra los  $-185.12 \pm 9.31$  kJ/mol de la heparina (83%), por lo que es el sitio en donde la heparina pudiera bloquear las interacciones con el  $\beta$ -amiloides.

De forma general, a pH5, las interacciones ApoE4- $\beta$ -amiloides se vuelven más afines y sus energías se ven favorecidas por este cambio de ambiente. Para la heparina, ésta aún representa una buena opción para posibles tratamientos ya que, como muestras los resultados, sigue siendo afín a la estructura de la ApoE4, presentando energías que pudieran competir en los cuatro sitios de interacción analizados.

Tabla 3.6 Energías libre de enlace (BFE) para las interacciones con la ApoE4 a pH5. Todas las energías están en kJ/mol.

<b>Energías libres de enlace promedio MM/PBSA para los complejos con la ApoE4 - pH = 5.0 50 ns</b>					
<b>System</b>	<b>E vW</b>	<b>E elect</b>	<b>E ps</b>	<b>E sasa</b>	<b>E binding</b>
<b>ApoE4 - <math>\beta</math>-amiloide</b>					
Sitio 1	-265.89 $\pm$ 2.11	-687.44 $\pm$ 15.00	547.60 $\pm$ 8.92	-37.78 $\pm$ 0.27	<b>-443.51</b> $\pm$ 12.56
Sitio 2	-212.45 $\pm$ 2.62	-407.55 $\pm$ 11.05	257.90 $\pm$ 6.18	-31.08 $\pm$ 0.32	<b>-393.18</b> $\pm$ 11.17
Sitio 3	-320.75 $\pm$ 2.82	-1050.74 $\pm$ 20.91	793.24 $\pm$ 12.88	-48.22 $\pm$ 0.33	<b>-626.47</b> $\pm$ 14.38
Sitio 4	-174.04 $\pm$ 2.33	-202.81 $\pm$ 22.55	177.75 $\pm$ 14.35	-23.81 $\pm$ 0.35	<b>-222.91</b> $\pm$ 14.37
<b>ApoE4 - Heparina</b>					
Sitio 1	-163.96 $\pm$ 1.26	-295.52 $\pm$ 3.46	282.29 $\pm$ 2.46	-22.51 $\pm$ 0.13	<b>-169.69</b> $\pm$ 4.40
Sitio 2	-90.77 $\pm$ 3.98	-314.55 $\pm$ 10.13	243.74 $\pm$ 7.03	-15.22 $\pm$ 0.44	<b>-146.80</b> $\pm$ 10.67
Sitio 3	-211.65 $\pm$ 2.44	-611.97 $\pm$ 7.23	431.08 $\pm$ 4.95	-31.32 $\pm$ 0.13	<b>-393.86</b> $\pm$ 4.72
Sitio 4	-160.54 $\pm$ 2.61	-313.53 $\pm$ 9.53	280.77 $\pm$ 7.80	-21.83 $\pm$ 0.32	<b>-185.12</b> $\pm$ 9.31



# Capítulo 4

## 4. Conclusiones

- Al estabilizar las ApoE mediante técnicas de Dinámica Molecular y al analizar sus alineamientos a diferentes pH's, se observó que a pH7 la ApoE3 como la ApoE4 son estables con fluctuaciones no mayores a 0.2nm a partir de los 100ns, pero en el caso de la ApoE4 esta es ligeramente mayor respecto a la estructura de la ApoE3 lo que indica una mayor desestabilización. Con respecto a su compactación, la ApoE4 es, por muy poco (0.5%), más compacta que la ApoE3, aunque con una mayor fluctuación que puede ser debida a la mayor interacción intramolecular. A este pH el cambio de residuo en la posición 112 tiene como consecuencia una mayor estabilidad local en la ApoE4. Mientras que a pH5, los resultados muestran que la proteína ApoE3 llega a estabilizarse después de los 80 ns de simulación, sin embargo, la ApoE4, no alcanza la estabilidad durante los 200 ns de la dinámica. La ApoE4 mostró una mayor vibración estructural y una lenta convergencia, que puede ser debida a que ésta presenta un mayor número de enlaces de hidrógeno. Asimismo, se observó que hay una mayor pérdida de estructura secundaria respecto a las estructuras finales a pH7, teniendo repercusión sobre las interacciones intermoleculares. En cuanto a sus propiedades electrostáticas, sí hubo una variación muy marcada debido a que ambas estructuras de ApoE muestran una mayor proporción de zonas electrofílicas a comparación de las estructuras obtenidas a pH7, en donde las ApoE tienen una mayor proporción de zonas nucleofílicas.
- Con respecto al  $\beta$ -amiloide, se evidenció que ésta es una estructura que estabiliza rápidamente a pH7, mientras que a pH5 la fluctuación es alta. Su estructura cristalina tiene dos  $\alpha$ -hélices formadas por los residuos Asp7-Ser26 y Gly29-Val39, lo que podría ayudar a su estabilidad. Sin embargo, las vibraciones promedio son altas indicando la

pérdida de las  $\alpha$ -hélices, sobre todo en la estructura a pH5, que es en la que se observó el valor más alto. En cuanto a su compactación, en ambos pH's fue alta, lo cual podría indicar un aumento en las interacciones intramoleculares de los péptidos. En el caso de las superficies electrostáticas se observó que a pH7 las interacciones del  $\beta$ -amiloide con las zonas electrofílicas son más fuertes, mientras que a pH5 el  $\beta$ -amiloide está más dispuesto a interactuar con estructuras electrostáticas.

- Para realizar las simulaciones de DM usando a la heparina como ligando, la cual no es una molécula proteica, se requirieron usar parámetros de campo de fuerza obtenidos a partir del servidor LigParGen. Sin embargo, las cargas atómicas, que son un parámetro muy importante en las interacciones de corto y largo alcance, se optimizaron con los cálculos cuánticos usando el análisis poblacional de Hirshfeld y se anexaron al campo de fuerza de la heparina. Esto permitió asegurar una correcta representación electrostática de los sistemas estudiados.
- A partir del análisis energético de los complejos analizados. A pH7 se obtuvo que la heparina puede ser un fármaco capaz de bloquear los sitios de interacción del  $\beta$ -amiloide en ambientes a pH neutro e impedir la interacción directa con la ApoE4. Mientras que a pH5 las interacciones ApoE4- $\beta$ -amiloide se vuelven más afines y sus energías se ven favorecidas por este cambio de ambiente. Para la heparina, ésta aún representa una buena opción para posibles tratamientos dado que, según los resultados, sigue siendo afín a la estructura de la ApoE4, presentando energías que pudieran competir en los cuatro sitios de interacción analizados.

## 5. Recomendaciones

- Es necesario hacer simulaciones más largas, es decir incrementar el tiempo de las dinámicas moleculares para de esa forma asegurar las convergencias.
- Es importante analizar un mayor número de interacciones para poder saber si los sitios de interacción son afines tanto al Beta Amiloide como la Heparina.
- Sería conveniente realizar simulaciones con ambos ligandos presentes en la simulación, de esta forma se podría ver cuál de los dos se quedaría en los sitios.
- Se recomienda realizar un análisis estadístico para los valores obtenidos de RMSD, RMSF y energías de enlace.



## 6. Referencias Bibliográficas

1. Organización mundial de la Salud, A. M. (2017). Proyecto de plan de acción mundial sobre la respuesta de salud pública a la demencia: informe de la Directora General (No. A70/28). Organización Mundial de la Salud.
2. Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., y Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 9(1), 63-75.
3. Llibre Rodríguez, J., & Gutiérrez Herrera, R. F. (2014). Demencias y enfermedad de Alzheimer en América Latina y el Caribe. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40(3), 378-387.
4. Nitrini, R., Bottino, C., Albalá, C., Capuñay, N., Ketzoian, C., Rodríguez, J., Mestre, G., Ramos-Cerqueira, A. y Caramelli, P. (2009). Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. *International Psychogeriatrics*, 21(4), 622- 630.
5. Prince, M., Acosta, D., Ferri, C., Guerra, M., Huang, Y., Rodríguez, J., Salas, A., Sosa, A., Williams, J., Dewey, M., Acosta I., Jotheeswaran, A., y Liu, Z. (2012). Dementia incidence and mortality in middle-income countries, and associations with indicators of cognitive reserve: a 10/66 Dementia Research Group population-based cohort study. *The Lancet*, 380(9836), 50-58.
6. Ministerio de Salud del Perú [Internet]. Alzheimer afecta a más de 200 mil adultos mayores en Perú. Lima: Ministerio de salud, Sala de prensa; 2019. <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/51175-alzheimer-afecta-a-mas-de-200-mil-adultos-mayores-en-peru>.
7. Seguro Social de Salud [Internet]. EsSalud detectó más de 1,600 casos de Alzheimer. Lima: Seguro Social de Salud, Sala de prensa; 2016. <http://www.essalud.gob.pe/essalud-detecto-mas-de-1600-casos-de-alzheimer/>
8. Dewey, M. E., & Saz, P. (2001). Dementia, cognitive impairment and mortality in persons aged 65 and over living in the community: a systematic review of the literature. *International journal of geriatric psychiatry*, 16(8), 751-761.
9. Prince, M., Brodaty, H., Uwakwe, R., Acosta, D., Ferri, C. P., Guerra, M., ... & Liu,

- Z. (2012). Strain and its correlates among carers of people with dementia in low-income and middle-income countries. A 10/66 Dementia Research Group population-based survey. *International journal of geriatric psychiatry*, 27(7), 670-682.
10. Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S. G., Huntley, J., Ames, D., ... & Mukadam, N. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet*, 390(10113), 2673-2734.
  11. Morales G, I., Farías G, G., & Maccioni B, R. B. (2010). La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 48(1). doi:10.4067/s0717-92272010000200007
  12. Van Horssen, J., Wesseling, P., van den Heuvel, L. P., de Waal, R. M., & Verbeek, M. M. (2003). Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *The Lancet Neurology*, 2(8), 482-492. doi:10.1016/s1474-4422(03)00484-8
  13. Farlow MR. (2005). Moderate to severe Alzheimer disease: Definition and clinical relevance. *Neurology* ;65(6, Supplement 3):S1-4.
  14. Henry-Feugeas MC. (2008). Alzheimer's disease in late-life dementia: a minor toxic consequence of devastating cerebrovascular dysfunction. *Med Hypotheses*, 70(4):866-75.
  15. Casey DA, Antimisiaris D, O'Brien J. (2010). Drugs for Alzheimer's disease: are they effective P T, 35(4),208-11.
  16. Van Hoesen GW, Hyman BT. (1990). Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*, 83,445-57.
  17. Yang HD, Kim DH, Lee SB, Young LD. (2016) History of Alzheimer's disease. *Dement Neurocognitive Disord*,15(4),115-21.
  18. Libre GJJ, García AL, Díaz MJP. (2014). Demencias y enfermedad de Alzheimer un recorrido por la historia. *Geroinfo*
  19. Murrell, J. R., Hake, A. M., Quaid, K. A., Farlow, M. R., & Ghetti, B. (2000). Early-Onset Alzheimer Disease Caused by a New Mutation (V717L) in the Amyloid Precursor Protein Gene. *Archives of Neurology*, 57(6), 885. doi:10.1001/archneur.57.6.885

20. Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Hardy, J. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704–706. doi:10.1038/349704a0
21. Contreras C, Condor I, Atencio J, Atencio M. (2019). Prevalencia de demencia y funcionalidad en una clínica geriátrica de Huancayo, Perú, 2016-2017. *An Fac Med (Lima Peru : 1990)*, 80(1),51–5.
22. Mayeux R, Stern Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*
23. Review. *Biol Chem [Internet]*. 1997;378(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.1515/bchm.1997.378.9.937>
24. Rahimi F, Li H, Sinha S, Bitan G. (2016). Modulators of amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ) self-assembly. In: *Developing Therapeutics for Alzheimer's Disease*. Elsevier, 97–191.
25. Medeiros R, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM. (2011). The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders: Role of tau in AD and related disorders. *CNS Neurosci Ther*, 17(5), 514–524.
26. Hellström-Lindahl E. (2000). Modulation of  $\beta$ -amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation by acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*, 393(1–3), 255–263.
27. Gra Menéndez Silvia, Padrón Pérez Noel, Libre Rodríguez Juan de Jesús. (2002). Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer. *Rev Cubana Invest Bioméd*, 21( 4 ), 253-261.
28. Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2014). ApoE and  $A\beta$  in Alzheimer's Disease: Accidental Encounters or Partners *Neuron*, 81(4), 740–754. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.045
29. Nguyen, K., & Rabenstein, D. L. (2016). Interaction of the Heparin-Binding Consensus Sequence of  $\beta$ -Amyloid Peptides with Heparin and Heparin-Derived Oligosaccharides. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(9), 2187–2197. doi:10.1021/acs.jpcc.5b12235
30. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. (2011). Apolipoprotein E: from lipid

- transport to neurobiology. *Prog Lipid Res*, 50(1),62–74.
31. Lambert JC, Pasquier F, Cottel D, Frigard B, Amouyel P, Chartier-Harlin MC. (1998). A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 7(3), 533–540.
  32. Tensaouti Y, Stephanz EP, Yu T-S, Kernie SG. ApoE regulates the development of adult newborn hippocampal neurons. *eNeuro* [Internet]. 2018;5(4). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1523/ENEURO.0155-18.2018>
  33. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, et al. (1982). Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J Lipid Res*, 23(6), 911–914.
  34. Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, et al. (2011). APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry*, 16(9), 903–907.
  35. Bu G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*, 10(5),333–344.
  36. Mahley RW, Huang Y. (2012). Apolipoprotein e sets the stage: response to injury triggers neuropathology. *Neuron*, 76(5),871–885.
  37. Uddin MS, Kabir MT, Al Mamun A, Abdel-Daim MM, Barreto GE, Ashraf GM. (2009). APOE and Alzheimer's Disease: Evidence Mounts that Targeting APOE4 may Combat Alzheimer's Pathogenesis. *Mol Neurobiol*, 56(4),2450–2465.
  38. Safieh M, Korczyn AD, Michaelson DM. (2019). ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *BMC Med*, 17(1):64.
  39. Donoso A. La enfermedad de Alzheimer. *Rev chil neuro-psiquiatr* [Internet]. 2003;41. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-92272003041200003>
  40. Moreno Valladares Adriana, Cartagena Perdomo Álvaro E, Mora Pabón Guillermo. (2006). Apolipoproteína E y enfermedad cardiovascular. *rev.fac.med*, 54(1), 53-65.
  41. Frieden, C., & Garai, K. (2012). Structural differences between apoE3 and apoE4 may be useful in developing therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 8913–8918. doi:10.1073/pnas.1207022109
  42. Apolipoprotein E [Internet]. Uniprot.org. [citado el 10 de enero de 2022].

Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02649>

43. Welsh KA, Butters N, Hughes JP, Mohs RC, Heyman A. (1992). Detection and staging of dementia in Alzheimer's disease. Use of the neuropsychological measures developed for the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease. *Arch Neurol*, 49(5), 448–452.
44. Herrera-Rivero M, HernándezAguilar ME, Manzo J, Aranda-Abreu GE. (2010). Enfermedad de Alzheimer: inmunidad y diagnóstico. *Rev Neurol*, 51,153-164
45. Welsh KA, Butters N, Hughes JP, Mohs RC, Heyman A. (1992). Detection and staging of dementia in Alzheimer's disease. Use of the neuropsychological measures developed for the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease. *Arch Neurol*, 49(5), 448–452.
46. Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. (2012). Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71(4), 266–273.
47. Baltés C, Princz-Kranz F, Rudin M, Mueggler T. (2011). Detecting amyloid- $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Methods Mol Biol*, 711, 511–533.
48. Massoud F, Léger GC. (2011). Pharmacological treatment of Alzheimer disease. *Can J Psychiatry*, 56(10), 579–88.
49. Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2012). Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(1), 19–33. doi:10.1177/1756285612461679
50. Chen, G., Xu, T., Yan, Y., Zhou, Y., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. doi:10.1038/aps.2017.28
51. Ma, Q., Cornelli, U., Hanin, I., Jeske, W., Linhardt, R., Walenga, J., ... Lee, J. (2007). Heparin Oligosaccharides as Potential Therapeutic Agents in Senile Dementia. *Current Pharmaceutical Design*, 13(15), 1607–1616. doi:10.2174/138161207780765918
52. Bergamaschini, L., Rossi, E., Vergani, C., & De Simoni, M. G. (2009). Alzheimer's Disease: Another Target for Heparin Therapy. *The Scientific World JOURNAL*, 9, 891–908. doi:10.1100/tsw.2009.100

53. Scazziota, A., & Pons, S. (2017). Efectos de la heparina más allá del antitrombótico. *Hematología*, 21, 166-175.
54. Dong, J., Peters-Libeu, C. A., Weisgraber, K. H., Segelke, B. W., Rupp, B., Capila, I., Linhardt, R. J. (2001). Interaction of the N-terminal domain of apolipoprotein E4 with heparin. *Biochemistry*, 40(9), 2826–2834.
55. Futamura, M., Dhanasekaran, P., Handa, T., Phillips, M. C., Lund-Katz, S., & Saito, H. (2005). Two-step mechanism of binding of apolipoprotein E to heparin: Implications for the kinetics of apolipoprotein e-heparan sulfate proteoglycan complex formation on cell surfaces. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5414–5422.
56. Bergamaschini L, Rossi E, Vergani C, De Simoni MG. (2009). Alzheimer's disease: Another target for heparin therapy. *ScientificWorldJournal*, 9, 891–908.
57. Nguyen, K., & Rabenstein, D. L. (2016). Interaction of the heparin-binding consensus sequence of  $\beta$ -amyloid peptides with heparin and heparin-derived oligosaccharides. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 120(9), 2187–2197.
58. Blennow K, Zetterberg H. (2018). Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J Intern Med*, 284(6), 643–663
59. Decker Y, Németh E, Schomburg R, Chemla A, Fülöp L, Menger MD, et al. (2021). Decreased pH in the aging brain and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 101:40–9.
60. Prasad, H., & Rao, R. (2018). Amyloid clearance defect in ApoE4 astrocytes is reversed by epigenetic correction of endosomal pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(28), E6640-E6649.
61. Lewars, E. *Computational chemistry. Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*, 2nd ed., Springer, 2011.
62. Leiva, Ezequiel Pedro M.; Estrin, Dario Ariel. (2011). *Química computacional: Simulaciones matemáticas del comportamiento de átomos y moléculas*; Asociación Civil Ciencia Hoy; Ciencia Hoy, 21,46-50
63. Goh GB, Hodas NO, Vishnu A. (2017). Deep learning for computational chemistry. *J Comput Chem*, 38(16), 1291–307.
64. McArdle S, Endo S, Aspuru-Guzik A, Benjamin SC, Yuan X. (2020). Quantum

- computational chemistry. *Rev Mod Phys* [Internet],92(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1103/revmodphys.92.015003>
65. Kollman P. (1987). *Molecular Modeling*. *Annu Rev Phys Chem*, 38(1), 303–16.
  66. Hammond, B. L., Lester, Jr., W. A. and Reynolds, P. J. (1997). *Monte Carlo Methods in Ab Initio Quantum Chemistry*. World Scientific, Singapore
  67. Feit, M. D., Fleck, J. A. and Steiger, A. (1982). Solution of the Schrödinger Equation by a Spectral Method, *Journal of Computational Physics*, 47(3), 412-433
  68. Aspuru-Guzik, A., Dutoi, A. D., Love, P. J. and Head-Gordon, M. (2005). Simulated Quantum Computation of Molecular Energies, *Science*, 309(5741), 1704-1707
  69. Masetti M, Rocchia W.(2014). Molecular mechanics and dynamics: numerical tools to sample the configuration space. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 19, 578–604.
  70. Young, D. (2004). *Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems*; John Wiley & Sons.
  71. Jensen, F. (2017). *Introduction to computational chemistry*; John wiley & sons.
  72. Duboue-Dijon, E.; Laage, D. (2015). *The Journal of Physical Chemistry*, 119, 8406–8418.
  73. Wells, B. A.; Chaffee, A. L. (2015). *Journal of chemical theory and computation*, 11, 3684–3695.
  74. Pottel, J.; Moitessier, N.(2016). *Reviews in Computational Chemistry*, 29, 152.
  75. Polanski J. (2009). *Chemoinformatics*. *Comprehensive Chemometrics*. Elsevier, 459–506.
  76. Pérez, Johnny. (2014). Métodos de simulación molecular: una revisión de las herramientas más actuales. *Revista Ingeniería*. 24.
  77. Cai W., Li J., and Yip S. (2012). *Molecular Dynamics*, *Comprehensive Nuclear Materials*. Elsevier, 1, 249-265
  78. *Molecular Dynamics — GROMACS 2019.4 documentation*. (s/f). [Gromacs.org](https://manual.gromacs.org/documentation/2019.4/reference-manual/algorithms/molecular-dynamics.html). Recuperado el 10 de enero de 2022, de <https://manual.gromacs.org/documentation/2019.4/reference-manual/algorithms/molecular-dynamics.html>
  79. *Lysozyme in Water*. (s/f). [Mdtutorials.com](http://www.mdtutorials.com/gmx/lysozyme/07_equil2.html). Recuperado el 10 de enero de 2022, de [http://www.mdtutorials.com/gmx/lysozyme/07\\_equil2.html](http://www.mdtutorials.com/gmx/lysozyme/07_equil2.html)

80. Yang, X.-S. (2019). Optimization algorithms. *Introduction to Algorithms for Data Mining and Machine Learning*, 45–65. doi:10.1016/b978-0-12-817216-2.00010-7
81. Molecular dynamics parameters (.mdp options) — GROMACS 2021.4 documentation [Internet]. Gromacs.org. [citado el 10 de enero de 2022]. Disponible en: <https://manual.gromacs.org/documentation/current/user-guide/mdp-options.html>
82. Guvench, O., & MacKerell, A. D. (2008). Comparison of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations. *Molecular Modeling of Proteins*, 63–88. doi:10.1007/978-1-59745-177-2\_4
83. Sweere, A. J. M., & Fraaije, J. G. E. M. (2017). Accuracy Test of the OPLS-AA Force Field for Calculating Free Energies of Mixing and Comparison with PAC-MAC. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(5), 1911–1923. doi:10.1021/acs.jctc.6b01106
84. Kurth, S., Marques, M. A. L., & Gross, E. K. U. (2005). Density-Functional Theory. *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*, 395–402. doi:10.1016/b0-12-369401-9/00445-9
85. Baseden, K. A., & Tye, J. W. (2014). Introduction to Density Functional Theory: Calculations by Hand on the Helium Atom. *Journal of Chemical Education*, 91(12), 2116–2123. doi:10.1021/ed5004788
86. Davidson, E. R., & Chakravorty, S. (1992). A test of the Hirshfeld definition of atomic charges and moments. *Theoretica Chimica Acta*, 83(5-6), 319–330. doi:10.1007/bf01113058
87. Overview of BIOVIA Materials Studio, LAMMPS, and GROMACS. (2019). *Molecular Dynamics Simulation of Nanocomposites Using BIOVIA Materials Studio, Lammmps and Gromacs*, 39–100. doi:10.1016/b978-0-12-816954-4.00002-4
88. Leeuw SW, Perram JW, Smith ER. (1980). Simulation of electrostatic systems in periodic boundary conditions. II. Equivalence of boundary conditions. *Proc R Soc Lond*, 373(1752), 57–66.
89. Schultz PA. (1990). Local electrostatic moments and periodic boundary conditions. *Phys Rev B Condens Matter*, 60(3), 1551–4.
90. Jalaie, M.; Lipkowitz, K. B. (2000). *Reviews in Computational Chemistry*, 14, 441–

- 486.
91. Morris GM, Lim-Wilby M. (2008). Molecular docking. *Methods Mol Biol*, 443, 365–82.
  92. Guedes IA, Magalhães CS, Dardenne LE. (2014). Receptor-ligand molecular docking. *Biophys Rev*, 6(1),75–87.
  93. Makov G, Payne MC. (1995). Periodic boundary conditions inab initio calculations. *Phys Rev B Condens Matter*, 51(7), 4014–4022.
  94. Rothman MJ, Lohr LL Jr. (1980). Analysis of an energy minimization method for locating transition states on potential energy hypersurfaces. *Chem Phys Lett*, 70(2), 405–9.
  95. Whitlow M, Teeter MM. (1986). An empirical examination of potential-energy minimization using the well-determined structure of the protein crambin. *J Am Chem Soc*, 108(23),63–72.
  96. Le Grand, SM, Merz, KM. (1993). La aplicación del algoritmo genético a la minimización de funciones de energía potencial. *J Glob Optim* 3, 49-66.
  97. Sargsyan K, Grauffel C, Lim C. (2017). How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *J Chem Theory Comput*, 13(4),1518–24.
  98. Knapp B, Frantal S, Cibena M, Schreiner W, Bauer P. (2011). Is an intuitive convergence definition of molecular dynamics simulations solely based on the root mean square deviation possible *J Comput Biol*, 18(8), 997–1005.
  99. Martínez L. (2015). Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. *PLoS One*, 10(3).
  100. Castillo MS. (2019). Relación entre la estructura y la dinámica en proteínas. [Argentina]: Instituto Tecnológico de Buenos Aires.
  101. Hydrogen bonds — GROMACS 2021.4 documentation [Internet]. Gromacs.org. [citado el 6 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://manual.gromacs.org/documentation/current/reference-manual/analysis/hydrogen-bonds.html>
  102. Borjian Boroujeni M, Shahbazi Dastjerdeh M, Shokrgozar M, Rahimi H, Omidinia

- E. (2021). Computational driven molecular dynamics simulation of keratinocyte growth factor behavior at different pH conditions. *Inform Med Unlocked*, 23(10).
103. Wang C, Greene D, Xiao L, Qi R, Luo R. (2017). Recent developments and applications of the MMPBSA method. *Front Mol Biosci*, 4-87.
104. Cañedo Andalia R, Rodríguez Labrada R, Vázquez Mojena Y. Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos: un palacio de la información para la medicina molecular. *Acimed* 2009;19(4). Disponible en: Dirección electrónica de la contribución [Consultado: día/mes/año]
105. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 235–42.
106. Tong JC, Ranganathan S. (2013). Scientific publications and databases. En: *Computer-Aided Vaccine Design*. Elsevier, 21–46.
107. Borgna, Karina Giselle; Fernández, María Laura; Risk, Marcelo; (2013). Herramienta web para post-análisis de simulaciones de dinámica molecular; Sociedad Argentina de Bioingeniería; *Revista Argentina de Bioingeniería*, 19(1), 24-28
108. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605–12.
109. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 14(1), 33–8, 27–8.
110. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng Des Sel*, 8(2), 127–34
111. Download PuTTY - a free SSH and telnet client for Windows [Internet]. Putty.org. [citado el 27 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.putty.org/>
112. WinSCP [Internet]. Winscp.net. 2021 [citado el 27 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://winscp.net/eng/index.php>
113. Context Software LLC [Internet]. Contextsoft.com. [citado el 27 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.contextsoft.com/>
114. Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, et al. (2018).

- Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci*, 27(1), 112–128.
115. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. (2005). PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res*, 33-37.
116. Mashiach E, Schneidman-Duhovny D, Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. (2008). FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic Acids Res*, 36,229 -232.
117. O. Trott, AJ Olson. (2010). AutoDock Vina: mejora de la velocidad y precisión del acoplamiento con una nueva función de puntuación, optimización eficiente y multiproceso, *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461
118. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, 5(4), 725–38.
119. Khoury, R., & Ghossoub, E. (2019). Diagnostic biomarkers of Alzheimer’s disease: a state-of-the-art review. *Biomarkers in Neuropsychiatry*, 1, 100005.
120. Janeiro, M., Ardanaz, C., Sola-Sevilla, N., Dong, J., Cortés-Erice, M., Solas, M., Puerta, E. & Ramírez, M. (2021). Biomarkers in Alzheimer’s disease. *Advances in Laboratory Medicine / Avances en Medicina de Laboratorio*, 2(1), 27-37.
121. Nguyen, T. T., Nguyen, T. D., Nguyen, T. K. O., & Vo, T. K. (2021). Advances in developing therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111623.
122. Williams, T., Borchelt, D. R., & Chakrabarty, P. (2020). Therapeutic approaches targeting Apolipoprotein E function in Alzheimer’s disease. *Molecular neurodegeneration*, 15(1), 1-19. Williams, T., Borchelt, D. R., & Chakrabarty, P. (2020). Therapeutic approaches targeting Apolipoprotein E function in Alzheimer’s disease. *Molecular neurodegeneration*, 15(1), 1-19.
123. Lanfranco, M. F., Ng, C. A., & Rebeck, G. W. (2020). ApoE lipidation as a therapeutic target in Alzheimer’s disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6336.
124. Mamun, A. A., Uddin, M., Bashar, B., Fahim, M., Zaman, S., Begum, Y., ... & Abdel-Daim, M. M. (2020). Molecular insight into the therapeutic promise of targeting APOE4 for Alzheimer’s disease. *Oxidative Medicine and Cellular*

Longevity, 2020.

125. Tachibana, M., Holm, M. L., Liu, C. C., Shinohara, M., Aikawa, T., Oue, H., ... & Kanekiyo, T. (2019). APOE4-mediated amyloid- $\beta$  pathology depends on its neuronal receptor LRP1. *The Journal of clinical investigation*, 129(3), 1272-1277.
126. Patel, S. (2019). Nutrition, Immunity, and Neurological Diseases. In *Nutrition and Immunity* (pp. 395-406). Springer, Cham.
127. Xing, R., Yuan, C., Li, S., Song, J., Li, J., & Yan, X. (2018). Charge-Induced Secondary Structure Transformation of Amyloid-Derived Dipeptide Assemblies from  $\beta$ -Sheet to  $\alpha$ -Helix. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(6), 1537-1542.
128. Schützmann, M. P., Hasecke, F., Bachmann, S., Zielinski, M., Hänsch, S., Schröder, G. F., ... & Hoyer, W. (2021). Endo-lysosomal A $\beta$  concentration and pH trigger formation of A $\beta$  oligomers that potently induce Tau missorting. *Nature Communications*, 12(1), 1-14.
129. Enriquez LF, Rueda A. Una revisión de técnicas básicas de neuroimagen para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas. *Revista Biosalud*. 2018. 17(2): 59-90. DOI: 10.17151/biosa.2018.17.2.5
130. Dupont-Wallois, L., Soulié, C., Sergeant, N., Wavrant-de Wrieze, N., Chartier-Harlin, M. C., Delacourte, A., & Caillet-Boudin, M. L. (1997). ApoE synthesis in human neuroblastoma cells. *Neurobiology of disease*, 4(5), 356-364.
131. Boschert, U., Merlo-Pich, E., Higgins, G., Roses, A. D., & Catsicas, S. (1999). Apolipoprotein E expression by neurons surviving excitotoxic stress. *Neurobiology of disease*, 6(6), 508-514.
132. Hatters, D. M., Zhong, N., Rutenber, E., & Weisgraber, K. H. (2006). Amino-terminal domain stability mediates apolipoprotein E aggregation into neurotoxic fibrils. *Journal of molecular biology*, 361(5), 932-944.
133. Ray, A., Ahalawat, N., & Mondal, J. (2017). Atomistic insights into structural differences between E3 and E4 isoforms of apolipoprotein E. *Biophysical journal*, 113(12), 2682-2694.
134. APOE - Apolipoprotein E precursor - Homo sapiens (Human) - APOE gene & protein. UniProt. Último acceso: 29 de noviembre de 2021.

<https://www.uniprot.org/uniprot/P02649>

135. Chen, J., Li, Q., & Wang, J. (2011). Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(36), 14813-14818.
136. Toyama, B. H., & Weissman, J. S. (2011). Amyloid structure: conformational diversity and consequences. *Annual review of biochemistry*, 80, 557-585.
137. Greenwald, J., & Riek, R. (2010). Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure*, 18(10), 1244-1260.
138. Gallardo, R., Ranson, N. A., & Radford, S. E. (2020). Amyloid structures: much more than just a cross- $\beta$  fold. *Current opinion in structural biology*, 60, 7-16.
139. Crescenzi, O., Tomaselli, S., Guerrini, R., Salvadori, S., D'Ursi, A. M., Temussi, P. A., & Picone, D. (2002). Solution structure of the Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) in an apolar microenvironment: Similarity with a virus fusion domain. *European Journal of Biochemistry*, 269(22), 5642-5648.
140. Enoxaparin. PubChem. Último acceso 29 de noviembre de 2021, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Heparin>