

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



***“EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS
CICLÓTIDOS PERTENECIENTES A LA FAMILIA
RUBIACEAE UBICADOS EN EL TERRITORIO
PERUANO CON LOS OLIGÓMEROS DEL
 β -AMILOIDE NORMAL Y DE LOS β -AMILOIDES
MUTADOS PRESENTES EN LA ENFERMEDAD
DEL ALZHEIMER MEDIANTE EL USO DE
MECÁNICA MOLECULAR.”***

Tesis presentada por la **Bachiller**
Paredes Rosan Carla De Los
Angeles

para optar el Título Profesional
de Ingeniera Biotecnóloga

Asesor: Dr. Gómez Valdez, Badhin

Arequipa – Perú
2018

Dedicatoria

Dedico el presente proyecto de tesis a Dios por darme las fuerzas necesarias para seguir adelante hasta en los momentos más difíciles. A mis padres por su paciencia en este largo proceso, por sus anhelos de superarme y ser una persona más preparada para la vida cada día.



Agradecimientos

No tengo palabras para agradecer el gran apoyo brindado por parte de mi asesor el *Dr. Badhin Gómez*, gracias a él he podido alcanzar varias metas a nivel personal y profesional, dentro de las cuáles se encuentra haber podido realizar pasantías en el exterior, ponencias y haber sido parte del proyecto de investigación de *ciclótidos*, a partir del cuál y gracias a su asesoría, he podido realizar y culminar este proyecto de tesis.

Agradezco a cada uno de los miembros del CIIM (Centro de investigación en Ingeniería Molecular) por ser como una gran familia, en donde hemos aprendido a convivir y sobre todo a apoyarnos mutuamente. Especialmente quiero agradecer a la Sra. Isabel, Haru, Diego, Dante, Angelita, Jorge y mis tomorrowland que me apoyaron en todo momento. A su vez también quiero agradecer a los miembros del Vicerrectorado de Investigación por su apoyo incondicional en todo aspecto, al CONCYTEC y CIENCIACTIVA por financiar el proyecto FONDECYT-139, ya que sin su aporte no hubiera sido posible llevar a cabo la presente investigación.

Agradezco al *Dr. Roberto Flores*, a su familia y a todos los miembros del grupo de Química Teórica por su gran hospitalidad y su transferencia de conocimientos en la pasantía en Guadalajara en el CUCEI.

Quiero agradecer a esa personita que no pudo estar presente físicamente pero sé que me apoya incondicionalmente al igual que yo a ella, gracias *Mary Butrón* por ser mi hermana incondicional, gracias a mi grupo de amigos que siempre me han sacado una sonrisa o una carcajada en mis momentos más críticos (Diego, Lizardo, Patty, Joseph y Rodrigo), gracias a mis *go* por siempre presionarme para terminar la tesis, y gracias a todos aquellos seres queridos que de una u otra manera contribuyeron en este camino, especialmente a ti.

Contenido

Contenido	I
Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas	VIII
Glosario	IX
Resumen	XIII
Abstract	XIV
1. Introducción	1
Objetivos	3
1.1. Objetivo General	3
1.2. Objetivos Específicos	3
Hipótesis	4
2. Marco Teórico	5
2.1. Enfermedad del Alzheimer	5

2.1.1.	Historia y evolución	5
2.1.2.	Epidemiología	6
2.1.3.	Hipótesis sobre el origen de la enfermedad	7
2.1.4.	Clases de Alzheimer	8
2.1.5.	Procesamiento del péptido β -amiloide	10
2.1.6.	Formas de agregación del β -amiloide	15
2.1.7.	Vías de degradación del β -amiloide	17
2.1.8.	Impedimento sináptico	18
2.1.9.	Tratamiento de la Enfermedad del Alzheimer	20
2.2.	Ciclótidos	21
2.2.1.	Estructura	21
2.2.2.	Los ciclótidos en la biotecnología	23
2.2.3.	Biosíntesis de los ciclótidos	25
2.3.	Química Computacional	27
2.3.1.	Mecánica Molecular	28
2.3.2.	Condiciones Periódicas de Contorno (CPC)	33
2.3.3.	Energía de Minimización	35
2.3.4.	Dinámica Molecular	37
2.3.5.	Paralelización	40
2.3.6.	Acoplamiento Molecular y la Energía Libre de Unión	40
2.3.7.	Post-procesamiento	42
3.	Materiales y Métodos	45
3.1.	Detalles Computacionales	45

3.2. Métodos	46
3.2.1. Determinación de las estructuras iniciales de los ciclótidos presentes en la familia Rubiaceae susceptibles de interactuar con el oligómero del β -amiloide normal y los oligómeros de los β -amiloides mutados	46
3.2.2. Modelación y evaluación del oligómero del β -amiloide normal y los oligómeros de los β -amiloides mutados	46
3.2.3. Generación de hipersuperficies de potencial electrostático, a partir de la interacción ciclótido-oligómero de β -amiloide normal y de la interacción ciclótido-oligómeros de β -amiloides mutados	49
3.2.4. Acoplamiento molecular de los ciclótidos de la familia Rubiaceae con el oligómero del β -amiloide normal y los oligómeros de los β -amiloides mutados y proposición de los sitios favorables de interacción	50
4. Resultados y Discusión	51
Conclusiones	91
Recomendaciones	92
Bibliografía	93

Índice de Figuras

2.1. Prevalencia estimada de la demencia en personas con 50 años a más.	6
2.2. Generación de β -amiloides a partir de la proteína precursora amiloidogénica. .	10
2.3. Estructura del gen y ARNm de la proteína precursora del β -amiloide.	11
2.4. Vías del procesamiento de la PPA.	12
2.5. Secuencia y estructura de las fibrillas del monómero de A β 40 y A β 42.	14
2.6. Representación esquemática de la producción y agregación de los β -amiloides.	15
2.7. Vistas en 3D de las estructuras del cierre estérico.	16
2.8. Biología celular de la producción y degradación del péptido β -amiloide.	18
2.9. Ciclo del glutamato.	19
2.10. Estructura del ciclótido caripe.	21
2.11. Secuencia y estructura del alineamiento de los ciclótidos pertenecientes a las subfamilias Möbius (<i>kalata B1</i>) y brazalete (<i>CyO2</i>).	22
2.12. Representación esquemática de los pasos requeridos para la biosíntesis del ciclótido.	26
2.13. Términos fundamentales de la energía de un campo de fuerza.	29
2.14. Representación de la energía conformacional de un ángulo diedro.	31
2.15. Diedro impropio del ciclobutano.	31
2.16. Representación de la Energía de Interacción.	33

2.17. Condiciones Periódicas de Contorno en dos dimensiones.	34
2.18. Método de Minimización Steepest Descent.	36
2.19. Búsqueda de la Malla o Grid.	36
2.20. Análisis de la Estructura Secundaria de la Proteína (DSSP).	43
2.21. Ploteo de Ramachandran.	44
4.1. Estructuras iniciales de los dodecámeros de β -amiloide.	51
4.2. Estructuras iniciales de los dodecámeros de β -amiloide.	52
4.3. Estructura inicial del ciclótido caripe 4.	52
4.4. Resultados de la estabilización del ciclótido.	53
4.5. Resultados de la estabilización del ciclótido.	54
4.6. Etapas para la obtención de estructuras estables para los dodecámeros de β -amiloides.	55
4.7. Estructuras de los dodecámeros después de la simulación de dinámica molecular.	56
4.8. RMSD de los dodecámeros de β -amiloides estabilizados.	57
4.9. RMSF de los dodecámeros de β -amiloides estabilizados.	58
4.10. Gráfico de Ramachandran del dodecámero de β -amiloide normal.	59
4.11. Gráfico de Ramachandran del dodecámero de la mutación ártica.	60
4.12. Gráfico de Ramachandran del dodecámero de la mutación flamenca.	61
4.13. Gráfico de Ramachandran del dodecámero de la mutación holandesa.	62
4.14. Gráfico de Ramachandran del dodecámero de la mutación italiana.	63
4.15. Gráfico de DSSP del dodecámero de β -amiloide normal.	64
4.16. Gráfico de DSSP del dodecámero perteneciente a la mutación ártica.	65
4.17. Gráfico de DSSP del dodecámero perteneciente a la mutación flamenca.	66
4.18. Gráfico de DSSP del dodecámero perteneciente a la mutación holandesa.	67

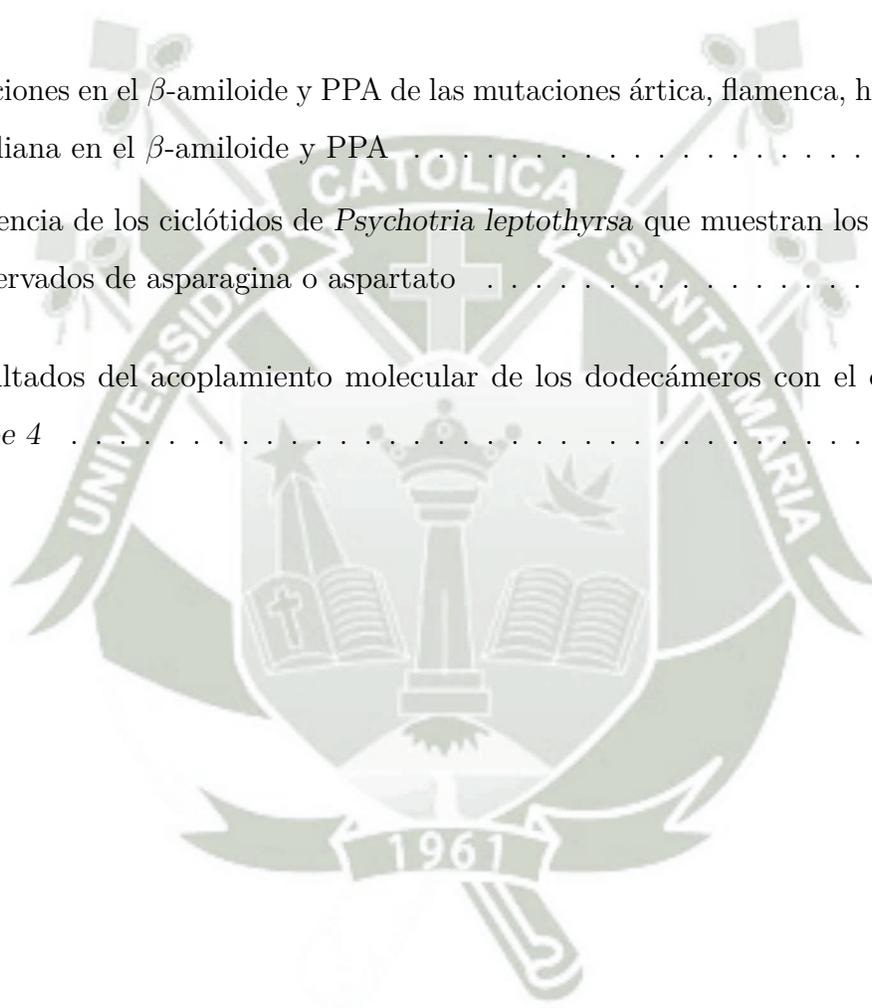
4.19. Gráfico de DSSP del dodecámero perteneciente a la mutación italiana.	68
4.20. Mapas de potencial electrostático del β -amiloide normal.	69
4.21. Mapas de potencial electrostático de la mutación ártica.	70
4.22. Mapas de potencial electrostático de la mutación flamenca.	71
4.23. Mapas de potencial electrostático de la mutación holandesa.	72
4.24. Mapas de potencial electrostático de la mutación italiana.	73
4.25. Estructuras acopladas de los dodecámeros de β -amiloide con el ciclótido <i>Caripe 4</i>	75
4.26. Etapas para la obtención de estructuras acopladas estables para los dodecámeros de β -amiloide con el ciclótido <i>caripe 4</i>	76
4.27. Estructuras de los dodecámeros acoplados con el ciclótido <i>caripe 4</i> después de la simulación de dinámica molecular.	77
4.28. RMSD del acoplamiento molecular de dodecámeros de β -amiloide con el ciclótido <i>caripe 4</i>	78
4.29. RMSF de los dodecámeros de β -amiloide estabilizados.	79
4.30. Gráfico del RMSD y RMSF del acoplamiento molecular de la mutación flamenca con el ciclótido <i>caripe 4</i>	80
4.31. Gráfico de Ramachandran del acoplamiento molecular del dodecámero normal con el ciclótido <i>caripe 4</i>	81
4.32. Gráfico de Ramachandran del acoplamiento molecular de la mutación ártica con el ciclótido <i>caripe 4</i>	82
4.33. Gráfico de Ramachandran del acoplamiento molecular de la mutación flamenca con el ciclótido <i>caripe 4</i>	83
4.34. Gráfico de Ramachandran del acoplamiento molecular de la mutación holandesa con el ciclótido <i>caripe 4</i>	84
4.35. Gráfico de Ramachandran del acoplamiento molecular de la mutación italiana con el ciclótido <i>caripe 4</i>	85

4.36. Gráfico de DSSP del acoplamiento molecular del dodecámero normal.	86
4.37. Gráfico de DSSP del acoplamiento molecular de la mutación ártica.	87
4.38. Gráfico de DSSP del acoplamiento molecular de la mutación flamenca.	88
4.39. Gráfico de DSSP del acoplamiento molecular de la mutación holandesa.	89
4.40. Gráfico de DSSP del acoplamiento molecular de la mutación italiana.	90



Índice de Tablas

2.1. Posiciones en el β -amiloide y PPA de las mutaciones ártica, flamenca, holandesa e italiana en el β -amiloide y PPA	7
2.2. Secuencia de los ciclótidos de <i>Psychotria leptothyrsa</i> que muestran los residuos conservados de asparagina o aspartato	25
4.1. Resultados del acoplamiento molecular de los dodecámeros con el ciclótido <i>caripe 4</i>	74



Glosario

1. $A\beta$ -40 y $A\beta$ -42: β -amiloide de 40 y 42 aminoácidos de longitud, respectivamente.
2. ADAM: A Desintegrin And Metalloprotease 9, 10 and 17 family, traducido al español “Una familia de Desintegrinas y metaloproteasas”, son enzimas α -secretasas, pertenecientes a la familia de desintegrinas y metaloproteasas.
3. AEP: Asparaginyl Endopeptidase Enzyme, traducido al español “Enzima Asparaginil Endopeptidasa”.
4. APOE: Apolipoproteína tipo E.
5. BACE-1: Beta-secretase enzyme type 1, traducido al español “Enzima beta-secretasa de tipo 1”.
6. Core: Unidad de cálculo del hardware que ejecuta instrucciones, un procesador tiene más de un core.
7. CPC: Condiciones Periódicas de Contorno.
8. CPU: Central Processing Unit, traducido al español “Unidad de Procesamiento Central”, es el hardware dentro de un ordenador u otros dispositivos programables, que interpreta las instrucciones de un programa informático mediante la realización de las operaciones básicas aritméticas, lógicas y de entradas/salidas del sistema.
9. CTR: C-Terminal Domain, traducido al español “Dominio C-terminal”.
10. CUDA: Compute Unified Device Architecture, traducido al español “Dispositivo que emplea una Arquitectura de Cálculo Unificada”, es un cálculo en paralelo.

11. DD: Descomposición del Dominio.
12. DICA: Dominio Intracelular del PPA.
13. DM: Dinámica Molecular son métodos que estudian a las moléculas en movimiento.
14. DSSP: Análisis de la Estructura Secundaria de la Proteína.
15. EAITA: Enfermedad del Alzheimer de Inicio Tardío.
16. EAITE: Enfermedad del Alzheimer de Inicio Temprano.
17. EDI: Enzima Degradadora de la Insulina.
18. EPE: Enmallado de la Partícula de Ewald.
19. FCT- α : Fragmento Carboxil terminal de 89 aminoácidos.
20. FCT- β : Fragmento Carboxil terminal de 99 aminoácidos.
21. FDA: Food and Drug Administration, traducido al español “Administración de Fármacos y Alimentos”.
22. Gln sintetasa: Enzima convertidora del glutamato en glutamina.
23. GROMACS software: Groningen Machine for Chemical Simulations, traducido al español “Máquina de Groningen para Simulaciones Químicas”.
24. GPU: Graphics Processor Unit, traducido al español “Unidad Procesadora de Gráficos”, la cuál es más rápida y más eficiente que los procesadores convencionales para tipos particulares de cálculos. Un GPU está asociado a un nodo particular y un socket dentro de dicho nodo.
25. Hilo: Flujo de instrucciones para que sea ejecutado por un core. Varios programas se basan en múltiples hilos como el CUDA, OpenMPI y GROMACS para procesadores x86.
26. MM: Mecánica Molecular se basa en el modelo de los átomos y enlaces de las moléculas.

27. MoCoTI-I: Momordica cochinchinensis Tripsin Inhibitor - Type I, traducido al español “Ciclótido Inhibidor de Tripsina tipo I del Momordica cochinchinensis”.
28. MPI: Message Passing Interface, traducido al español “Interfaz que permite el Paso de Mensajes”, el esquema de paralelización multi-nodo, el cual posee un lenguaje estandarizado en donde los programas pueden estar escritos para que se realice el trabajo por medio de más de un nodo.
29. NCC: Nodo Cíclico de Cistina.
30. NMDA: N-methyl-D-aspartate, traducido al español “Ácido N-metil D-aspartico”.
31. NTR: N-Terminal Domain, traducido al español “Dominio N-terminal”.
32. OpenMP: Open Multi-Processing, traducido al español “Multiprocesador Abierto o Libre”, técnica estandarizada que soporta varios compiladores para compartir una carga de trabajo sobre varios cores, casi siempre se combina con MPI para lograr un paralelismo MPI/OpenMP.
33. OPLS-AA: Optimized Potencial for Liquids Simulation - All Atoms, traducido al español “Potencial Optimizado para realizar Simulaciones con Solvente con Todos los Átomos”.
34. PDB: Protein Data Bank, traducido al español “Banco de Datos de las Proteínas”.
35. PPA: Proteína Precursora del β -amiloide.
36. PSEN 1 o PSEN2: genes de la Presenilina 1 o Presenilina 2, son subunidades de la γ -secretasa.
37. Rank: En MPI, un rank es el agrupamiento más pequeño del hardware usado en la paralelización multi-nodo. Algunas veces un MPI rank es llamado un proceso MPI.
38. RE: Retículo Endoplasmático.
39. RMSD: Root Mean Square Deviation, traducido al español “Raíz Cuadrática de la Desviación Media”.

40. RMSF: Root Mean Square Fluctuation, traducido al español “Raíz Cuadrática Media de las Fluctuaciones por Aminoácido”.
41. SFTI-1: Sunflower Tripsin Inhibitor - Type 1, traducido al español “Ciclótido Inhibidor de Tripsina tipo I del Girasol”.
42. SPC216: Single Point Water, traducido al español “Punto Único de Agua”.
43. sPPA α : Fragmento proteolítico soluble del corte del PPA con la enzima α -secretasa.
44. sPPA β : Fragmento proteolítico soluble del corte del PPA con la enzima β -secretasa.
45. SUP: Sistema Ubiquitina Proteosoma.
46. Topologías: el archivo de la topología en GROMACS tiene una descripción completa de todas las interacciones que se encuentran en el péptido o proteína.
47. TGLAS: Transportador homólogo del glutamato correspondiente al TEAA-1.
48. TGL-1: Transportador homólogo del glutamato correspondiente al TEAA-2, se expresan en los astrocitos.
49. TVGLU1 y TVGLU2: Transportadores vesiculares del glutamato.

Resumen

La prevalencia de la enfermedad del Alzheimer se incrementará en países en vías de desarrollo en los próximos 30 años. Existen 2 clases de Alzheimer; la primera es el Alzheimer Tardío (EAITA) que se expresa en el gen de la APOE $\epsilon 4$. La segunda es el Alzheimer Temprano (EAITE) y se desarrolla por mutaciones en los genes de la PPA, las más importantes son: ártica(E22G), holandesa(E22Q), flamenca(A21G) e italiana(E22K). Estudios adicionales han mostrado que el β -amiloide juega un rol importante cuando forma agregados (oligómeros) en la sinapsis, llevando a una pérdida disfuncional de la memoria y a una muerte neuronal. En la actualidad, los fármacos aprobados por la FDA sólo atenúan los síntomas de la enfermedad por un periodo de tiempo, por lo cuál no existe un tratamiento que pueda detener el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, los productos naturales han demostrado tener un efecto neuroprotector hacia los oligómeros de β -amiloide. Por ende, el objetivo del presente estudio fue usar ciclótidos (metabolitos secundarios) para desestabilizar el oligómero del β -amiloide normal y los oligómeros de β -amiloides mutados usando mecánica molecular. Primero, se obtuvo el dodecámero de β -amiloide normal a partir del PDB:2MXU, con esta estructura se construyeron las cuatro mutaciones. Luego, se preparó el dodecámero de β -amiloide normal, los dodecámeros mutados y los ciclótidos con iones y moléculas de agua para simular un ambiente fisiológico. Se realizó una simulación de dinámica molecular de 100 ns usando el ensamble canónico para mantener el número de átomos, volumen y temperatura constantes a lo largo de la simulación. Finalmente, se realizó un acoplamiento molecular con el ciclótido más estable con cada uno de los dodecámeros. Nuestros hallazgos mostraron que el ciclótido logró desestabilizar el dodecámero flamenca, lo que conllevaría a una mejora cognitiva en las etapas tempranas del EAITE.

Palabras clave: Alzheimer, ciclótidos, mecánica molecular.

Abstract

The prevalence of Alzheimer disease will increase in developing countries in the next 30 years. There are two classes of Alzheimer disease; the first one is Late-Onset-Alzheimer-Disease (LOAD) that is mainly expressed in the allelic variant $\epsilon 4$ of APOE gene. The second is Early-Onset-Alzheimer-Disease (EOAD) mainly developed by mutations in APP gene which are between the aminoacids 21 and 22 (artic (E22G), dutch(E22Q), flemish(A21G) and italian(E22K).); moreover, further studies have shown that β -amyloid played an important role when they form aggregates (oligomers) in the synapsis leading to a dysfunctional memory loss and a neuronal death. Actually, the available drugs approved by the FDA (Food and Drug Administration) only attenuates the disease symptoms for a period of time, so there is not treatment which can stop the development of the disease. On the other hand, natural products have shown a neuroprotective effect toward β -amyloid oligomers. Having this insight, the aim of this study was to use cyclotides (secondary metabloites) to destabilize normal β -amyloid oligomer and mutated β -amyloid oligomers using molecular mechanics. First of all, we obtained our normal β -amyloid dodecamer from PDB: 2MXU, from this structure we built our four mutations. Then, we prepared our normal β -amyloid dodecamer, mutated β -amyloid dodecamers and cyclotides with ions and water molecules to simulate a physiological environment, we performed a molecular dynamic simulation for 100 ns using a canonical ensemble to keep the atoms, volume and temperature constant along the simulation. Finally, we did a molecular docking with the most stable cyclotide with each one of the dodecamers. Our findings shown that the cyclotide could destabilize most Flemish dodecamer, which can lead to a cognitive improvement in the early stages of EOAD.

Key words: Alzheimer, cyclotides, molecular mechanics.

Capítulo 1

Introducción

La enfermedad del Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa asintomática en los primeros 20 años de desarrollo, es la más común y mortal y se produce por una acumulación de placas seniles en el cerebro [1]. Su tratamiento se basa en varias hipótesis (amiloidogénica, colinérgica y de la proteína tau) [2, 3, 4], sin que los pacientes presenten una mejora cognitiva por un periodo de tiempo prolongado [5]. Sin embargo, las investigaciones se han enfocado en la hipótesis amiloidogénica para encontrar un óptimo tratamiento para la enfermedad. Dado que esta hipótesis postula que los fragmentos solubles de β -amiloides (oligómeros) procesados por la PPA (Proteína Precursora Amiloidogénica), se acumulan en la hendidura sináptica, conduciendo a un leve impedimento sináptico, el cuál se magnifica cuando los oligómeros de β -amiloides forman agregados de alto peso molecular (protofibrillas y fibrillas de β -amiloides) [6]. Además, existen dos clases de Alzheimer, la primera es el Alzheimer tardío (EAITA) [7], la cual padecen las personas mayores de 60 años debido a la predisposición genética de la variante alélica $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (*APOE* $\epsilon 4$), que se encuentra presente en un 40 - 65 % de las personas que padecen esta clase de enfermedad. Por otro lado, la segunda clase de Alzheimer es el Alzheimer Temprano o Familiar (EAITE) [8], la cual padecen las personas menores de 50 años e involucra mutaciones (ártica, flamenca, holandesa e italiana) [9, 10, 11, 12] dentro de los aminoácidos 21 y 22 del β -amiloide de 42 aminoácidos ($A\beta$ -42) [13], siendo esta especie la más citotóxica de los β -amiloides. Un estudio de las células neuronales de pacientes con Alzheimer esporádico y Alzheimer familiar mostró que el fármaco DHA, el cuál falló en ensayos

clínicos puede combatir oligómeros de $A\beta$ -42 en algunos pacientes que padecen de Alzheimer, mejorando levemente su cognición [14]; no obstante, el tratamiento del Alzheimer empleando fármacos aprobados por la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos) como el donazepil y la rivastigmina [15]. sólo palearon los síntomas por un periodo de tiempo determinado, inhibiendo la enzima acetil colinesterasa con graves efectos secundarios [1]. Se han realizado varios estudios experimentales empleando anticuerpos como el aducanumab [16] con poco éxito en las fases clínicas para inhibir las diversas especies de β -amiloides. Por consiguiente, debido a los constantes fracasos en las fases clínicas [17], se debe comprender mejor los enlaces que unen a la proteína (oligómeros de β -amiloide de 42 aminoácidos) con los ligandos. Para lograr esto, se han visto las ventajas de emplear la química computacional usando metabolitos secundarios de plantas, como ligandos, que han dado buenos resultados [18]. Por ejemplo, el diseño de moléculas pequeñas como la curcumina y la nornicotina glicosilada ha demostrado modular la agregación de los β -amiloides y su posterior oligomerización [19]. Los ciclótidos pertenecen a estos péptidos pequeños y pueden ser empleados en el diseño de fármacos gracias a su termoestabilidad y resistencia conferidas por sus tres puentes disulfuros y su estructura cíclica [20]. Estos péptidos cíclicos provienen principalmente de la familia de las Rubiaceae y tienen varias actividades biológicas como la anti-VIH [21], antagonista de la neurotensina [22] que también es empleada en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Alzheimer. La mecánica molecular, que se encuentra dentro del campo de la química computacional, nos ayudará a dilucidar las interacciones no covalentes que se llevarán a cabo durante las tres etapas de la dinámica molecular y el posterior acoplamiento entre los dodecámeros de β -amiloide con los ciclótidos. Esto será posible gracias a que las simulaciones de mecánica molecular, permiten que los enlaces se contraigan o se elonguen para lograr una optimización geométrica de cada una de las proteínas por separado y cuando ambas se encuentran acopladas [23]. Esto nos permitiría comprender si el ciclótido, que se encuentra más estable, podría ser empleado en futuros estudios para desestabilizar tanto al dodecámero de β -amiloide normal como a los dodecámeros de β -amiloides mutados.

Objetivos

1.1. Objetivo General

- Evaluar la interacción de los ciclótidos pertenecientes a la familia Rubiaceae ubicados en el territorio peruano con los oligómeros del β -amiloide normal y de los β -amiloides mutados presentes en la Enfermedad del Alzheimer mediante el uso de la mecánica molecular.

1.2. Objetivos Específicos

- Determinar las estructuras de menor energía de los ciclótidos presentes en la familia Rubiaceae, susceptibles de interactuar con los oligómeros del β -amiloide normal y de los β -amiloides mutados.
- Modelar y evaluar los oligómeros del β -amiloide normal y de los β -amiloides mutados.
- Generar hipersuperficies de potencial electrostático, para los procesos de interacción ciclótido – proteína, tanto para el oligómero del β -amiloide normal como para los oligómeros de los β -amiloides mutados.
- Evaluar la interacción de los ciclótidos de la familia Rubiaceae con el oligómero del β -amiloide normal y los oligómeros de β -amiloides mutados.

Hipótesis

Dado que la utilización de los métodos bioinformáticos de simulación y acoplamiento molecular nos permiten generar y evaluar la interacción de los ciclótidos frente a los oligómeros de β -amiloide, es probable identificar y correlacionar el efecto generado por los ciclótidos presentes en la familia de las Rubiaceae sobre los oligómeros de β -amiloide en su vecindad cercana.



Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Enfermedad del Alzheimer

2.1.1. Historia y evolución

La enfermedad del Alzheimer o demencia, fue descubierta por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer hace más de 100 años, sin embargo, no fue hasta los últimos 70 años donde se le consideró como la enfermedad neurodegenerativa más común y mortal a nivel mundial [1]. Según estudios [24], esta enfermedad aqueja a la población mayor de 60 años y es asintomática los primeros 20 años, luego comienzan los primeros síntomas de alerta, como la dificultad para recordar información nueva, terminar algunos quehaceres del hogar o del trabajo, así como para comunicarse. Después, la enfermedad continúa empeorando y los pacientes llegan a tener un Alzheimer moderado, donde empiezan a olvidar a sus seres queridos y confundir el espacio-tiempo. Finalmente, presentan un Alzheimer severo donde pierden totalmente sus funciones, tanto cognitivas como sus habilidades funcionales (comer, bañarse, caminar), llegando a depender completamente de los cuidados familiares [25]. Esta pérdida se da por los cambios fisiológicos que ocurren en la sinapsis, donde un cerebro sano puede realizar hasta 100 trillones de sinapsis. Sin embargo, un cerebro que presenta la enfermedad del Alzheimer presenta acumulación de oligómeros β -amiloides entre la sinapsis y los ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas, conllevándolas a la muerte neuronal y al impedimento cognitivo.

2.1.2. Epidemiología

En el año 2015, se reportaron 46 millones de personas que padecen demencia a nivel mundial [26] (figura 2.1). A su vez, el cuidado de las personas con demencia tiene un gran impacto económico destinándose para este propósito cerca de 818 millones de dólares, dicho monto se triplicará para el año 2050 al igual que el número de personas que padecen demencia [27]. En el mismo año, se reportó que en el Perú no existe una estadística del número de personas que padecen demencia; sin embargo, estimaciones internacionales revelan que la prevalencia de la demencia es de un 10%, (300 mil peruanos) (Unidad de Demencia del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, 2015). No obstante, se calcula que uno de cada tres peruanos padecen demencia, lo cual refleja que un tercio de la población es afectada por la enfermedad y seguirá en aumento en los próximos años (Asociación Peruana de Alzheimer y Otras Demencias, 2015).

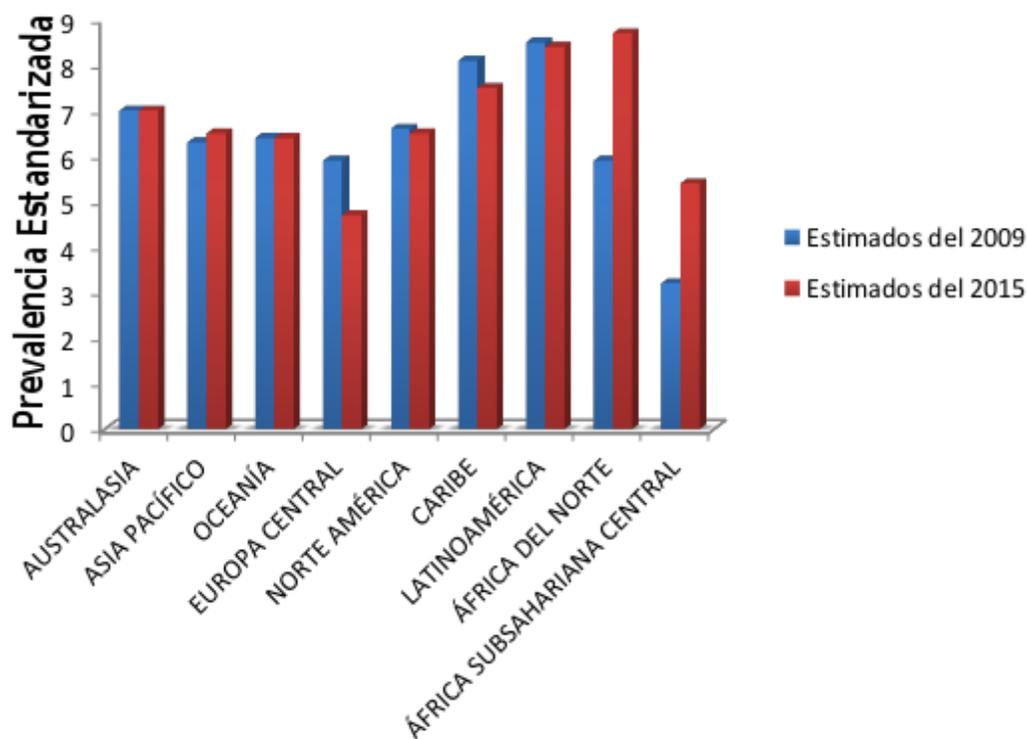


Figura 2.1: Prevalencia estimada de la demencia en personas con 50 años a más [26].

2.1.3. Hipótesis sobre el origen de la enfermedad

La enfermedad del Alzheimer se caracteriza por una acumulación de las placas seniles en el cerebro y por una hiperfosforilación de la proteína *tau*. A pesar de ello, estas vías no se comprenden en su totalidad y continúan los esfuerzos por entender cuál de todas las hipótesis (colinérgica, amiloidogénica, de la proteína tau, entre otras), pueden darnos indicios sobre las vías alternativas que desencadenan la enfermedad; sin embargo, en el presente estudio se toma en cuenta la hipótesis amiloidogénica.

2.1.3.1 Hipótesis amiloidogénica: Postula que los fragmentos solubles de β -amiloides procesados por la PPA (Proteína Precursora Amiloidogénica) son citotóxicos, ya que se acumulan en la hendidura sináptica y forman placas seniles, lo cual conduce a un impedimento sináptico [2]. Asimismo, se han encontrado aproximadamente 8 mutaciones patogénicas dentro de la PPA cuando ocurre el procesamiento de los β -amiloides, descubriendo así las mutaciones que se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 2.1: Posiciones en el β -amiloide y PPA de las mutaciones artica, flamenca, holandesa e italiana.

MUTACIONES	B-AMILOIDE	PPA
ÁRTICA	p. E22G [9]	p. E693G [9]
FLAMENCA	p. A21G [10]	p. A692G [10]
HOLANDESA	p. E22Q [11]	p. E693Q [11]
ITALIANA	p. E22K [12]	p. E693K [12]

Las mutaciones se encuentran en el exón 17 del cromosoma 21 [28], localizadas en el gen de la PPA. Los tratamientos que están en fases clínicas para eliminar los β -amiloides van desde la inmunoterapia (aducanumab) [16], hasta la inhibición de las enzimas de corte de la PPA (verubecestat) [29].

2.1.3.2 Hipótesis colinérgica: Fue la primera hipótesis en ser postulada [3] y dió indicios sobre una vía que desencadenaría la enfermedad del Alzheimer, señalando que existe una pérdida de neuronas colinérgicas en el Núcleo Basal de Meynert (NBM) lo cual ocasionaría una disminución de la actividad colinérgica. Para combatir esto, se desarrollaron los primeros fármacos (donazepil y la rivastigmina) [15] aprobados por la FDA que inhiben la enzima Acetil colinesterasa (AChE) de manera reversible, aumentando los niveles de Acetilcolina (Ach), lo que impide el desarrollo del Alzheimer leve o moderado, aunque con muy poco éxito, dado que estos fármacos sólo mejoran la cognición por un corto periodo de tiempo y con graves efectos secundarios [5].

2.1.3.3 Hipótesis de la proteína *tau*: Se basa en las señalizaciones anómalas de las fyn quinasas, las que conllevan a la hiperfosforilación de la proteína *tau* y el desarrollo de los ONF (Ovillos Neurofibrilares), dando como resultado el colapso del citoesqueleto que conforma los microtúbulos y por ende, la pérdida de sinapsis causada por la muerte neuronal [4]. Los indicios clínicos que soportan esta hipótesis son el incremento de la acumulación de ovillos neurofibrilares y el nivel de hiperfosforilación de la proteína *tau* encontrados en el fluido cerebrospinal de pacientes que sufren la enfermedad del Alzheimer, los cuales son directamente proporcionales a la severidad del Alzheimer que padecen [30]. Esta hipótesis y sus indicios clínicos, han llevado a desarrollar varias investigaciones que inhiban la fosforilación de la proteína *tau* (inhibiendo las quinasas o las fosfatasa como la PP2A) [31], incrementando la estabilización de los microtúbulos con los compuestos mitóticos (epotilona D o TPI-287) y estabilizando los microtúbulos mediante agentes como el davunetide [32, 33]. A pesar de la gran diversidad de estudios realizados, sólo algunos de estos farmacos han sido llevados a fases clínicas.

2.1.4. Clases de Alzheimer

La enfermedad del Alzheimer primero afecta la memoria episódica hasta finalmente atacar a la memoria semántica y la memoria de trabajo. Todos estos impedimentos sinápticos se han visto reflejados en dos clases de Alzheimer, la Enfermedad del Alzheimer de Inicio Tardío

(EAITA) [7] y la Enfermedad del Alzheimer de Inicio Temprano (EAITE) [8]; las cuales dependen de la edad y de los factores de predisposición genéticos y ambientales [34].

2.1.4.1 Alzheimer Tardío (EAITA): Esta clase de Alzheimer la padecen personas mayores de 65 años. Se le considera multifactorial pero comúnmente la desarrollan personas que tienen predisposición genética por el gen de la apolipoproteína E (*APOE*) [35], la cual es una proteína que regula la homeostasis de los lípidos y es producida a nivel cerebral en los astrocitos para ayudar a transportar el colesterol mediante los receptores del *APOE*. El *APOE* presenta 3 variantes alélicas (*APOE* ϵ 2, *APOE* ϵ 3, y *APOE* ϵ 4) [36], la variante alélica ϵ 4 se encuentra presente en un 40 – 65% de las personas que sufren de Alzheimer a nivel mundial; ya que éste alelo es menos eficiente al eliminar los β -amiloides [7] en comparación con los otros 2 alelos del *APOE*, los cuales se unen a los agregados de β -amiloides solubles (oligómeros) para eliminarlos. También, el alelo ϵ 4 se encuentra asociado con el riesgo de padecer angiopatía amiloide cerebral (AAC) y el declive cognitivo relacionado con la edad, los cuales han sido detectados frecuentemente en pacientes que padecen la enfermedad del Alzheimer Tardío [37].

2.1.4.2 Alzheimer Temprano o Familiar (EAITE): La segunda clase de Alzheimer se caracteriza por ser una enfermedad autosómica dominante que la padecen personas menores de 50 años de edad. El desarrollo de esta enfermedad involucra mutaciones dentro de los genes que codifican la *PPA* en el cromosoma 21 (32 mutaciones patogénicas) [8], y dos subunidades de la γ -secretasa, las cuales son el gen *PSEN 1* en el cromosoma 14 (221 mutaciones patogénicas) y el gen *PSEN2* en el cromosoma 1 (19 mutaciones patogénicas) [38]. A pesar de que el gen de la *PPA* sólo cuenta con 32 mutaciones patogénicas, éste involucra el procesamiento del péptido β -amiloide de 40 o 42 aminoácidos ($A\beta$ 40 o $A\beta$ 42) mediado por las enzimas β - y γ -secretasa. El péptido $A\beta$ 42 es de nuestro interés, dado que las mutaciones que ocurren dentro de las posiciones de los aminoácidos 21 y 22 [13] (figura 2.2), son las que presentan una rápida agregación y mayor neurotoxicidad que el péptido $A\beta$ 40 [39]. Las mutaciones que se encuentran dentro las posiciones 21-22 son la mutación ártica (p.E22G/c.E693G) [9], la cual forma protofibrillas rápidamente decreciendo la degradación del $A\beta$ 42 por la neprilisina; la mutación

flamenca (p.A21G/c.A692G) [10], que altera el procesamiento de la PPA incrementando la producción de A β 40 y A β 42 ; la mutación holandesa (p.E22Q/c.E693Q) [11], que acelera la agregación del péptido A β 42 incrementando la formación de fibrillas; y la mutación italiana (p.E22K/c.E693K) [12], que promueve la rápida agregación de A β 42 y A β 40. Las mutaciones presentes en la enfermedad del Alzheimer Familiar son responsables de la agregación del péptido A β 42 en la hendidura sináptica por medio de dos mecanismos [40]; el primero es incrementando la producción de especies de A β 42 (mutaciones ártica, flamenca, holandesa e italiana) y el segundo es la producción de agregados de A β 42 (oligómeros, protofibrillas, fibrillas y placas).

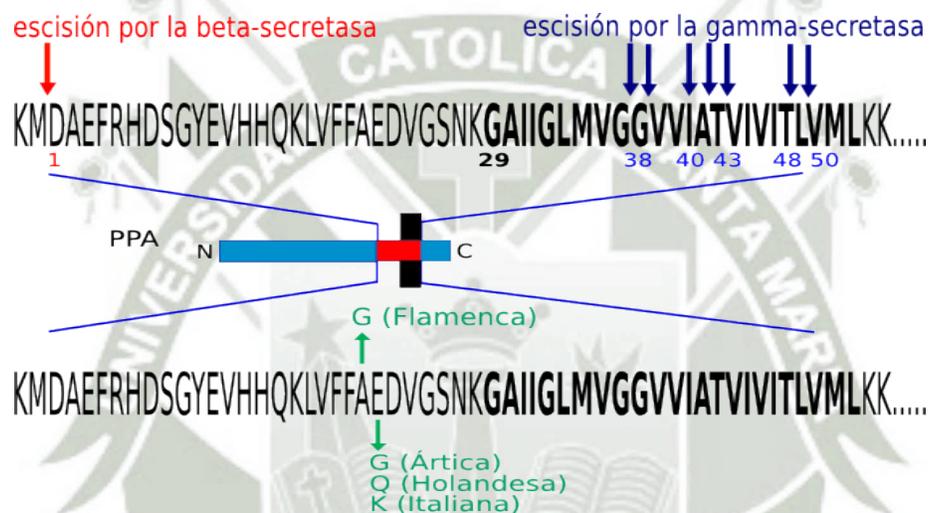


Figura 2.2: Generación de β -amiloides a partir de la proteína precursora amiloidogénica. Los sitios mediados por la escisión de la β -secretasa se muestran por medio de las flechas rojas, las escisiones realizadas por la γ -secretasa se muestran mediante las flechas azules y el dominio transmembrana de la PPA, se encuentra representado por las letras en negrita. El corte con la γ -secretasa produce los fragmentos de β -amiloides que pueden variar en longitud e hidrofobicidad. Las mutaciones en la región β -amiloidogénica de la PPA pueden incrementar la producción total del β -amiloide o alterar las propiedades biofísicas del β -amiloide (letras verdes) [13].

2.1.5. Procesamiento del péptido β -amiloide

La PPA se encuentra localizada en el brazo largo del cromosoma 21 [28] (figura 2.3). Es una glicoproteína de membrana tipo I que realiza la sobreproducción de fragmentos proteolíticos,

como son los β -amiloides, que se ven involucrados en la enfermedad del Alzheimer. Debido a esto, los científicos se han enfocado en entender la función fisiológica que cumple el PPA en el cerebro humano, empleando cerebros de animales como modelo (*Danio rerio* y *Mus musculus*), ya que en éstos se encuentran las proteínas parecidas al PPA (APLP1 y APLP2) que carecen del péptido β -amiloide [41]. La PPA de roedores *Mus musculus* posee aminoácidos diferentes en la región del péptido β -amiloide, en la Arginina 5, Tirosina 10 e Histidina 13 con respecto al humano, siendo menos propensos de formar agregados de β -amiloides [42]. El cambio de la histidina en la posición 13 por la arginina en el roedor, impide su unión al Zinc y por ende, inhibe el proceso de fibrillogénesis [43]. A pesar de estos hallazgos, los modelos de roedores no permiten entender por completo la patología de la enfermedad. Esta limitación, ha llevado a emplear plaquetas y leucocitos de las isoformas de la PPA que al ser sometidos a mecanismos similares a los neuronales, procesan la PPA liberando los β -amiloides solubles, lo cuál ha permitido tener aproximaciones más reales de la enfermedad [44].

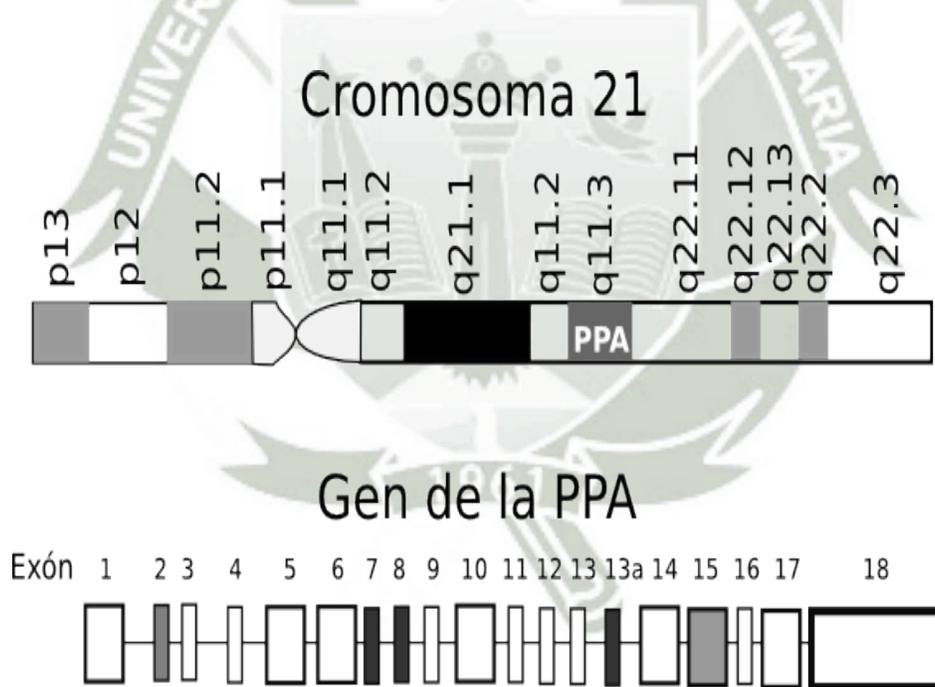


Figura 2.3: Estructura del gen y ARNm de la proteína precursora del β -amiloide. El gen del PPA tiene 18 exones. Las diferencias en el splicing del ARNm en los exones 7 y 8 (gris oscuro) pueden conllevar a la expresión de las isoformas 695 (presente en mayor cantidad en el cerebro), 751 y 770. Por el contrario, los exones 2 y 15 (gris claro) presentan las isoformas de las proteínas parecidas al PPA y al PPA639, respectivamente [28].

La PPA es sintetizada en el aparato de Golgi e insertada en la membrana plasmática para ser procesada por la vía no amiloidogénica donde es reconocida por la α -secretasa (ADAM9, ADAM10 o ADAM17) [45] y luego por la γ -secretasa. No obstante, si la PPA no es reconocida por las α -secretasas, esta puede ser internalizada debido a que posee un DICA, que le permite meterse dentro del endosoma, donde es cortado por la β -secretasa [46] (figura 2.4).

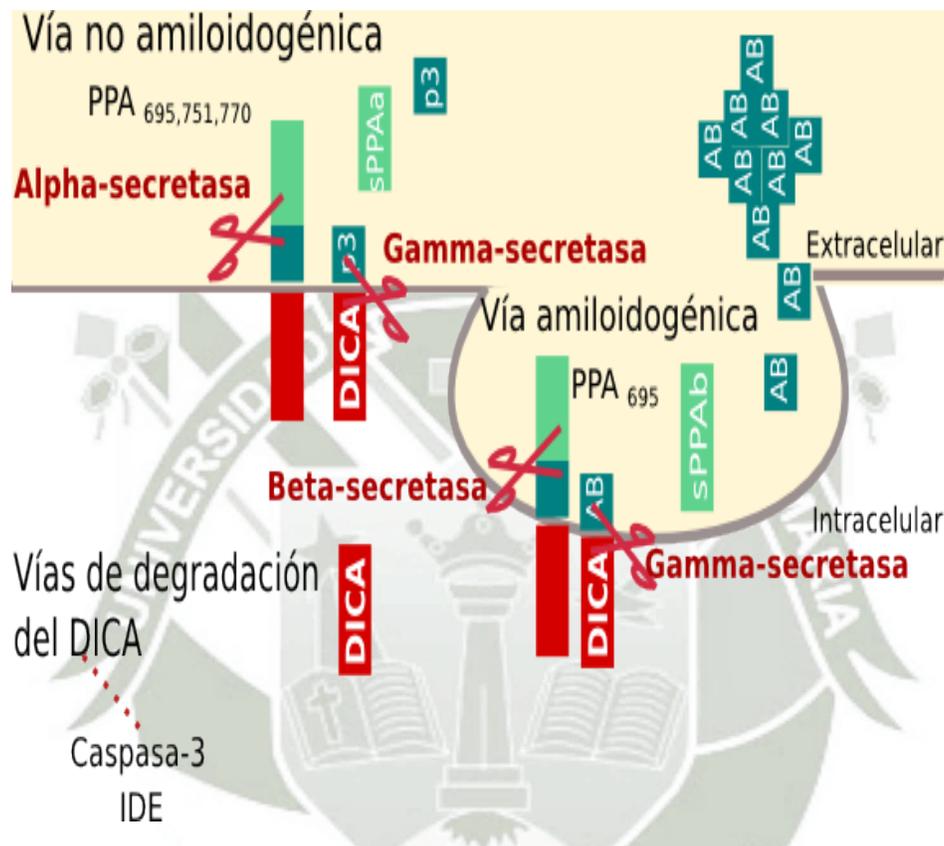


Figura 2.4: Vías del procesamiento de la PPA [46].

A Vía antiamiloidogénica o no amiloidogénica: El corte de la PPA se da dentro del dominio del β -amiloide entre los aminoácidos 16 y 17 [47]. El corte es mediado por la α -secretasa, la cual permite la liberación del primer fragmento proteolítico soluble (sPPA α), mientras que el segundo fragmento, carboxilo terminal de 89 aminoácidos (FCT- α), se mantiene en la membrana para luego ser procesado por la γ -secretasa. El corte mediado por la γ -secretasa produce dos fragmentos proteolíticos, un péptido p3 y un dominio intracelular DICA (49–59 aminoácidos). El DICA es liberado en el citoplasma donde rápidamente es degradado por la enzima EDI y la caspasa-3 [48].

B Vía amiloidogénica: Esta vía no es muy empleada en el procesamiento del β -amiloide, sin embargo es una vía alternativa cuando la PPA no es reconocida por la α -secretasa [49]. Para ello, la PPA es internalizada en los endosomas tardíos donde se encuentra con la β -secretasa, también denominada BACE-1 (Beta Secretase Enzime - 1), y es cortada para dar como resultado un fragmento soluble (sPPA β) y un fragmento carboxilo terminal de 99 aminoácidos (FCT- β), el cual es cortado por la γ -secretasa en el sitio ϵ , obteniendo así el dominio DICA y el péptido β -amiloide. El dominio DICA en esta vía cumple un rol muy importante, dado que la PPA tiene sitios de corte múltiple y la γ -secretasa no es específica, por lo cual si se realiza un corte en el DICA50 se generarían péptidos amiloidogénicos de 49-46-43-40 aminoácidos. En cambio, si se realiza el corte en el DICA51, se liberarían los péptidos β -amiloides 48-45-42-38 aminoácidos. Este sitio de corte múltiple del DICA permite la liberación de péptidos tóxicos de β -amiloides de 42 o 40 aminoácidos, no obstante, se ha reportado que la DICA es truncada por la caspasa-3 produciendo un péptido de 31 aminoácidos [50]. Dicho péptido se ha visto incrementado en los cerebros de pacientes que padecen Alzheimer y participa en la vía de muerte celular [51].

Péptido β -amiloide: El péptido β -amiloide desempeña roles tanto neurotóxicos como neuroprotectores, ambos roles podrían depender de la especie de β -amiloide liberada al espacio extracelular [52]. Esto se produce debido al corte inespecífico que realiza la γ -secretasa donde en condiciones normales se produce un 90 % de A β 40 y un 10 % de A β 42, el cuál es el péptido de nuestro interés (figura 2.5). Sin embargo, estas no son las únicas especies amiloidogénicas que existen en el cerebro, también se pueden encontrar péptidos de A β 43 [53]. El A β 42 es la especie más citotóxica de los β -amiloides, debido a las modificaciones post-traduccionales (fosforilación, nitración y la conversión del piroglutamato), hiperfosforilación o mutaciones que sufre, ya que estas facilitan la adopción de diversas conformaciones (oligómeros, protofibrillas y fibrillas) [54]. La agregación de los β -amiloides forman fibrillas y posteriormente placas seniles en el cerebro [19], estas placas seniles impiden la sinapsis y se creía que estas placas seniles eran la causa principal del desarrollo de la enfermedad del Alzheimer. No obstante, actualmente los investigadores han tomado gran interés en los oligómeros de β -amiloides, dado que un

estudio en las neuronas del hipocampo en ratas tratadas con estos oligómeros mostraron una inhibición en el PLT (potenciación de largo tiempo), prevaleciendo la depresión de largo tiempo (DLT) y reduciendo la densidad dendrítica [55, 14]. No obstante, los monómeros de $A\beta_{42}$ cumplen un rol neuroprotector en concentraciones picomolares [56], por ello, si se inhibe la producción de β -amiloides permanentemente se generaría una sobreproducción de PPA conllevando a la disfunción sináptica, lo cual conduciría a sufrir la enfermedad del Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas [57]. Por otro lado, el $A\beta_{40}$ tiene la habilidad de inhibir la oligomerización del $A\beta_{42}$, por ende a esta especie se le atribuyen roles neurotróficos como son promover la neurogénesis [58], prevenir la toxicidad inducida por el inhibidor de la α -secretasa [59], proliferar las neuronas [60]. No obstante, el rol neurotrófico o neurotóxico que desempeña la $A\beta_{40}$, depende de la concentración en la que se encuentre éste en el cerebro [61].

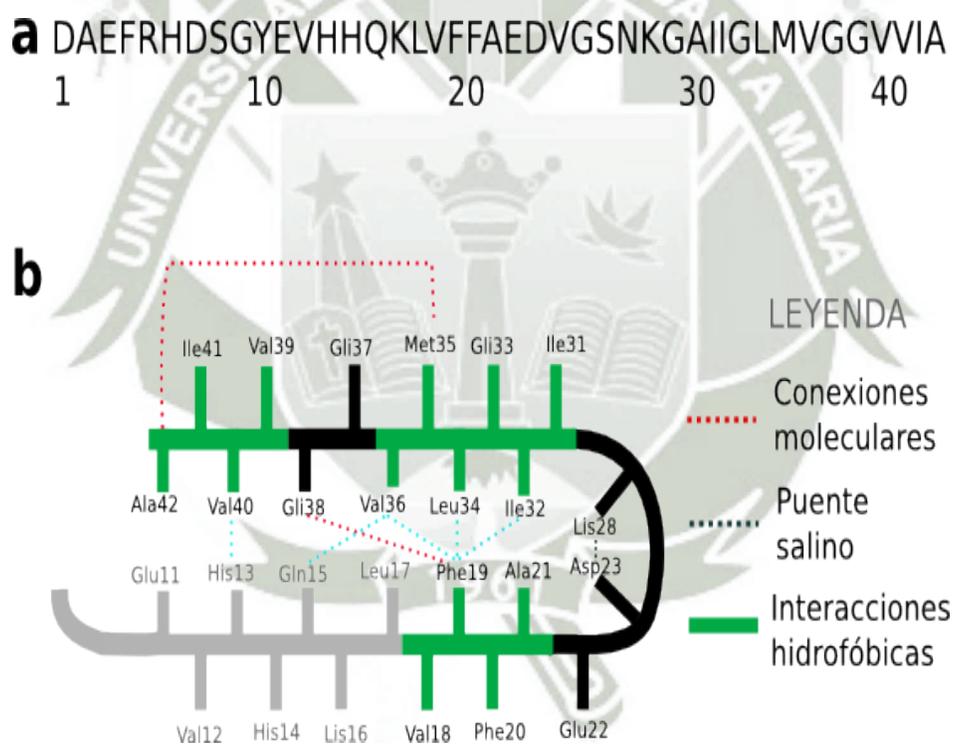


Figura 2.5: Secuencia y estructura de las fibrillas del monómero de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$. (a) Secuencia del péptido $A\beta_{42}$ derivado de la PPA humana. (b) Estructura de las fibrillas del monómero de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$. En la figura se observa un empaquetamiento de la cadena lateral entre los aminoácidos Phe19 y la Ile32, Leu34 y Val36, Gln15 y Val36, así como la His14 y Val40 (líneas celestes punteadas). En las fibrillas del monómero de $A\beta_{42}$ los residuos del 18 – 42 forman una hoja β [62].

2.1.6. Formas de agregación del β -amiloide

Existen varias formas de agregación de los β -amiloides solubles que parten de agregados de bajo peso molecular (monómeros, dímeros, trímeros y tetrameros), los cuales son producidos por las neuronas donde los dímeros de β -amiloide son tres veces más citotóxicos que los monómeros y los tetrameros son trece veces más citotóxicos [63]. No obstante, debido a la presencia de un factor no identificado, el β -amiloide monomérico se desenrolla permitiéndole al péptido entrar a la vía oligomérica fibrilar [64], donde el primer paso le corresponde a la formación de dímeros de β -amiloides. Los dímeros se pueden expandir rápidamente para crear protofibrillas. Por otro lado, también existen agregados de mediano peso molecular (dodecámeros) que pueden conformar agregados de alto peso molecular (fibrillas y protofibrillas) [6], la representación esquemática muestra su proceso de agregación (figura 2.6).

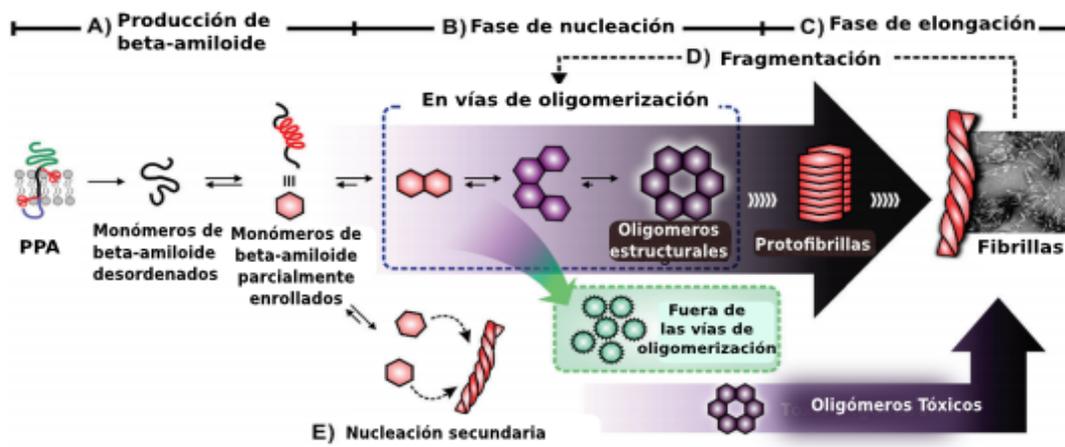


Figura 2.6: Representación esquemática de la producción y agregación de los β -amiloides. (A) Producción de β -amiloides luego de la escisión por enzimas β y γ secretasas, donde los monómeros de β -amiloide se encuentran desenrollados. (B) Los monómeros parcialmente enrollados pueden entrar a la **vía de oligomerización** donde se aglomeran hasta formar oligómeros de β -amiloides estructurales. Además, se pueden formar oligómeros **fuera de las vías de oligomerización** sin que formen fibrillas amiloidogénicas. (C) En la fase de elongación, (D) los oligómeros estructurales pueden dar lugar a intermediarios estables que son transformados en protofibrillas o fibrillas, donde algunas fibrillas pueden fragmentarse y reensamblarse en especies oligoméricas. (E) Los oligómeros estructurales pueden generarse por medio de interacciones entre monómeros y fibrillas [64]

2.1.6.1 Fibrillas amiloides: Poseen en su estructura hojas- β paralelas, las cuales son estabilizadas por enlaces de hidrógeno [65]. Estudios recientes han mostrado que estas hojas les conferiría una estructura cilíndrica a la fibrilla del β -amiloide [66], además de una naturaleza citotóxica [67] a la que se le atribuye la orientación de las caras de las hojas- β y si estas son paralelas o antiparalelas [68] (figura 2.7), su elucidación fue realizada por microscopía de transmisión electrónica (MTE) [69].

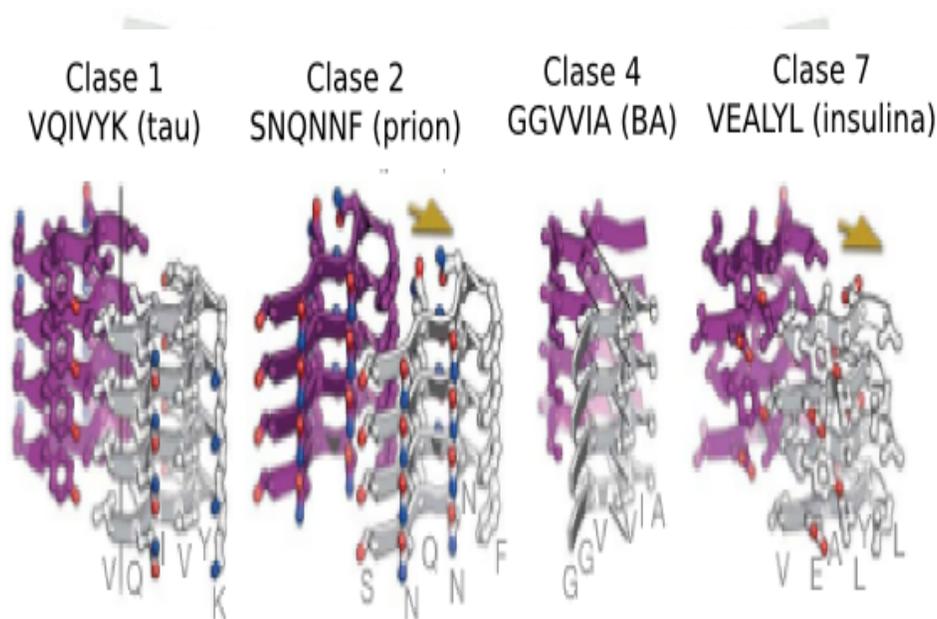


Figura 2.7: Vistas en 3D de las estructuras del cierre estérico de la clase 1, 2, 4 y 7, las cuáles muestran la hoja delantera en color plomo y la hoja posterior en color morado. El valor del parámetro de la forma complementaria (F_c), para GGVVIA ($F_c = 0.92$) es el valor más alto encontrado para la interfaz de una proteína consistente con la alta toxicidad y baja solubilidad del β -amiloide de 42 aminoácidos [66, 70].

2.1.6.2 Protofibrillas: Poseen una estructura elongada y lineal, usualmente son cortas (no mayores de 400 nm de longitud) y más delgadas que las fibrillas [71]. Al igual que las fibrillas, los estudios de su estructura por difracción de rayos X y espectroscopía infrarroja revelan elevados contenidos de hélices- β en su estructura [72], donde cada hélice- β está compuesta por dos hojas- β [73].

2.1.6.3 Oligómeros de β -amiloide: Son agregados no fibrilares del péptido β -amiloide. Muestran una estructura difícil de caracterizar debido a sus interconversiones y a su naturaleza heterogénea que presentan [74]. Además, estos agregados pueden perturbar la actividad de las neuronas presináptica y postsináptica [75], llevando a un impedimento sináptico debido a la citotoxicidad de los dímeros de $A\beta_{42}$, a su hidrofobicidad y a su habilidad de interactuar con la membrana de la bicapa lipídica [76]. En un estudio [77] se analizaron oligómeros de β -amiloides (pentámeros y decámeros) encontrando que estos eran neurotóxicos, también se ha visto que los oligómeros de $A\beta_{42}$ son antiparalelos, mientras que las hojas- β de las fibrillas son paralelas [78]. Un estudio reciente ha empleado la resonancia electrónica paramagnética, en el que sugiere que los oligómeros prefibrilares pueden interconvertirse en fibrillas, rotando sus hojas- β 90° direccionándolas hacia la siguiente hoja [79]. Si se llegara a inhibir la producción de β -amiloides permanentemente, se generaría una sobreproducción de PPA conllevando al impedimento sináptico, lo cual conduciría al individuo a sufrir la enfermedad del Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas [57].

2.1.7. Vías de degradación del β -amiloide

Los pasos en las vías de degradación del β -amiloide son los siguientes (figura 2.8): **primero**, la PPA es sintetizada en el Retículo Endoplasmático (RE) y transportada al aparato de Golgi donde es empaquetada en vesículas, dichas vesículas son transportadas a la superficie celular. En los **pasos 2 y 3**, la PPA, que no es procesada por la γ -secretasa, es internalizada en los endosomas (círculos azules), que son compartimientos ácidos. En el **paso 4** la PPA es cortada por la β -secretasa en el endosoma para generar los FCT- β , el cual es procesado para formar los β -amiloides, y el FCT- γ es liberado luego de ser cortado por la γ -secretasa dentro del endosoma. El **paso 5** se produce en las neuronas, donde una fracción larga de β -amiloides es generada en los endosomas y posteriormente degradada por la enzima convertidora del endotelio (ECE) y proteasas desconocidas. En el **paso 6**, los β -amiloides que escapan de la degradación de dichas enzimas son transportados al lisosoma y degradados. Alternativamente, los β -amiloides contenidos en vesículas recirculantes (círculos azules pequeños) pueden ser recirculadas a la superficie celular por la vía del Aparato de Golgi (**paso 7 y 8**) o directamente

del endosoma a la superficie celular (**paso 9**). En el **paso 10**, el β -amiloide puede ser liberado de las vesículas recirculantes al sistema de ubiquitina-proteosoma (SUP) para su degradación. Alternativamente, los β -amiloides pueden ser degradados por enzimas como la IDE u otras enzimas no identificadas (**paso 11**). El β -amiloide que escapa a la degradación puede ser drenado en el fluido cerebroespinal o degradado en la circulación vascular o linfática (**paso 12**). Finalmente en el **paso 13**, el fallo de todos los mecanismos de degradación llevará a la acumulación y agregación del β -amiloide y posterior generación de placas seniles (estrella azul).

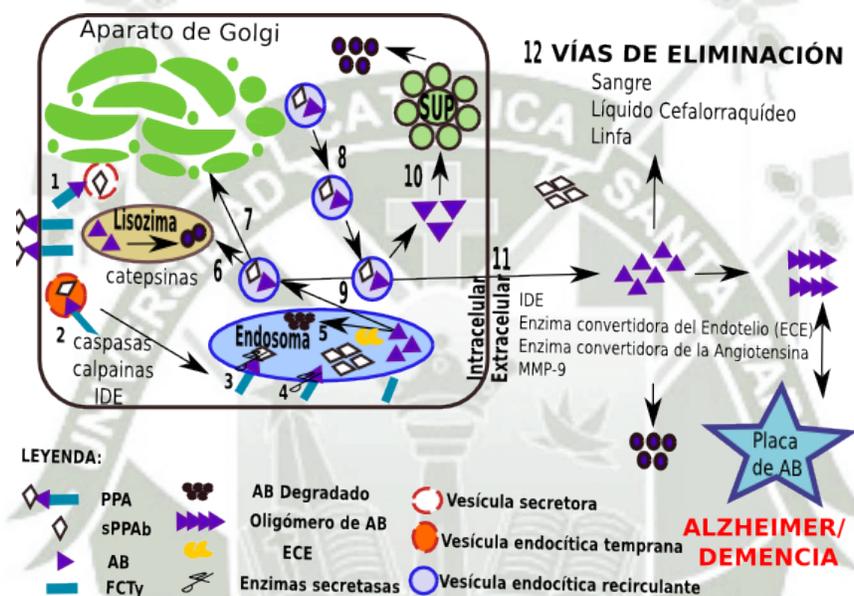


Figura 2.8: Biología celular de la producción y degradación del péptido β -amiloide [80].

2.1.8. Impedimento sináptico

Los oligómeros de β -amiloides se unen a las neuronas corticales y a las neuronas del hipocampo, generando un impedimento sináptico [81], estos oligómeros afectan la vía del ciclo del glutamato, siendo éste el mayor neurotransmisor del sistema nervioso central [82]. El glutamato es regulado por los transportadores vesiculares de glutamato (TVGLU1 y TVGLU2) que se encuentran en las neuronas presinápticas [83]; no obstante, cuando una neurona es despolarizada, el glutamato es liberado en la hendidura sináptica para unirse a sus receptores presinápticos y postsinápticos. Para esto, existen dos familias de receptores

de glutamato que se encuentran en la membrana plasmática de las neuronas, los receptores ionotrópicos (iGluR) y los receptores metabotrópicos (mGluR). Luego de unirse el glutamato a los receptores postsinápticos, éste debe eliminarse para evitar su acumulación en la hendidura sináptica, donde los transportadores astrogliales del glutamato (TGL-1 y TGLAS) [84], transportan el glutamato hacia los astrocitos. Posteriormente, gracias a la acción de la enzima glutamina sintetasa, el glutamato es convertido en glutamina y transportado a las neuronas presinápticas [85]. La glutamina es convertida dentro de la neurona presináptica en glutamato por la enzima glutaminasa [86] para volver a realizar el ciclo del glutamato, el cuál es el encargado de convertir los impulsos nerviosos en estímulos químicos (figura 2.9).

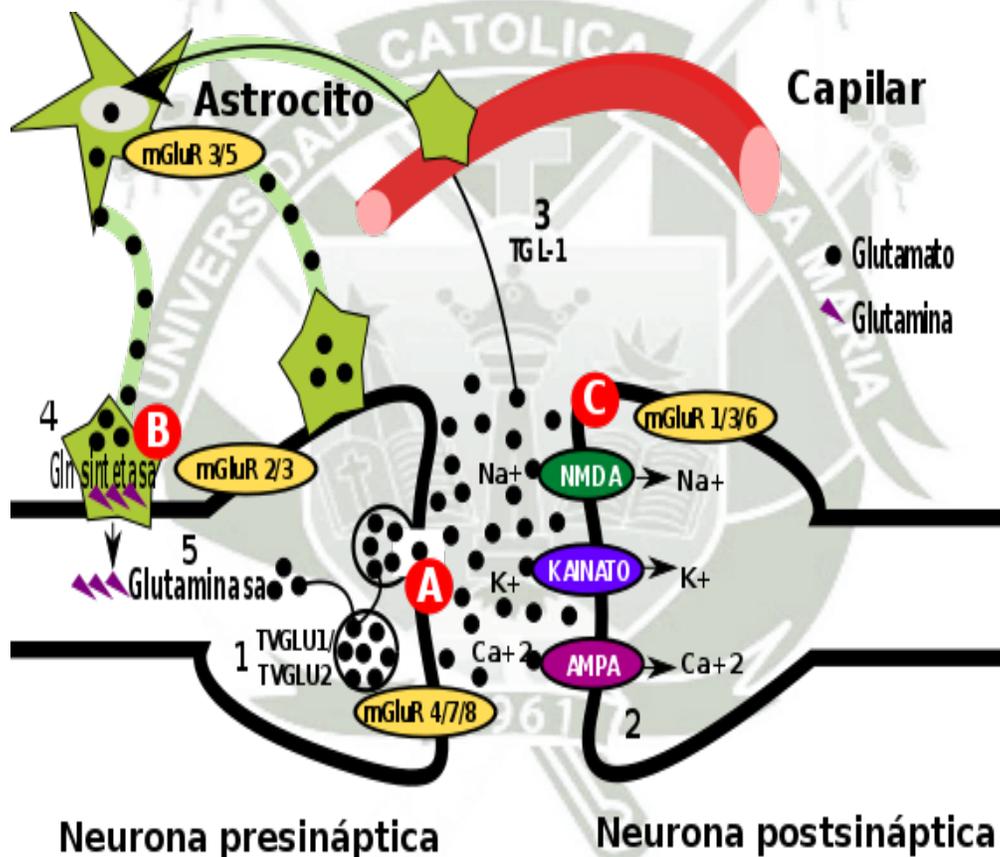


Figura 2.9: Ciclo del glutamato. El glutamato es el neurotransmisor más abundante en el cerebro y los niveles de este aminoácido son mantenidos en las vesículas de las neuronas presinápticas. Muchas vías del glutamato se ven afectadas en la enfermedad del Alzheimer, donde existe un incremento de β -amiloides ocasionando: (A) un incremento del glutamato, (B) una inhibición de la conversión del glutamato a glutamina en los astrocitos y (C) afecta la actividad de los receptores de glutamato [82].

El ciclo del glutamato se ve afectado por la enfermedad del Alzheimer, por esta razón una gran cantidad de estudios se han llevado a cabo [87], revelando una caída en los niveles de TVGLU1 a diferencia de la TVGLU2 en la corteza prefrontal en pacientes que padecen la enfermedad. Esta es causada por una mayor acumulación de β -amiloides en el TVGLU1, suponiendo que estos péptidos pueden llegar a afectar los terminales glutamatérgicos presinápticos [88], la corteza y el hipocampo [89] en los cerebros de pacientes que padecen la enfermedad. Por otro lado, la reducción del transportador de glutamato conlleva a una reducción de la enzima glutamina sintetasa [90], permitiendo la acumulación del glutamato en los astrocitos, lo cual implica un riesgo si se llegan a despolarizar las membranas mitocondriales, regresando el glutamato a la hendidura sináptica [91], elevando así los niveles de glutamato en la sinapsis y conllevando a la activación de la muerte citotóxica mediada por el receptor NMDA [92]. El estudio del oligómero de β -amiloides normal y los oligómeros de β -amiloides mutados en el impedimento sináptico, puede conllevar a una desestabilización de estos oligómeros y desarrollar nuevos fármacos o terapias alternativas para el tratamiento del Alzheimer.

2.1.9. Tratamiento de la Enfermedad del Alzheimer

El tratamiento de la enfermedad del Alzheimer en la actualidad se viene dando por fármacos aprobados por la FDA (donazepil, rivastigmina) [15]. Sin embargo, estos fármacos sólo retrasan los síntomas de la enfermedad por un tiempo y luego de este tiempo los pacientes empeoran sus síntomas de manera crónica. Debido a este inconveniente, los científicos han unido esfuerzos para combatir la enfermedad empleando anticuerpos específicos contra los oligómeros de A β 42 [93] con poco éxito en las fases clínicas. Esto puede deberse a que la enfermedad del Alzheimer en sus primeras fases es asintomática y el tratamiento que se está empleando en la actualidad es para fases tardías, es decir, cuando la enfermedad comienza a presentar los primeros síntomas. Para evitar los efectos secundarios indeseables y una leve mejora temporal temprana en la cognición, se está haciendo uso de metabolitos secundarios obtenidos a partir de plantas naturales, como la genisteína [94], que evitan o eliminan la formación de las diferentes especies de β -amiloides. Asimismo, se han descrito metabolitos secundarios de la familia *Rubiaceae* (ciclótidos) [95], que mejoran el deterioro causado por esta enfermedad.

2.2. Ciclotidos

Los ciclotidos son péptidos pequeños que poseen entre 28-37 aminoácidos, han sido encontrados en una gran variedad de familias de Angiospermas (*Rubiaceae*, *Violaceae*, *Curcubitaceae*, *Fabeaceae*, *Solanaceae* y *Poaceae*) [96]. Las plantas pertenecientes a las familias *Rubiaceae* y *Violaceae* han sido las primeras en ser estudiadas para obtener las primeras secuencias de ciclotidos [97] y con el tiempo lograr dilucidar su estructura. Por otro lado, la biosíntesis de los ciclotidos tiene lugar en el ribosoma, donde se sintetiza el nodo de cíclico de cistina (NCC) el cual le confiere estabilidad a su estructura, resistencia al calor y a la hidrólisis causada por proteasas [20]. Gracias a sus propiedades de resistencia y estabilidad, a los ciclotidos se les han atribuido una gran cantidad de actividades biológicas [98], por ello son considerados péptidos prometedores en el desarrollo y diseño de drogas terapéuticas.

2.2.1. Estructura

Los ciclotidos presentan una estructura cíclica de cabeza a cola, debido a la presencia del NCC que contiene tres enlaces disulfuros, los cuáles están unidos por medio de seis residuos conservados de cisteína (Cis I-Cis IV, Cis II-Cis V, Cis III-Cis IV), y presentan entre estos enlaces los segmentos denominados bucles [99], como se puede observar en la figura 2.10.

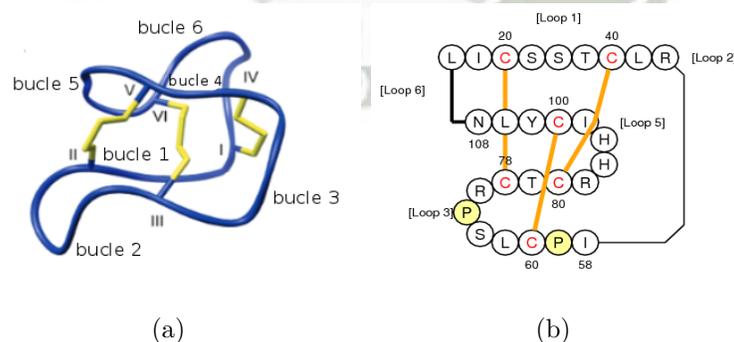


Figura 2.10: Estructuras del ciclotido caripe. (a) representación de los residuos conservados de cisteína, (b) representación de la secuencia de aminoácidos (LICSSSTCLRIPCLSPRCTCRHHICYLN) que conforman el ciclotido caripe 4 [100].

2.2.2. Los ciclótidos en la biotecnología

Los ciclótidos presentan actividades biológicas que combaten diversas enfermedades neurodegenerativas [104], también son útiles para incrementar la producción de ciertos genes de interés y recientemente se han empleado en el desarrollo de herramientas de diagnóstico molecular debido a su alta especificidad [105].

2.2.2.1 Actividades biológicas: Debido a su NCC, los ciclótidos presentan varias actividades biológicas entre las que destacan la anti-VIH [21], anticancerígena [22], antihelmíntica [106]; sin embargo, aquellas actividades biológicas que combaten enfermedades neurodegenerativas son de nuestro especial interés. Los ciclótidos son capaces de inhibir la α -sinucleína, la cual es una proteína pequeña de unión a lípidos que ocasiona el mal plegamiento y la agregación de los cuerpos de Lewy en la enfermedad del Parkinson [104]; además de silenciar las células T autoreactivas que originan la enfermedad de la esclerosis múltiple [107]. Finalmente, los ciclótidos presentan un efecto inhibitorio de la neurotensina, la cual es un neuropéptido de 13 aminoácidos que se une normalmente a los receptores de líneas celulares HT-29 (líneas asociadas a los adenocarcinomas), esta unión es bloqueada por los ciclótidos [22]. Los ciclótidos se han empleado para combatir las enfermedades neurodegenerativas previamente mencionadas debido a que luego de ser ingeridos se eliminan por los riñones, pueden penetrar células, modular las interacciones proteína-proteína y tienen una gran capacidad de captación en el cerebro [108].

2.2.2.2 Expresión recombinante: Los ciclótidos son resistentes a la degradación; además, presentan una gran tolerancia a las mutaciones haciéndolos ideales para la producción de ciclótidos recombinantes [109] que generan ciclótidos con nuevas actividades biológicas, esto se logra introduciendo secuencias génicas de interés para incrementar la producción o para producir valor agregado a ciertos productos. Por ejemplo, el crecimiento de los tumores está asociado con una angiogénesis mal regulada, para tratar ello se incorporó en un ciclótido la secuencia de un péptido rico en arginina para que interaccione contra el factor de crecimiento endotelial, el cual bloqueó el receptor de unión al factor de crecimiento endotelial [110].

2.2.2.3 Ciclotidos para pruebas de imagen: Los agentes de imagen deben tener bajo peso molecular, una rápida eliminación, alta afinidad y selectividad para el correspondiente marcador molecular con el fin de obtener un contraste óptimo entre los tejidos normales y los tejidos infectados por la enfermedad [105]. Los ciclotidos son promisorios agentes de imagen, sobre todo para la detección del cáncer; sin embargo, aún no hay reportes de su uso.

2.2.2.4 Los ciclotidos en el tratamiento del Alzheimer: Los ciclotidos se han empleado en la inhibición del crecimiento fibrilar del hexapéptido Ac-VQIVYK-NH₂ (AcPHF6) [111], el cual es un péptido derivado de la proteína *tau* y es ampliamente usado como modelo para entender el mecanismo patológico de varias taupatías, incluyendo a la enfermedad del Alzheimer. La base molecular de los agregados de la proteína *tau* radica en regiones específicas del polipéptido, las cuales son importantes para su agregación debido a la formación de fibrillas. Una de estas regiones ampliamente estudiadas es la región Ac-VQIVYK-NH₂ (AcPHF6), esta región forma fibrillas con propiedades biofísicas similares en longitud a las fibrillas de la proteína *tau*. Asimismo, la región Ac-VQIVYK-NH₂ (AcPHF6) ha permitido dilucidar la formación de fibrillas que involucran a las interacciones de los puentes de hidrógeno en una dirección y otras interacciones no covalentes (hidrofóbicas) en una dirección ortogonal o paralela. Además, la estructura de estas fibrillas contiene un cierre estérico (steric zipper), el cual es compartido por los segmentos de las estructuras de muchos otros péptidos y proteínas que forman fibrillas [112], sugiriendo que es posible emplear una estrategia en común para inhibir la formación de fibrillas. En el estudio que llevaron a cabo Wang et al. [113] utilizaron el péptido cíclico SFTI-1, con los métodos de cabezales finales en conjunto empleando un grafting molecular. Los resultados que obtuvieron les permitieron identificar las características, tanto estructurales como químicas, del SFTI-1 lo que permitió revelar su actividad inhibitoria (inhibición de la formación de fibrillas empleando el cierre estérico) y demostraron que el SFTI-1 podría ser empleado como el punto inicial para diseñar inhibidores de fibrillas más potentes. Por ende, los péptidos cíclicos como el SFTI-1 pueden ser empleados en el desarrollo de nuevos fármacos que inhiban la formación fibrilar o como modelos para entender la formación fibrilar [114].

2.2.3. Biosíntesis de los ciclótidos

La biosíntesis de los ciclótidos tiene lugar en el ribosoma y aunque aún no se ha elucidado por completo su biosíntesis, las secuencias precursoras de los genes que codifican los ciclótidos han permitido observar pequeños aminoácidos de alanina o glicina en el dominio N-terminal, y residuos conservados de aspartato o asparagina en el extremo C-terminal en el bucle 6 (tabla 2) [100]. La enzima asparaginil endopeptidasa (AEP) escinde el enlace peptídico con mayor eficiencia en el extremo C-terminal de la asparagina que en el aspartato [115]. Además, esta enzima se ve involucrada en la reacción de transpeptidación donde se transfiere del grupo acilo, a partir del acilo-AEP intermediario, al residuo N-terminal del ciclótido [116] liberándolo y permitiendo su posterior ciclación [117]. Para que se realice la ciclación de los genes precursores de los ciclótidos, éstos generalmente deben presentar un retículo endoplasmático (RE), un dominio N-terminal repetitivo (NTR) altamente conservado, uno o varios dominios ciclóticos y un dominio C-terminal repetitivo (CTR) [115] (figura 2.12).

Tabla 2.2: Secuencia de los ciclótidos de *Psychotria leptothyrsa* que muestran los residuos conservados de asparagina o aspartato en el bucle 6 [100].

Ciclótidos	Subfamilia	N° Aminoácidos	Secuencia
Caripe 1	Brazalete	30	GVIPCGESC VFIP CISTVIGCSCKDKVCYRN
Caripe 2	Brazalete	30	GIPCGESC VFIR CTITALLGSCSNNVCYKN
Caripe 3	Brazalete	29	XIPCGESC VFIP CISAVVGSCSNKVCYNN
Caripe 4	Brazalete	26	LICSSTCLRIPCLSPRCTCRHHICYLN
Caripe 5	Brazalete	26	XCGESC VFIP CFTSVGCSCKDKVCYRN
Caripe 6	Brazalete	27	GAICTGT CFRNPCLSRRCTCRHYICYLN
Caripe 7	Brazalete	30	GLNCGESC VFIP CTVTALLGCSCKNKVCYRN
Caripe 8	Brazalete	30	GVIPCGESC VFIP CITAAIGCSCKKKVCYRN
Caripe 9	Brazalete	26	XCXCVFIPCTITALLGSCSNNVCYRN

La reacción de transpeptidación fue corroborada mediante estudios de mutagénesis realizados en el tabaco y la *Arabidopsis thaliana* [118], donde se realizaron mutaciones puntuales

cerca de los dominios C- y N-terminal en los genes de los ciclótidos, dando como resultado una substitución del aminoácido asparagina por cualquier otro aminoácido; al reemplazar el aminoácido no se observó ciclación. Después de respaldar la hipótesis de transpeptidación, podemos comenzar a desarrollar los pasos que dan lugar a la transpeptidación a nivel celular, donde primero ocurre la transcripción y luego la traducción del gen precursor que contiene al ciclótido [119]. Este gen es llevado al retículo endoplasmático donde se da la eliminación de la secuencia señal del RE y el posterior plegamiento del precursor del ciclótido, el cual probablemente sea mediado por la proteína disulfuro isomerasa (PDI) [120], para luego ser transportado por el NTR a la vacuola. Una vez dentro de la vacuola, el NTR es cortado por una enzima desconocida, la cual expone el aminoácido pequeño (glicina/alanina). Finalmente ocurre el proceso de transpeptidación, donde el AEP libera el CTR como se puede visualizar en la figura 2.12.

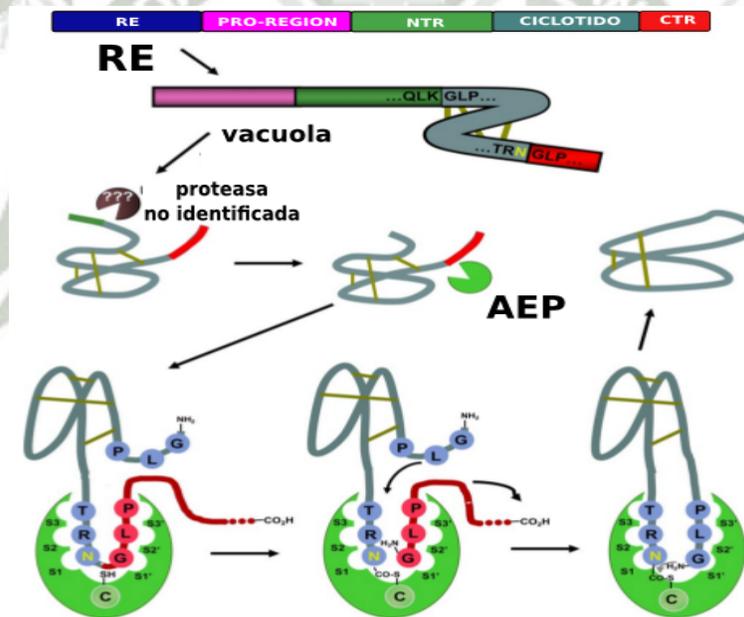


Figura 2.12: Representación esquemática de los pasos requeridos para la biosíntesis del ciclótido [116].

Faltan muchos pasos para entender el mecanismo por el cual ocurre la biosíntesis de los ciclótidos sin embargo, la biotecnología está permitiendo cerrar esta brecha para realizar la producción masiva de ciclótidos que sean útiles en la industria farmacéutica a bajos costos [121].

2.3. Química Computacional

Los químicos han venido haciendo cálculos en computadoras por varios años, sin embargo el campo que conocemos actualmente como química computacional se lo debemos gracias al esfuerzo de Martin Karplus, Michael Levitt y Arieh Warshel que ganaron el premio Nobel en Química el año 2013 por un trabajo que realizaron en el año 1970 [122]. En este trabajo sentaron las bases para los modelos computacionales, los cuales combinan principios de la física clásica (leyes de Newton) con la física cuántica, siendo estos últimos principios, los que replican mejor los detalles de los procesos químicos. La química computacional investiga problemas químicos en una computadora. Dichos problemas pueden ser:

- La geometría molecular. Estudia las estructuras de una molécula a investigar.
- La energía de las moléculas y sus estados de transición. Estudia qué isómeros se ven favorecidos en el equilibrio y cuán rápido irá una reacción.
- La reactividad química. Busca los sitios nucleofílicos y electrofílicos donde los electrones están concentrados y a dónde quieren ir, pudiendo predecir cómo los reactantes van a atacar a una molécula.
- Los espectros de RMN, IR y UV. Si una molécula es desconocida, estos espectros nos permiten dilucidar estructuras moleculares.
- Las propiedades físicas de las sustancias. Éstas dependen de las propiedades de cada molécula, por ejemplo, la fuerza y el punto de fusión del plástico están correlacionadas en cómo encajan las moléculas entre ellas y cuán fuerte es la fuerza que las mantiene unidas.

Ahora bien, ya que hemos comprendido lo que se puede realizar con la ayuda de la química computacional, hablaremos de las herramientas que nos permiten hacer esto posible. La *Mecánica Molecular*, se basa en modelar a las moléculas como una colección de átomos que se encuentran unidos por enlaces. Si nosotros sabemos cuánta energía requieren los enlaces para elongarse o contraerse, el movimiento de los ángulos y diedros, entonces podríamos hacer

una optimización geométrica mediante una minimización de energía. Además, la mecánica molecular es empleada para simular moléculas grandes, como las proteínas o el DNA, por su bajo costo computacional lo que no podría ser posible con otros métodos o herramientas [123]. Otra herramienta es la *Dinámica Molecular*, donde sus cálculos son aplicables en las leyes del movimiento clásico de las moléculas. Por otro lado, tenemos los cálculos *Ab initio*, los cuáles están basados en la ecuación de Schrödinger, y describen el comportamiento de los electrones y núcleos en una molécula. Al resolver esta ecuación nos permite determinar la energía de la molécula y su respectiva función de onda. Estos cálculos son relativamente lentos ya que emplean la mecánica cuántica básica, lo que las limita a trabajar con moléculas relativamente pequeñas. Los *cálculos semiempíricos* se parecen a los de *ab initio*, ya que se basan en la ecuación de Schrödinger, pero son parametrizados con valores experimentales; estos cálculos son más lentos que los de *mecánica molecular*, pero más rápidos que los cálculos de *Ab initio*. Por último se encuentran los cálculos de la *Teoría del Funcional de la Densidad*; son parecidos a los cálculos realizados por *Ab initio* y *semiempíricos*, dado que emplean la ecuación de Schrödinger, pero no calculan la función de onda, en su lugar derivan la distribución electrónica (función de la densidad del electrón) directamente [124].

2.3.1. Mecánica Molecular

Los métodos de mecánica molecular (MM), ignoran los movimientos electrónicos y calculan la energía del sistema como una función únicamente de la posición de los núcleos, por ello son empleados para calcular sistemas que contienen un gran número de átomos. El principio de la MM es expresar la energía potencial de la molécula como función de la elongación o estrechamiento de los enlaces, ángulos y diedros que correspondan a la energía mínima de la molécula (figura 2.13) [23]. La forma matemática del campo de fuerza (ecuación 2.1), se basa en el potencial de energía, en función de las posiciones de N partículas (átomos). Los campos de fuerza usan diferentes tipos de átomos (sp^1 , sp^2 y sp^3) [23].

$$E_{FF} = \sum_{\text{enlaces}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{diedros}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(\eta\omega - \gamma))$$

$$+ \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (2.1)$$

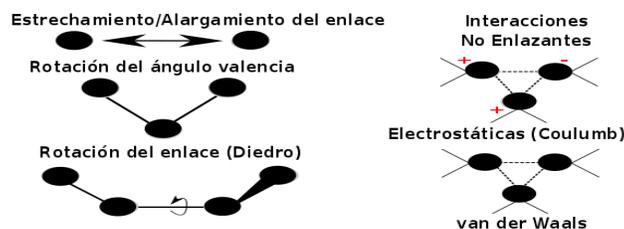


Figura 2.13: Términos fundamentales de la energía de un campo de fuerza. Los redondos negros representan al carbono.

Donde, el primer término de la ecuación 2.1 es descrito por una ecuación de tipo oscilador armónico, la cual modela la interacción entre pares de átomos enlazados dándonos un incremento de energía mientras la longitud del enlace (l_i), se desvía de su valor de referencia ($l_{i,0}$). El segundo término, al igual que el primer término, es descrito por una ecuación del oscilador armónico, el cual modela la suma de todos los ángulos que cambian o no de posición. El tercer término emplea una ecuación del coseno, donde modela el cambio de energía con respecto a la rotación de la torsión. Finalmente, el cuarto término corresponde a las interacciones no enlazantes entre pares de átomos (i y j) que se encuentran en moléculas diferentes o que se encuentran en la misma molécula pero están separados por al menos tres enlaces. Las interacciones no enlazantes de Van der Waals se encuentran modelados por las ecuaciones de Lennard-Jones, mientras que las interacciones electrostáticas se encuentran modeladas por el potencial de Coulomb. Las energías calculadas en este contexto son energías conformacionales, es decir, la energía calculada está destinada a ser una energía que predecirá la diferencia de la energía de una conformación a otra y donde todos sus términos mencionados en la ecuación 2.1 también reciben el nombre de términos de valencia y la mayoría de los campos de fuerza presentan entre tres a más términos de valencias [23]. Asimismo, algunos campos de fuerza presentan un término cruzado [125] (términos que describen cómo un movimiento de la molécula afecta a otro) como es el término de estrechamiento-rotación, el cual describe cómo el equilibrio de los enlaces tienden a sufrir una variación cuando existe una rotación en los ángulos. Uno de los campos de fuerza más utilizado se denomina OPLS-AA (Optimized Potential for Liquid Simulations-All Atoms) [126], lo que en español se definiría como un potencial optimizado para simulaciones en solvente con todos los átomos. Este campo de fuerza fue diseñado para modelar un volumen de líquidos y para modelar biomoléculas empleando dinámica molecular.

El campo de fuerza OPLS-AA usa cinco términos de valencia, pero no usa términos cruzados [127]. Simplificando la ecuación 2.1:

$$E_{FF} = \sum_{\text{enlaces}} E_{\text{estrechamiento}} + \sum_{\text{ángulos}} E_{\text{rotación}} + \sum_{\text{diedros}} E_{\text{torsión}} + \sum_{\text{pares}} E_{\text{noenlazantes}} \quad (2.2)$$

2.3.1.1 Enlaces y Ángulos: Ambos términos emplean la ecuación de Hooke, donde la energía potencial va a variar conforme con el desplazamiento cuadrado a partir de la longitud de referencia l_0 , como se aprecia en la siguientes ecuaciones:

Ecuación del potencial armónico enlazante:

$$v(l) = \frac{k}{2}(l - l_0)^2 \quad (2.3)$$

Ecuación del potencial armónico angular:

$$v(\theta) = \frac{k}{2}(\theta - \theta_0)^2 \quad (2.4)$$

Donde, l_0 y θ_0 son el enlace y ángulo de referencia respectivamente. Son los valores que adoptan cuando éstos están en el equilibrio. La fuerza necesaria para sacar del equilibrio a un enlace es mayor que la fuerza para sacar del equilibrio a un ángulo [128].

2.3.1.2 Diedros: Un claro ejemplo de la rotación de enlaces se puede observar en el eteno donde las tres conformaciones escalonadas son de mínima energía y las tres conformaciones eclipsadas son de máxima energía. Esta barrera de rotación puede ser originada a partir de las interacciones antienlazantes entre los átomos de hidrógeno en los extremos opuestos de la molécula. Las interacciones antienlazantes son minimizadas cuando las conformaciones son escalonadas y son maximizadas cuando estas son eclipsadas. Los potenciales de torsión, también denominados diedros, son expresados en una expansión de series de cosenos como se describe en la ecuación 2.5.

$$v(\omega) = \sum_{n=0}^N \frac{V_n}{2} [1 + \cos(\eta\omega - \gamma)] \quad (2.5)$$

La ecuación 2.5 es denominada como barrera, donde ω es un ángulo de torsión; V_n da una indicación cualitativa de las barreras relativas o susceptibles a sufrir una rotación; η es la multiplicidad, la cual nos da un valor del mínimo número de puntos cuando va rotando el enlace hasta llegar a los 360° ; γ es el factor de fase, el cual determina el paso del ángulo torsional por el mínimo [129]; las energías mínimas y máximas de un diedro están representados en la figura 2.14 [130].

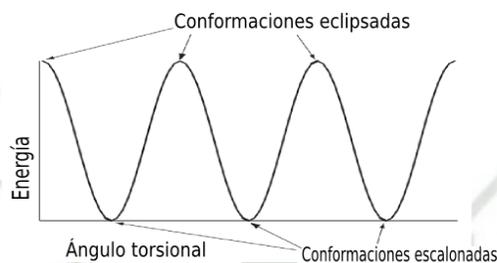


Figura 2.14: Representación de la energía conformacional de un ángulo diedro representada por la función coseno [130].

2.3.1.3 Diedros Impropios: También denominados términos torsionales fuera de plano, es un ángulo de torsión en donde los cuatro átomos no están unidos en la secuencia 1-2-3-4, en su lugar tienen una secuencia de 1-5-3-2 como es el caso del ciclobutano y este se puede apreciar en la figura 2.15. Además, estos términos no siempre son necesarios en los campos de fuerza, ya que tienen un efecto negativo en la performance del campo de fuerza y las frecuencias vibracionales son relativamente sensibles a éstos; no obstante existe el campo de fuerza llamado campo de fuerza de átomos unidos que incluye este término.

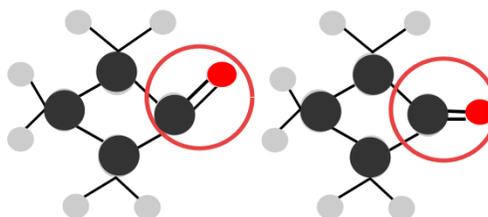


Figura 2.15: Diedro impropio del ciclobutano. Sin el término del diedro impropio, el átomo de oxígeno en el ciclobutano puede salir fuera del plano del anillo (izquierda) a diferencia del que se encuentra en el plano (derecha).

La fórmula del diedro impropio se encuentra representada en la ecuación 2.6.

$$v(\omega) = k(1 - \cos 2\omega) \quad (2.6)$$

2.3.1.4 Interacciones electrostáticas: Los elementos más electronegativos atraen más electrones que los elementos menos electronegativos, dando lugar a una distribución desigual en la carga de la molécula, estas cargas están destinadas para reproducir las propiedades electrostáticas de la molécula. Por otro lado, si las cargas están restringidas a los centros nucleares de la molécula (átomos), estas cargas se denominan cargas atómicas parciales y representan la interacción electrostática entre dos moléculas o entre partes diferentes de la misma molécula. Calculando la suma de las interacciones entre los pares de puntos cargados empleando la ley de Coulomb, la cual se muestra en la ecuación 2.7.

$$V = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (2.7)$$

La ecuación 2.7 nos permite modelar el efecto electrostático del solvente y las interacciones entre sitios distantes que pueden ser parte de la molécula gracias a la constante dieléctrica (ϵ). Si dicha constante adopta un valor de 1, este valor corresponde al vacío. Los valores que puede tomar ϵ dentro de las macromoléculas pueden ir del 1 hasta el 4, dichos números incrementan la eficiencia del cálculo, por consiguiente si dos átomos están directamente unidos, no debería existir una interacción no enlazante. Para evitar ello la mayoría de campos de fuerza incluyen las interacciones no enlazantes para pares de átomos que estén separados por 3 o más enlaces [131].

2.3.1.5 Interacciones de Van der Waals: Las interacciones dispersas y repulsivas de intercambio entre átomos y moléculas para un campo de fuerza requieren de una media para modelar la curva de potencial interatómico, la cual se puede apreciar en la figura 2.16. El potencial interatómico debe ser evaluado rápidamente, ya que existe un gran número de interacciones de van der Waals que deben ser determinados en varios sistemas, para ello la mejor manera de calcularlos es empleando la función de Lennard-Jones 12-6 [132], la cual se representa en la ecuación 2.8.

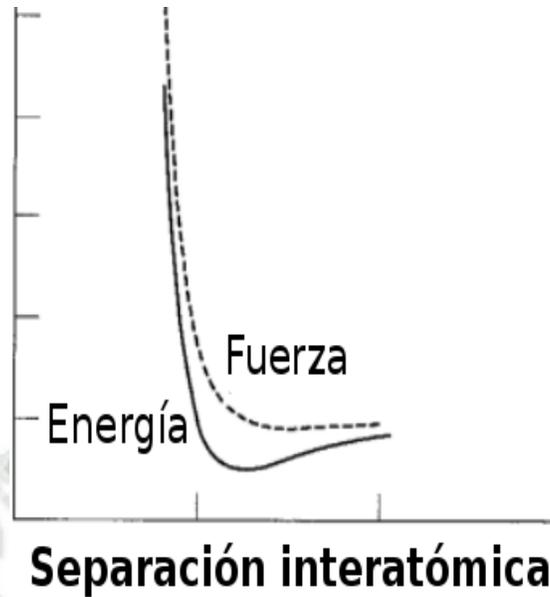


Figura 2.16: Representación de la Energía de Interacción, y fuerza entre dos átomos de argón [23].

En esta ecuación, el potencial de Lennard-Jones 12-6 presenta dos parámetros, el parámetro colisión σ y la profundidad del pozo representada por ϵ .

$$v(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2.8)$$

Luego de hablar sobre los requerimientos mínimos del campo de fuerza y las características de cada uno de sus términos de valencia, nos enfocaremos en las definiciones y requerimientos que necesitamos para realizar una simulación de dinámica molecular, la cual abarca desde las condiciones periódicas de contorno hasta las topologías necesarias para que comience nuestra simulación.

2.3.2. Condiciones Periódicas de Contorno (CPC)

Para entender las CPC comencemos con un ejemplo, imaginemos que tenemos 1000 moléculas de agua con un volumen específico, el cual puede ser cúbico, paralelepípedo, hexagonal o dodecaédrico. A pesar de que estas 1000 moléculas están diseñadas para encajar en un volumen predeterminado, existe una pequeña fracción de éstas que van a chocar contra la

pared de la caja en la que se encuentran. Para evitar estos efectos de borde, se emplean las CPC simulando que el líquido es infinito; de hecho, las moléculas que se encuentran en el borde de la siguiente caja son una copia de las moléculas que se encuentran en el borde opuesto de la caja [130] como se puede visualizar en la figura 2.17. Las distancias del cut-off

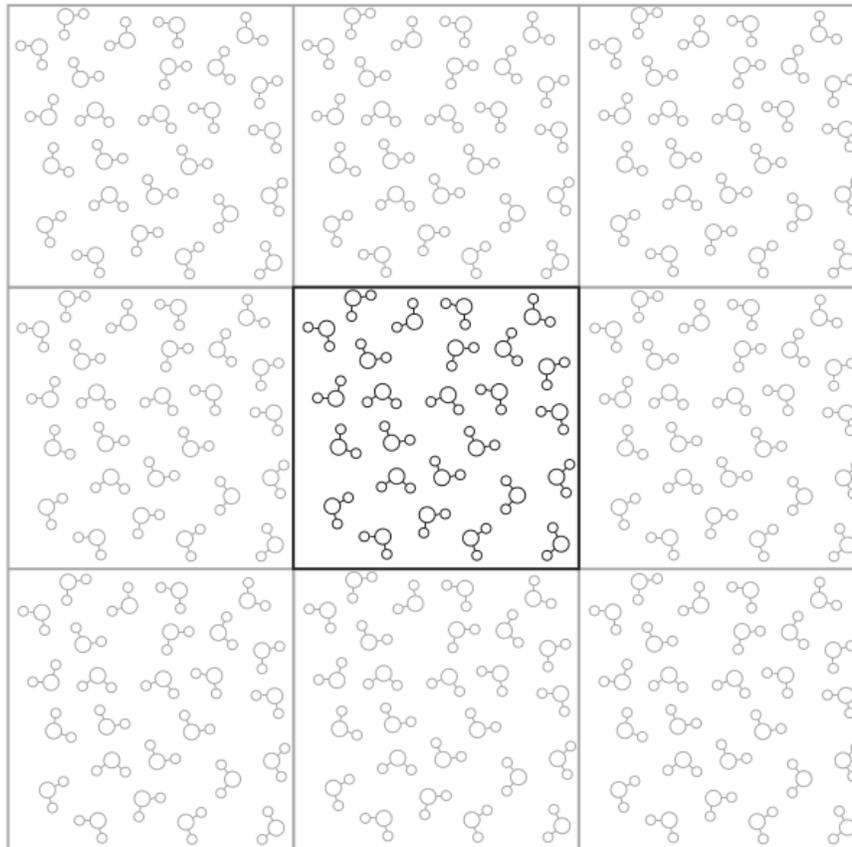


Figura 2.17: Condiciones Periódicas de Contorno. Las moléculas que se encuentran alrededor del centro de la caja son copias del centro de la caja [130].

normalmente son usadas para evaluar la interacción de pares no enlazantes, así que la caja en la simulación necesita estar rodeada por sus vecinos más cercanos como se muestra en la figura 2.17. Si la trayectoria de un átomo individual escapa de la periodicidad de la caja de la simulación en una o más coordenadas de la caja, dicha imagen simultáneamente entra en el punto relacionado con la locación de salida por la simetría de las condiciones periódicas de contorno. A pesar que las CPC nos facilitan la simulación con líquidos, nos crea un tipo de error, dado que si las fuerzas no enlazantes de largo alcance, incluídas en el cálculo, interactúan con el mismo átomo de las dos imágenes del sistema, entonces una simetría de largo alcance

habrá sido incorporada en el sistema de una manera poco natural. Para evitar dicho problema, las fuerzas de largo alcance son calculadas sólo con una distancia del cut-off que debe ser menor a la mitad del tamaño de la longitud de la caja, lo cual se denomina la convención de mínima imagen [133]. Además, otros métodos han sido desarrollados donde la interacción electrostática de largo alcance trata de realizar la suma de todos los átomos (N^2). Los métodos de suma de Ewald [134] han sido desarrollados para sistemas periódicos y también pueden ser aplicados a modelos semi-periódicos que aplican CPC. La idea de estos métodos es separar la interacción cercana y lejana del sistema estudiado. Un punto esencial en estos métodos es la existencia de algoritmos computacionalmente eficientes que desarrollan las transformadas de Fourier, éstos reducen el escalamiento de N^2 a $N^{\frac{3}{2}}$. Un método relacionado con dicho escalamiento es el Enmallado de Partículas de Ewald (EPE), que escala sólo $N \ln(N)$ [135].

2.3.3. Energía de Minimización

Varios problemas pueden ser formulados en la química computacional como una optimización en múltiples dimensiones. Al hablar de optimización, nos estamos refiriendo a encontrar los puntos estacionarios en una función, en otras palabras, encontramos los puntos donde la primera derivada es 0 donde, en la mayoría de los casos, el punto estacionario deseado es un mínimo (las segundas derivadas son positivas). Para calcular estos puntos mínimos existen varios métodos, no obstante en esta oportunidad nos centraremos en uno de los métodos más empleados denominado *Steepest Descent* [136]. Este método mueve a las partículas en dirección paralela a la fuerza neta en todas las coordenadas cartesianas ($3N$). La dirección previamente mencionada se representa mejor con vectores unitarios tridimensionales, como se representa en la siguiente ecuación:

$$s_k = \frac{-g_k}{|g_k|} \quad (2.9)$$

Donde la dirección de los vectores unitarios se encuentra definida por s_k , el gradiente por donde se van a mover los vectores se encuentra definida por g . Para tener una mejor explicación de cuán lejos se mueven nuestros vectores a lo largo del gradiente, consideraremos la energía de superficie en dos dimensiones, donde la dirección del gradiente desde el punto inicial, se encuentra a lo largo de la línea indicada en la figura 2.18.

Si imaginamos una sección cruzada a través de la superficie a lo largo de la línea, la función pasará a un mínimo y luego ésta se incrementará, pudiendo elegir colocar el punto mínimo en una búsqueda lineal o podemos tomar un paso (step) de tamaño arbitrario a lo largo de la dirección de la fuerza [137].

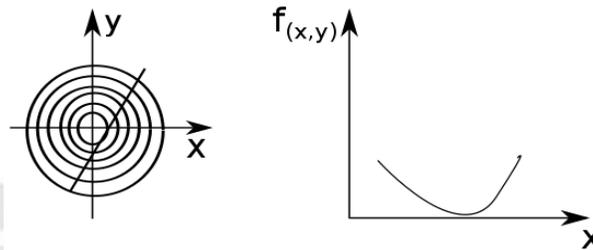


Figura 2.18: Método de Minimización Steepest Descent. Este método se basa en la búsqueda de un mínimo global de la función (dependiente de la posición de los átomos) en dirección al gradiente. La figura de la izquierda muestra un mapa de contorno y el de la derecha muestra la función [23].

2.3.3.1 Búsqueda de la Malla o Grid: La manera más simple de buscar conformaciones es escogiendo un set de conformaciones, cada uno de los cuales es diferente por un conjunto de grados a partir del primer conformero. Si cada conformero es dividido en M ángulos diferentes y en N enlaces, entonces los ángulos son rotados, lo cual resulta en M^N posibles conformeros. Para lograr una búsqueda adecuada dentro del espacio de las conformaciones, estos puntos deben ser cercanos (ver figura 2.19). A pesar de que sea muy lento, una búsqueda de la malla con un pequeño tamaño de paso es la única manera de estar completamente seguros de alcanzar un mínimo global [138].

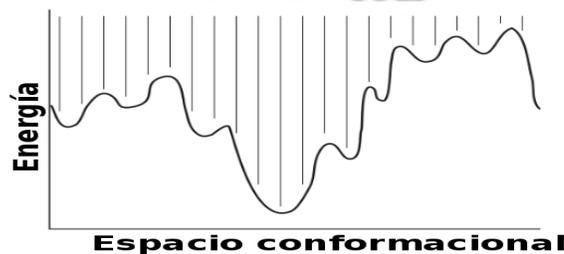


Figura 2.19: Representación de la búsqueda del espacio conformacional usando el método de malla o grid. La figura muestra una búsqueda de malla fina [130].

2.3.4. Dinámica Molecular

Los métodos de dinámica molecular (DM) resuelven la ecuación de movimiento de Newton para los átomos presentes en un sistema. La energía total de la molécula está representada por la energía cinética y potencial y éstas están íntimamente relacionadas con la temperatura a la cuál se realiza cualquier simulación [139], a medida que varía la temperatura de la simulación, cambia la energía total de la simulación. Anteriormente, realizar simulaciones podía llevar un largo tiempo, pero con los recursos que tenemos en la actualidad, el tiempo de simulación se ha acortado. Asimismo, los métodos de dinámica molecular usan la dinámica inherente del sistema para buscar el mínimo de energía. También pueden ser usados para muestrear el espacio conformacional cuando la geometría inicial viene dada por información experimental (estructura de Rayos-X o NMR) [140]. Como ya lo hemos mencionado en algunas líneas previas, los métodos de dinámica molecular se basan en resolver la ecuación diferencial de la segunda ley de Newton, como lo veremos en las siguientes ecuaciones:

Segunda ley de Newton:

$$F = m * a \quad (2.10)$$

Derivando la ecuación 2.10:

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (2.11)$$

La ecuación 2.11 nos da una breve descripción del movimiento de una partícula con masa m_i a lo largo de una dimensión (x_i), donde F_{x_i} es la fuerza obtenida de esa partícula en la dirección x . El resultado de esta ecuación y sus sucesivas ecuaciones diferenciales, resultan en una trayectoria que nos especifica cómo las posiciones y velocidades de cada uno de los átomos del sistema varían en el tiempo [141]. Dado que la ecuación de Newton presenta posiciones y velocidades. Los softwares de mecánica molecular han empleado varios algoritmos para actualizar dichas posiciones y velocidades, El algoritmo que emplearemos es el Leap Frog o salto de rana, el cual describiremos a continuación no sin antes dar una breve descripción del algoritmo de Verlet, ya que este es el más usado y el salto de rana es sólo una mejora de éste.

2.3.4.1 Integrador de Verlet y Salto de Rana: En el *algoritmo de Verlet* [142], las posiciones y aceleraciones para un tiempo t y las posiciones del anterior paso del tiempo $\mathbf{R}(t - dt)$ son usados para calcular las posiciones actuales $\mathbf{R}(t + dt)$, usando la siguiente ecuación:

$$\mathbf{R}(t + dt) = 2\mathbf{R}(t) - \mathbf{R}(t - dt) + dt^2 \mathbf{A}(t) \quad (2.12)$$

A pesar de que el *algoritmo de Verlet* es muy usado, este no representa explícitamente las velocidades, lo cual es una desventaja ya que las velocidades sólo estarán disponibles luego que las posiciones hayan sido determinadas en el siguiente paso del tiempo. Después de haber visto la desventaja del *algoritmo de Verlet* hablaremos del *algoritmo del Salto de Rana* [143], que actualiza sus posiciones de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\mathbf{R}(t + dt) = \mathbf{R}(t) + dt\mathbf{V}\left(t + \frac{1}{2}dt\right) \quad (2.13)$$

y sus velocidades de acuerdo a la ecuación 2.13:

$$\mathbf{V}\left(t + \frac{1}{2}dt\right) = \mathbf{V}\left(t - \frac{1}{2}dt\right) + dt\mathbf{A}(t) \quad (2.14)$$

La ecuación 2.13 nos muestra las velocidades $\mathbf{V}\left(t + \frac{1}{2}dt\right)$, las cuáles son calculadas a partir de las velocidades en un tiempo $t - \frac{1}{2}dt$ y las aceleraciones en un tiempo t usando la ecuación 2.12; luego, las posiciones $\mathbf{R}(t + dt)$ son calculadas a partir de las velocidades $\mathbf{V}\left(t + \frac{1}{2}dt\right)$ y las posiciones $\mathbf{R}(t)$ usando la ecuación 2.13, es por todo ello que se le atribuye el nombre de *salto de rana*, es decir, las velocidades son calculadas dando un *salto de rana* sobre las posiciones, donde posteriormente las posiciones son calculadas de tal manera que dan un *salto de rana* sobre las velocidades, y así sucesivamente [144].

2.3.4.2 Solvatación: La mejor manera para modelar una molécula en solución en una simulación computacional sería insertando todas las moléculas del solvente explícitamente y realizando el cálculo por medio de métodos de dinámica molecular para dar un tiempo promedio y un promedio del ensamble de alguna propiedad que se desea estudiar, como lo hablaremos más adelante. Todo ello se puede realizar usando la mecánica molecular junto con los campos de fuerza, aunque todo esto requiere de un alto costo computacional [145].

2.3.4.3 Ensamblés: Se basan en mantener ciertas condiciones macroscópicas constantes. Dependiendo de la condición que se mantiene constante, los ensambles se definen de la siguiente manera: ensamble isotérmico-isobárico (número de partículas (átomos) (N), presión (P) y temperatura (T) constantes), ensamble gran canónico (potencial químico (μ), volumen (V) y temperatura (T) constantes) y el ensamble canónico muy parecido al ensamble gran canónico, sólo se cambia el potencial químico (μ) por el número de partículas (N). En esta oportunidad nos centraremos en el ensamble canónico dado que es el que emplearemos en la presente tesis y es el más empleado en la simulación de proteínas [146], el cual se muestra en la ecuación 2.15.

$$Q(N, V, T) = \sum_i e^{-E_i(N, V)/k_B T} \quad (2.15)$$

Donde, i abarca todos los posibles estados de energía del sistema, teniendo a la energía como E_i y k_B siendo la constante de Boltzmann ($1.3806 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$).

2.3.4.4 Manteniendo la Temperatura constante: dado que el ensamble canónico debe mantener la temperatura constante existen diversos termostatos (Berendsen, Nosé-Hoover). El termostato de Berendsen [147], actúa como un baño de calor conservando la energía al adicionar o eliminar la temperatura necesaria. Las velocidades son reescaladas en cada paso, donde el cambio de temperatura es proporcional a la diferencia de temperatura del sistema (T) y la temperatura externa (T_0), como se aprecia en la siguiente ecuación:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (2.16)$$

Esta ecuación representa la desviación de la temperatura, la cual decae exponencialmente con respecto a un tiempo constante τ . Por otro lado, el termostato de rescalamiento de velocidades añade un término estocástico al termostato de Berendsen para asegurar una correcta distribución de la energía cinética [148], como se observa en la siguiente ecuación:

$$dK = (K_0 - K) \frac{dt}{\tau_T} + 2 \sqrt{\frac{K K_0}{N_f}} \frac{dW}{\sqrt{\tau_T}} \quad (2.17)$$

Donde K es la energía cinética, N_f el número de grados de libertad y dW es el proceso Wiener. El presente termostato genera un correcto ensamble canónico y su energía viene a ser representada en el archivo log.

2.3.5. Paralelización

Tradicionalmente las supercomputadoras (computadoras con una enorme capacidad de procesamiento), han sido sólo construidas por un número selecto de vendedores; por ende, si alguna entidad u organización requiriera comprarla, dicha compañía hubiera necesitado de un gran capital para hacerlo. Desarrolladores públicos y privados comenzaron a diseñar estrategias, para que las computadoras fueran más accesibles al público, donde los usuarios pudieran realizar múltiples tareas en varias computadoras y luego pudieran reunir toda la información de éstas (cluster en computación). Esto se pudo alcanzar gracias al desarrollo de las computadoras personales (denominadas PC), es allí donde la brecha entre una supercomputadora y un cluster de múltiples computadoras personales se hizo muy pequeño [149]. Por otro lado, el algoritmo del dominio de descomposición o DD, descompone el componente de las interacciones no enlazantes en dominios que comparten localidad espacial, lo que permite la eficiencia del código para ser escrito. Cada dominio maneja todas las interacciones partícula-partícula (PP) para sus miembros y las mapea en un solo rank, dentro de dicho rank los hilos del OpenMP pueden compartir la carga del trabajo o el trabajo puede ser llevado a un GPU. Además, el PP también puede manejar las interacciones enlazantes en su dominio [150]. El cut-off de Verlet usa un buffer para la búsqueda de la lista de pares vecinos (el cut-off de la lista de pares vecinos es más grande que el cut-off de la simulación), donde las interacciones no enlazantes sólo son calculadas cuando un par de partículas (átomos) se encuentra dentro de la distancia del cut-off en un paso de tiempo en particular, lo cual nos asegura que como las partículas se mueven entre los pasos en búsqueda de pares vecinos, las fuerzas entre casi todas las partículas dentro del cut-off van a moverse lo suficiente durante un número fijo de pasos cuya distancia se encuentra dentro del cut-off.

2.3.6. Acoplamiento Molecular y la Energía Libre de Unión

La predicción de la fuerza y especificidad con la cual una molécula pequeña se logra unir a una macromolécula biológica es de suma importancia en el campo del diseño de fármacos, ya que varios fármacos existentes en la industria se unen a los sitios activos de enzimas

particulares tan fuertemente que los sustratos normales de estas enzimas son incapaces de desplazarlas [151]. Así que si nosotros conocemos la actividad de una enzima ó molécula pequeña, pero no existe una biomolécula que se una a su sitio activo o queremos hacer la prueba con alguna biomolécula por las propiedades que presenta esta enzima ó molécula pequeña, uno puede hacer uso de la química computacional para evaluar la energía de interacción al realizar la unión de estas biomoléculas, este proceso es conocido como *acoplamiento molecular*. El acoplamiento molecular es un método de optimización, que predice la orientación preferida del ligando unido a la proteína y que forma un compuesto estable. También es muy usado para predecir la afinidad de unión usando términos energéticos o una apropiada función de puntuación (*scoring*) [152]. Para realizar esto, existen 3 procedimientos de acoplamiento molecular, el acoplamiento de cuerpo rígido (el receptor (macromolécula) y la molécula pequeña son rígidos), el acoplamiento del ligando flexible (el receptor (macromolécula) se mantiene fijo, pero la molécula pequeña es flexible) y el acoplamiento flexible (el receptor (macromolécula) y la molécula pequeña son considerados flexibles). En esta investigación nos centraremos en el acoplamiento rígido, dado que el software que emplearemos se basa en un algoritmo que emplea dicho acoplamiento, con una superficie variable o flexible y una penetración intermolecular liberal. La alta eficiencia del algoritmo depende de varios factores: (a) se enfoca en la superficie molecular inicial que encaje en la superficie de los sitios activos; (b) emplea los diferentes acoplamientos para detectar la transformación inicial del sistema (receptor-ligando); (c) logra la precisión en el cálculo de los diferentes acoplamientos utilizando el cálculo de las distancias; (d) la detección eficiente de los impedimentos estéricos y la puntuación del acoplamiento geométrico son empleados para obtener el mejor acoplamiento y (e) utiliza la información biológica al enfocarse en donde se encuentran los sitios activos en la superficie [153]. La aproximación de la energía libre de unión es usada en varias funciones de puntuación para que el ligando se una al receptor, donde la energía de unión puede ser escrita como una ecuación aditiva de varios componentes que reflejan varias contribuciones al momento de unión, dichas contribuciones se pueden apreciar en la siguiente ecuación [154]:

$$\Delta G_{unión} = \Delta G_{solvente} + \Delta G_{conf} + \Delta G_{int} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{t/r} + \Delta G_{vib} \quad (2.18)$$

Donde $\Delta G_{solvente}$ es la contribución debido a los efectos del solvente a partir de la interacción del solvente con el ligando, la proteína y el complejo intermolecular; ΔG_{conf} son los cambios conformacionales en la proteína y en el ligando, el cual cambia a partir de las conformaciones de ensamble a las conformaciones en estado de unión; ΔG_{int} es la energía libre de las interacciones específicas del ligando con el receptor; ΔG_{rot} es la energía libre perdida (trans+gauche) asociada a las rotaciones congeladas del ligando con el receptor, debido a la contribución de la entropía; $\Delta G_{t/r}$ es la pérdida de la energía libre en las translaciones y rotaciones causada por la asociación de dos cuerpos; ΔG_{vib} es la energía libre debido a los cambios asociados con modos vibracionales, la cual es usualmente ignorada, dado que su cálculo es muy difícil.

2.3.7. Post-procesamiento

2.3.7.1 Raíz Cuadrática de la Desviación Media (RMSD): El RMSD nos muestra el acercamiento o la desviación de la estructura final con respecto a la estructura inicial observando el cambio de posición de los átomos con respecto al tiempo (trayectoria). El criterio que se emplea para aceptar el equilibrio de la estructura final es una distancia de 0 a 3.0 Å o entre 0 - 0.3 nm con respecto a la estructura inicial [155]. El RMSD viene definido por la siguiente ecuación:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (r_{i,sim} - r_{i,expt})^2}{N}} \quad (2.19)$$

Donde N es el número de átomos en una macromolécula, r son las posiciones determinadas en un sistema de coordenadas teniendo un centro de masa de origen alineando los principales momentos de inercia a través del eje cartesiano, es decir, las estructuras simuladas (r_i, sim) y experimentales ($r_i, expt$) son alineadas mejor antes del cálculo del RMSD, ofreciéndonos una manera cuantitativa de medida al ver cuán cerca está la estructura simulada de la estructura inicial.

2.3.7.2 Raíz Cuadrática Media de las Fluctuaciones por Aminoácido (RMSF):

Es un análisis que mide la flexibilidad de la cadena polipeptídica. Este cálculo se realiza mediante la fluctuación de las coordenadas de los átomos C- α a partir de su posición promedio,

la cual se ejemplifica en la siguiente ecuación:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T (r_{i,sim} - r_{i,expt})^2} \quad (2.20)$$

Donde T es el número de frames, ya que se podría decir que para cada átomo se realiza un análisis por residuos.

2.3.7.3 Análisis de la Energía Total: La energía total se puede calcular gracias a la suma de los términos energéticos como son la energía cinética y potencial. La energía potencial es la suma de los términos de las interacciones enlazantes con las no enlazantes, en otras palabras, es la energía obtenida por el campo de fuerza; mientras que la energía cinética se puede calcular de la siguiente manera:

$$K = \frac{1}{2} m_i \sum_{i=1}^N v_i^2 \quad (2.21)$$

Donde la velocidad viene dada por las coordenadas (x, y, z).

2.3.7.4 Análisis de la Estructura Secundaria de la Proteína (DSSP): Sirve para observar si se han presentado cambios en la estructura secundaria de la proteína [156]. Estos diagramas se obtienen a partir del comando `gmx do_dssp`, a través de un código donde se coloca el tamaño de los ejes x (trayectoria de la simulación) y y (aminoácidos o residuos). Luego, de ejecutar el comando obtenemos un gráfico que nos indica según los colores si se han conservado las hojas- β , las α -hélices, las colas y los puentes- β a lo largo de la simulación, como se muestra en la figura 2.20.

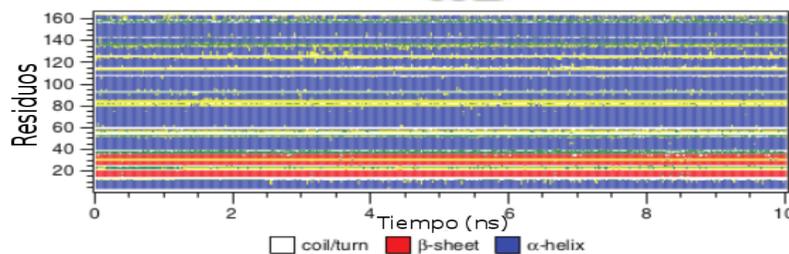


Figura 2.20: Análisis de la Estructura Secundaria de la Proteína (DSSP). Las hélices de la lisozima están ligeramente desenrolladas al inicio y al final, pero toda la estructura se encuentra estable a los 10 ns de la simulación [156].

2.3.7.5 Validación de la estructura: Ploteo de Ramachandran: El ploteo de Ramachandran se diseñó para encontrar conformaciones estables en proteínas pequeñas variando sus ángulos (ψ y ϕ) [157], los cuales corresponden a la rotación de los enlaces N-C α y C α -N. Actualmente el ploteo de Ramachandran nos permite validar la estructura secundaria (α -hélices u hojas- β) de cualquier proteína visualizando los contactos cercanos entre los átomos. Los átomos son considerados como esferas rígidas con dimensiones correspondientes a su radio de van der Waals, por lo tanto, los ángulos (ψ contra ϕ) que causan una colisión de las esferas, corresponden a ángulos prohibidos y a conformaciones no permitidas causando impedimentos estéricos en la conformación de la proteína (figura 2.21).

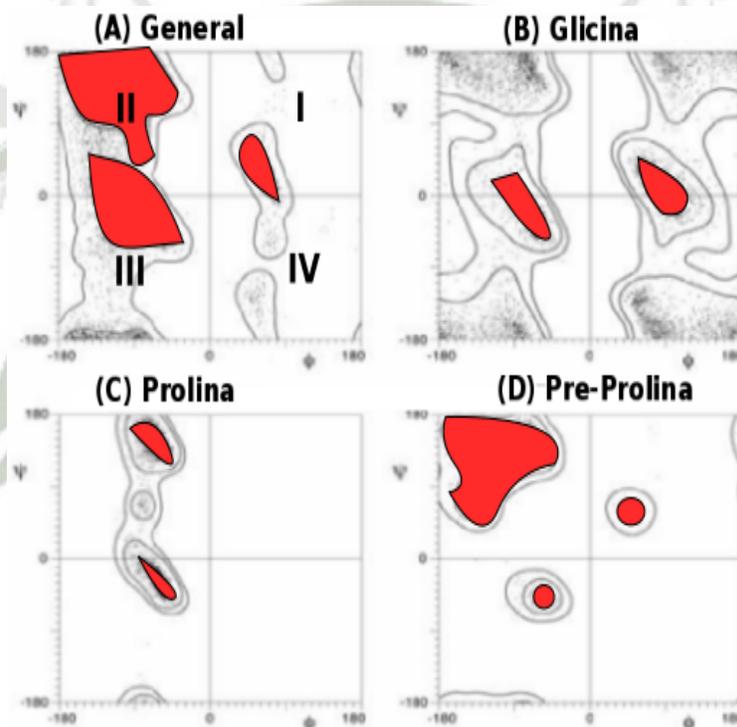


Figura 2.21: Ploteo de Ramachandran. (a) gráfico de Ramachandran general donde el primer cuadrante muestra las combinaciones de las hélices- α con giro a la derecha, el segundo cuadrante nos muestra las combinaciones de las hojas- β y el tercer cuadrante nos muestra las combinaciones de las hélices- α con giro a la izquierda; (b) residuos de glicina, este es el único aminoácido que no presenta cadena lateral, por ende no presenta impedimento estérico, es decir, la glicina puede encontrarse en cualquiera de los 4 cuadrantes; (c) residuos de prolina y (d) residuos precedidos por prolina (preprolina) en la secuencia de aminoácidos [157].

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1. Detalles Computacionales

HARDWARE:

- Workstation con 64 GB de memoria RAM y 3 discos duros de 1, 4 y 6 TB.
- 2 Tarjetas Gráficas NVIDIA GeForce GTX 1080.

SOFTWARE:

- GROMACS 2016.3 [158].
- Visualizadores: UCSF CHIMERA-1.11.2 [159], VMD [160], MOLGEN 5.7 [161].

SERVIDORES:

- RAMPAGE [157].
- PATCH DOCK [162].
- FIREDOCK [163, 164]
- CyBase [165, 166].
- Protein Data Bank (PDB) [167].

3.2. Métodos

3.2.1. Determinación de las estructuras iniciales de los ciclótidos presentes en la familia Rubiaceae susceptibles de interactuar con el oligómero del β -amiloide normal y los oligómeros de los β -amiloides mutados

1. Se realizó la búsqueda de estructuras cristalográficas de los ciclótidos en los servidores del Protein Data Bank (PDB) [167] y CyBase [165, 166].
2. Se modificó el campo de fuerza OPLSAA empleando el software GROMACS 2016.3 [158] para el reconocimiento de los 3 puentes disulfuro que poseían los ciclótidos para que se reconociera el enlace peptídico, el cual permitió mantener el ciclótido cerrado y se procedió a realizar la optimización de los ciclótidos pertenecientes a la familia de la Rubiaceae.
3. Se realizó una simulación de dinámica molecular luego de haber optimizado el ciclótido. La simulación de DM se realizó bajo las siguientes condiciones: un ensamble canónico (NVT), donde la temperatura se mantuvo constante con el termostato de v-rescale, un tiempo de simulación de 200 ns y con condiciones periódicas de contorno.

3.2.2. Modelación y evaluación del oligómero del β -amiloide normal y los oligómeros de los β -amiloides mutados

1. Se realizó la búsqueda de la estructura cristalina del oligómero de β -amiloide encontrándose un dodecámero de *beta*-amiloide (PDB: 2mxu) [168], el cual se empleó como nuestra estructura inicial. Se preparó el archivo de la estructura obteniendo las 12 cadenas para realizar su optimización.

2. Se empleó el software UCSF Chimera [159] para realizar las mutaciones respectivas en el dodecámero del *beta*-amiloide, usando el siguiente comando: `swapaa gly #0:22.A`, el cuál nos permitió reemplazar el aminoácido que se encontraba en la posición 22 en la cadena A por glicina. Para la obtención de las presentes estructuras, se realizó esta operación para las cuatro mutaciones (ártica, flamenca, italiana y holandesa) en cada una de sus 12 cadenas (A-L).

3. **Optimización del dodecámero de *beta*-amiloide y simulación de DM:** se realizó una minimización de energía con el algoritmo steepest descent empleando los 5 archivos obtenidos en el paso anterior (dodecámeros mutados y el dodecámero normal), para la relación de las estructuras se utilizó las tarjetas de video para agilizar los cálculos y las siguientes líneas de comando para realizar la minimización de energía:

gmx editconf define un tamaño de caja apropiado para la proteína, cada oligómero se simuló en una caja triclinica (-bt triclinic), las dimensiones de la caja fueron dadas de acuerdo a la distancia más larga de la proteína (-d 1), se centró (c) y se renumeraron los aminoácidos (-resnr -1).

gmx solvate aumenta moléculas de agua al archivo anterior que puedan rellenar el tamaño de la caja para lograr un efecto de solvatación en la proteína, especificando el soluto (-cs), el solvente (spc216.gro) y el nuevo archivo que se generará (-o).

gmx pdb2gmx genera la topología molecular y traduce un archivo .pdb en un archivo .gro, cuya principal diferencia radica en el formato y que el archivo en .gro puede contener las velocidades de la simulación. En nuestro caso, se generaron archivos .pdb a partir del último archivo generado en el comando *gmx solvate* (-o), se generó el archivo de las topologías (-p .top), el cual contiene una descripción completa de las interacciones existentes en las proteínas. Este comando busca los campos de fuerza en el subdirectorio del campo de fuerza oplsa (-ff oplsa) incluyendo los archivos para la generación de la topología (-i .itp) y finalmente genera un archivo de salida (-o) para que pueda ser reconocido por el comando siguiente.

gmx grompp procesa todos los archivos de entrada (.top, .mdp, .gro), con los que generó el archivo de salida, el cuál fue usado para la corrida (-o .tpr). El archivo minima.mdp

o nvt.mdp contiene toda la información a cerca de la simulación de dinámica molecular (número de pasos, temperatura, presión, etc.), genera los parámetros de dinámica molecular (-po .mdp) para realizar la ejecución de la simulación (minima.mdp) y genera el archivo de salida (-o)

gmx genion reemplaza las moléculas de solvente con iones monoatómicos (Na, en nuestro caso), lee el .tpr, neutraliza el sistema al agregar los iones necesarios para tener una carga neta 0 del sistema (-neutral) y genera un nuevo archivo con los iones incluidos dentro de este (-o).

gmx mdrun realiza la simulación, requiriendo del archivo .tpr para generar un archivo de trayectoria (-o .trr), puntos de revisión para reiniciar la corrida (-cpi .cpt), archivos de energía (-e .edr), un archivo de trayectoria comprimido (-x .xtc), un archivo log (-g .log), el empleo de las tarjetas GTX 1080 (-gpu_id) y la generación del archivo final (-o final.pdb).

Dado que son varios comandos y ya hemos visto para qué se utiliza cada uno de ellos, ahora veremos el orden en el que se emplean cada uno y en el proceso específico en el cuál se ven involucrados en la optimización y relajación de la proteína. Para la minimización de energía, primero se preparó la proteína para que ésta tuviera una carga neta 0 en el proceso de *neutralización*, donde se realizó primero una solvatación empleando los comandos (*gmx editconf*, *solvate*), luego se agregaron los iones (*gmx pdb2gmx*, *grompp* y *genion*), después de que los iones se adhirieron a nuestra proteína se realizó la minimización de energía con los comandos (*gmx pdb2gmx*, *grompp* y *mdrun*). Después, se realizó una dinámica molecular al vacío (fase gas) para que los iones se adhieran por completo a nuestra proteína, realizando una simulación de 100 ns, con condiciones periódicas de contorno y el ensamble canónico (309, 65 °K), esto se realizó con la misma línea de comandos de la minimización al vacío con la única diferencia de que el comando *gmx grompp* se reemplazó el archivo minima.mdp por el archivo nvt.mdp. Por último, se realizó una simulación de dinámica molecular en fase solvente para que la simulación se asemeje a las condiciones fisiológicas del cuerpo humano, en la cuál se realizó el mismo procedimiento que en la fase gas.

4. Una vez obtenida la simulación de dinámica molecular del oligómero de β -amiloide normal y los oligómeros de β -amiloide mutados, se procedió a realizar un análisis de los datos obtenidos, analizando el *RMSD*, *RMSF*, el *Análisis de covarianza* se empleó para obtener la estructura promedio de las proteínas y posteriormente la validación de la estructura mediante los gráficos de *Ramachandran* y *DSSP*. Los comandos que se emplearon para dichos análisis fueron los siguientes:

Para realizar el *RMSD* se empleó el comando `gmx rms -s archivo.tpr -f archivo.trr -o archivo .xvg` (empleado por el programa gnuplot) `-pbc yes` (condiciones periódicas de contorno) `-fit rot+trans` (rotaciones + translaciones) `-mw yes` (centro de masa de la proteína).

Para realizar el *RMSF* se empleó el comando `gmx rmsf -s archivo.tpr -f archivo.trr -o archivo.xvg -res` (calcula la fluctuación promedio de cada uno de los residuos).

Para realizar el *Análisis de covarianza* se empleó el comando `gmx covar -f archivo.trr -s archivo.tpr -av archivo de salida.pdb -b desde un tiempo en ps. -e hasta un tiempo en ps. -fit yes -pbc yes`.

Para realizar el *DSSP* se empleó el comando `gmx do_dssp -f archivo.trr -s archivo.tpr -map archivo.map` (archivo que mapea la matriz de colores) `-o archivo.xpm` (archivo en X PixMap). Además del *DSSP*, el ploteo de Ramachandran nos permitió validar nuestra proteína después de haber realizado el análisis de covarianza, pero esta validación fue realizada por medio del servidor RAMPAGE [157].

3.2.3. Generación de hipersuperficies de potencial electrostático, a partir de la interacción ciclótido-oligómero de β -amiloide normal y de la interacción ciclótido-oligómeros de β -amiloides mutados

1. Se empleó el servidor PDB2PQR [169] para convertir el archivo.pdb en un archivo.pqr. En el archivo.pqr deben estar presentes la carga atómica (se emplea para distribuir la carga de los oligómeros para la ecuación de Poisson-Boltzmann), y la información del

radio (construye las funciones de accesibilidad dieléctrica y iónica). Una vez obtenido este archivo.pqr, se corrió el programa APBS [170] (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver, traduciendo al español sería el Solucionador Adaptativo de Poisson-Boltzmann), el cuál permite realizar los cálculos electrostáticos de los oligómeros de β -amiloides tanto normal como mutados; así como los cálculos electrostáticos del ciclótido y el acoplamiento de cada uno de los oligómeros con el ciclótido.

3.2.4. Acoplamiento molecular de los ciclótidos de la familia Rubiaceae con el oligómero del β -amiloide normal y los oligómeros de los β -amiloides mutados y proposición de los sitios favorables de interacción

1. Se usó del servidor PATCH DOCK [162] para acoplar los oligómeros de β -amiloide mutados (ártica, flamenca, italiana, holandesa) y el oligómero de β -amiloide normal con el ciclótido caripe 4. Este servidor propuso varias conformaciones de acuerdo a las energías de unión (ΔG) de las estructuras acopladas. De las cuáles, se tomó en cuenta la conformación con menor energía de unión para cada uno de los oligómeros. Se ha realizado simulaciones de dinámica molecular de 50 ns para cada una de las conformaciones. para obtener la energía libre de unión (ΔG) de cada oligómero. Además, se empleó el servidor FIREDOCK [163, 164] para realizar un refinamiento logrando así una mejor predicción de su sitio de unión.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

La estructura inicial del dodecámero de β -amiloide normal, se obtuvo a partir de la base de datos del PDB (Protein Data Bank) con el código 2MXU [168]. La estructura presentaba la ausencia de los primeros 10 aminoácidos, debido fundamentalmente a que estos aminoácidos dificultaban el proceso de cristalización [168]. En la presente tesis se agregaron los 10 primeros aminoácidos faltantes para tener una estructura completa cercana a la realidad, adicionalmente se construyeron los cuatro dodecámeros de β -amiloides mutados, ártica (E22G), flamenco (A21G), holandesa (E22Q) e italiana (E22K). Existen estudios en los cuáles se menciona que estas mutaciones son las más frecuentes en la clase de Alzheimer temprano [13]. Las cinco estructuras presentan hojas- β y el puente salino característico de los β -amiloides [14] (ver figura 4.1 y figura 4.2).

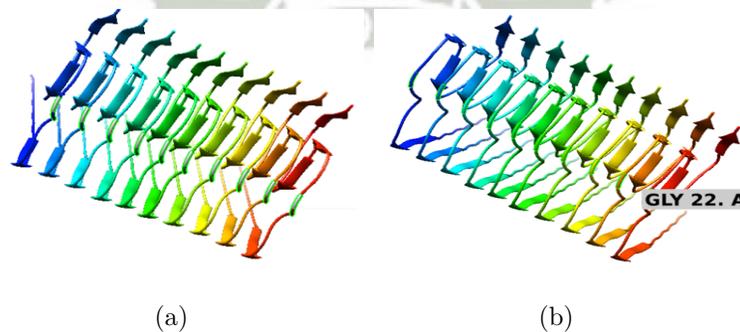


Figura 4.1: Estructuras iniciales de los dodecámeros de β -amiloide. Se presentan el (a) dodecámero normal de β -amiloide, (b) la mutación ártica.

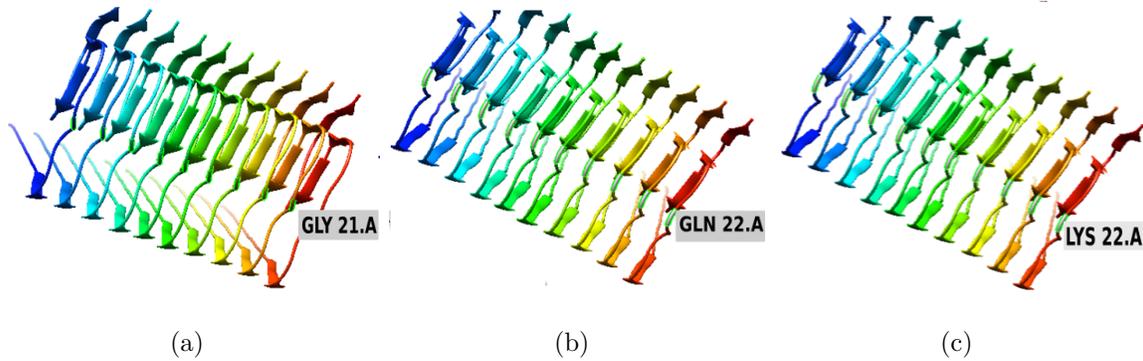


Figura 4.2: Estructuras iniciales de los dodecámeros de β -amiloide. Se presentan la (a) mutación flamenca, (b) la mutación holandesa y (c) la mutación italiana.

Las estructuras iniciales de los ciclótidos pertenecientes a la familia Rubiaceae, en plantas originarias de Perú han sido proveídas por parte del proyecto de investigación FONDECYT-139. Dentro de estas estructuras se encontró que el ciclótido correspondiente a la *caripe 4* (ver figura 4.3) de la planta *Carapichea ipecacuanha* [100] era el más estable.

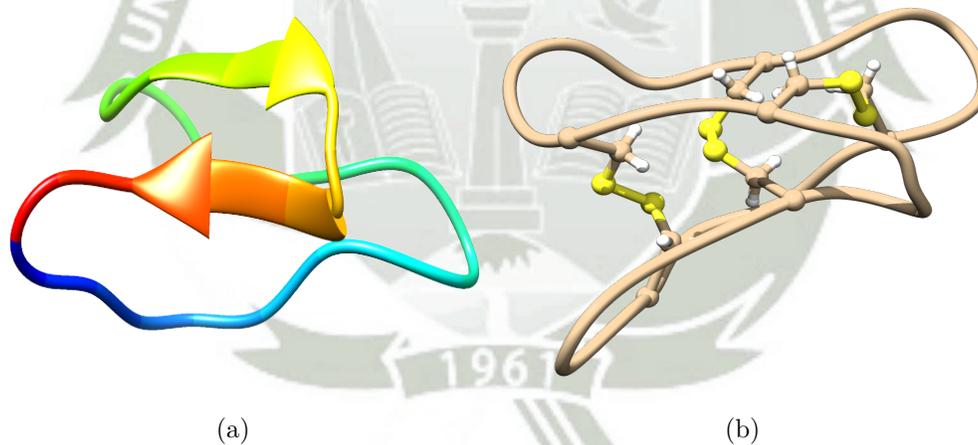


Figura 4.3: Estructura inicial del ciclótido caripe 4 donde se muestra (a) la ciclación y (b) los puentes disulfuro del ciclótido.

Este ciclótido pertenece a la subfamilia brazalete. En su estructura no presenta el aminoácido conservado de glutamato en el bucle 1, sin embargo, contiene el aminoácido conservado de asparagina en el bucle 6 el cual libera con gran facilidad al dominio C-terminal, por lo que se

logra realizar la ciclación [115]. Los resultados obtenidos a partir del RMSD y RMSF (ver figura 4.4) muestran una gran estabilidad que se observa al medir las fluctuaciones, tanto estructurales como por aminoácidos, los cuales no son mayores a los 0.2 nm. La simulación llevada a cabo es validada al observar que el RMSD se conserva constante. El gráfico de Ramachandran general muestra que la estructura final cumple con los parámetros angulares al encontrarse un 4 % de aminoácidos (ile A2) fuera de las regiones permitidas y favorecidas, un 6 % en las regiones permitidas y un 72 % en las regiones favorecidas. Además, el gráfico de Ramachandran específico (ver figura 4.5) nos muestra los aminoácidos presentes en las regiones favorecidas de pre-prolina de color azul oscuro y en las regiones permitidas de prolina de color verde. Con estos resultados es posible demostrar la estabilidad del ciclótido *caripe 4*.

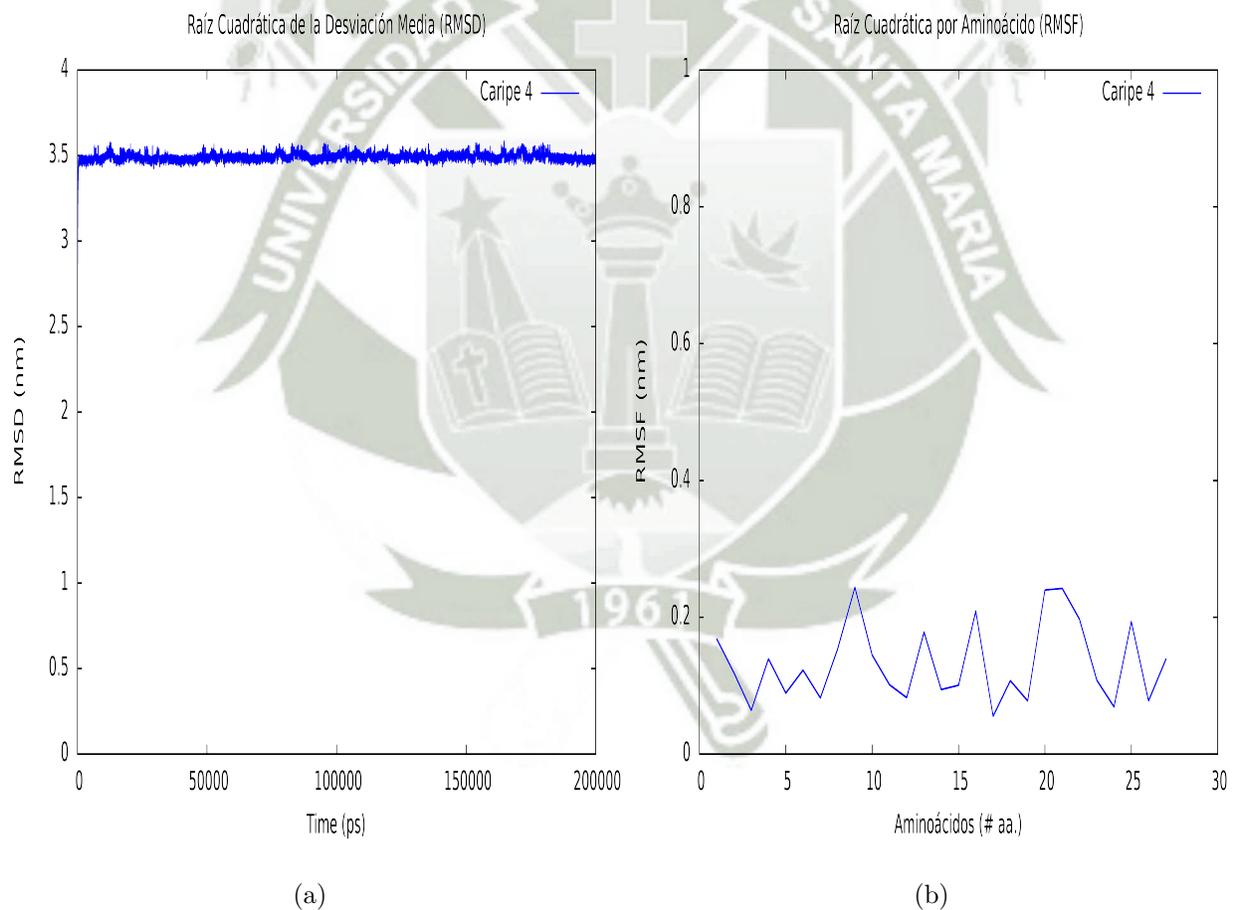


Figura 4.4: Resultados de la estabilización del ciclótido. Se presentan los resultados de la (a) RMSD y (b) RMSF.

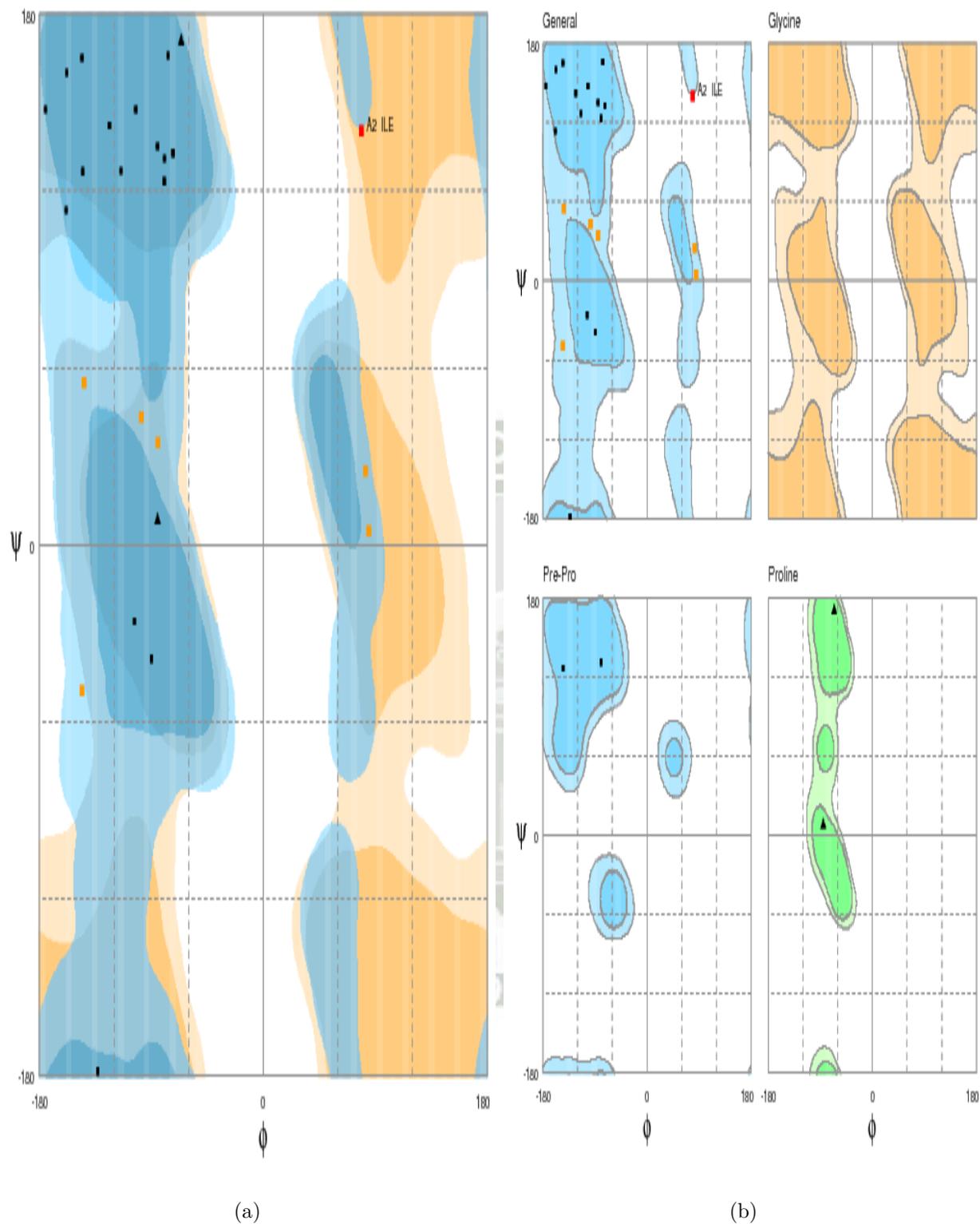


Figura 4.5: Resultados de la estabilización del ciclótido. Se presentan los resultados del (a) gráfico de Ramachandran general y (b) gráfico de Ramachandran específico.

Para la obtención de las estructuras en el equilibrio de los dodecámeros de β -amiloides, se realizaron tres etapas usando dinámica molecular. En la primera etapa al dodecámero de β -amiloide en el vacío (ver figura 4.6 a), se le han añadido moléculas de agua al sistema para que la simulación sea lo más realística posible, teniendo como referencia las condiciones fisiológicas del cuerpo humano. El número de moléculas de agua añadidas dependieron del tamaño de la caja paralelepípeda de cada dodecámero en el vacío (ver figura 4.6 b): al dodecámero de β -amiloide normal, el software GROMACS [158] le agregó 13929 moléculas de agua; al dodecámero ártica le agregó 18157; al dodecámero flamenca le agregó 15642, al dodecámero holandesa le agregó 15162 y al dodecámero italiana le agregó 22743. Posteriormente, se le agregaron moléculas de sodio (Na) en la neutralización (ver figura 4.6 c). Para que el sistema tenga carga cero, el número de moléculas de sodio dependieron de la carga que poseía cada dodecámero: al dodecámero de β -amiloide normal, el software GROMACS [158] le agregó 36 moléculas de sodio (Na); al dodecámero ártica le agregó 24; al dodecámero flamenca le agregó 36; al dodecámero holandesa le agregó 24 y al dodecámero italiana le agregó 12.

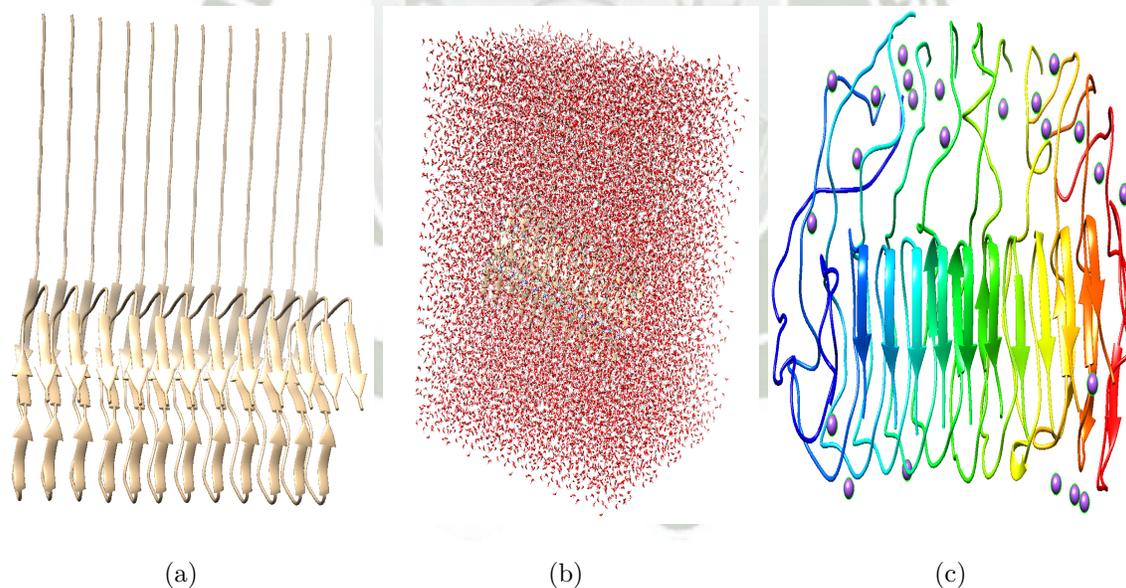


Figura 4.6: Etapas para la obtención de estructuras estables para los dodecámeros de β -amiloides. Se presentan los dodecámeros en (a) vacío, (b) solvatación y (c) neutralización. En el caso del inciso c, se muestran los iones de sodio (Na) agrandadas sólo por motivos de visualización.

Segundo, en la etapa de minimización de las fuerzas, se relaja la estructura, luego se procedió con la etapa de la simulación de dinámica molecular, la cual se realizó utilizando un ensamble canónico, un tiempo de simulación de 100 ns y un termostato de rescalamiento de Verlet que nos permitió mantener la temperatura constante. Las condiciones finales empleadas nos permitieron simular un ambiente cercano a las condiciones fisiológicas del ser humano en el cerebro. Las estructuras obtenidas a partir de la simulación de dinámica molecular (ver figura 4.7), mostraron la conservación de las hojas- β . La región de las colas que forman parte de los 15 primeros aminoácidos presentan un gran movimiento durante el proceso de la dinámica molecular en todos los dodecámeros mutados (ártica, flamenca, holandesa e italiana). Sin embargo, la región de las colas de la β -amiloide normal no se observa un movimiento importante, esto se halla en concordancia con la hipótesis que plantea que el Alzheimer temprano presenta mutaciones y se desarrolla a una edad temprana, a diferencia del Alzheimer tardío que no muestra mutaciones y se presenta a una edad tardía. La agregación de los oligómeros en el β -amiloide (normal) se debe principalmente a una disminución de enzimas que puedan eliminar dichos oligómeros, como lo hace la enzima IDE [77].

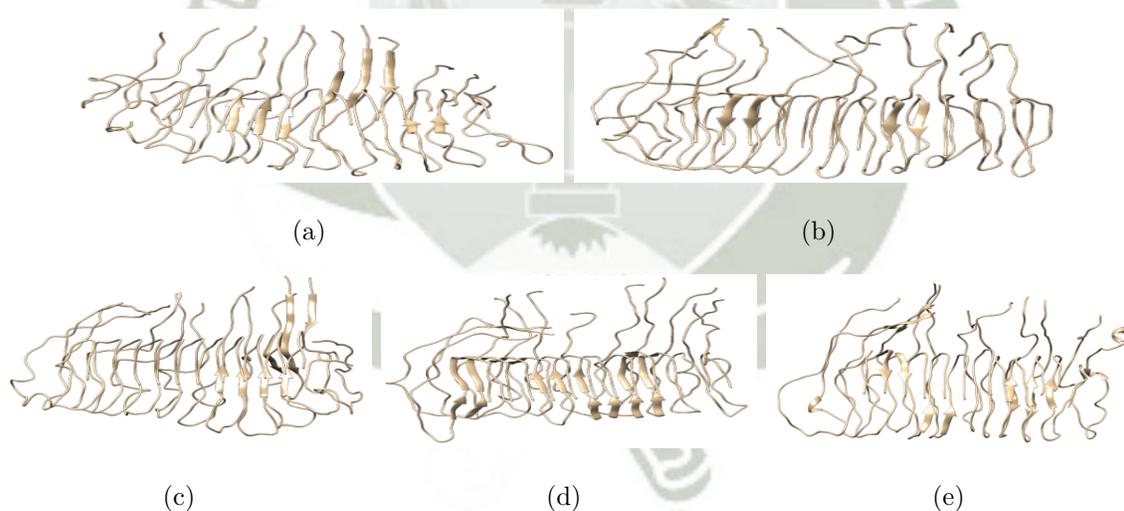


Figura 4.7: Estructuras de los dodecámeros después de la simulación de dinámica molecular. Se muestran el (a) dodecámero normal de β -amiloide, (b) la mutación ártica, (c) la mutación flamenca, (d) la mutación holandesa y (e) la mutación italiana. En todos los casos se obviaron las moléculas de agua y de iones para obtener una mejor visualización de los resultados.

El análisis del RMSD de las simulaciones efectuadas (ver figura 4.8) mostró una fluctuación promedio de 0.2 nm para las mutaciones ártica, flamenca e italiana, a diferencia de las mutaciones holandesa y el β -amiloide normal se observó una fluctuación promedio de 0.5 nm entre los 20 - 60 ns, observando que las posiciones atómicas sufren una fluctuación en esta región de tiempo. No obstante, debido a la gran cantidad de aminoácidos presentes en cada uno de los dodecámeros (504 aminoácidos), la diferencia no es significativa en la fluctuación [155], por lo que podemos hablar de estructuras estables.

Raíz Cuadrática de la Desviación Media (RMSD)

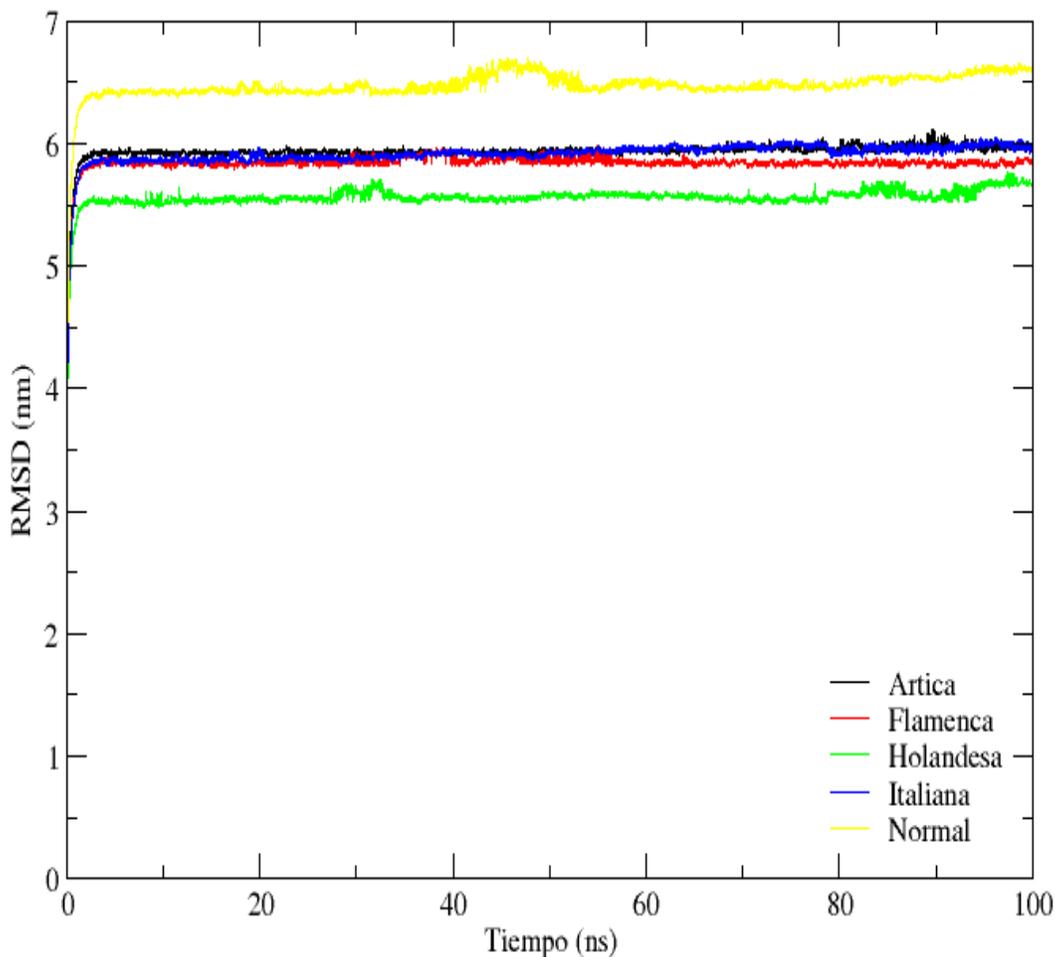


Figura 4.8: RMSD de los dodecámeros de β -amiloides estabilizados.

El análisis del RMSF (figura 4.9) muestra movimientos abruptos en los aminoácidos de alanina y aspartato que se encuentran conformando la región de las colas en el dodecámero normal (aspartato 379 y 421), la mutación ártica (aspartato 169, 295, 379 y alanina 210, 336, 420), la mutación flamenca (aspartato 463), la mutación holandesa (aspartato 127 y alanina 168, 252) y la mutación italiana (alanina 212, 252, 294). La glicina 458 se encuentra en las hojas- β en la parte delantera del dodecámero normal. La mutación flamenca que se encuentra en la línea de color rojo muestra poco movimiento en la región de las colas (ver figura 4.9).

Raíz Cuadrática Media por Aminoácido (RMSF)

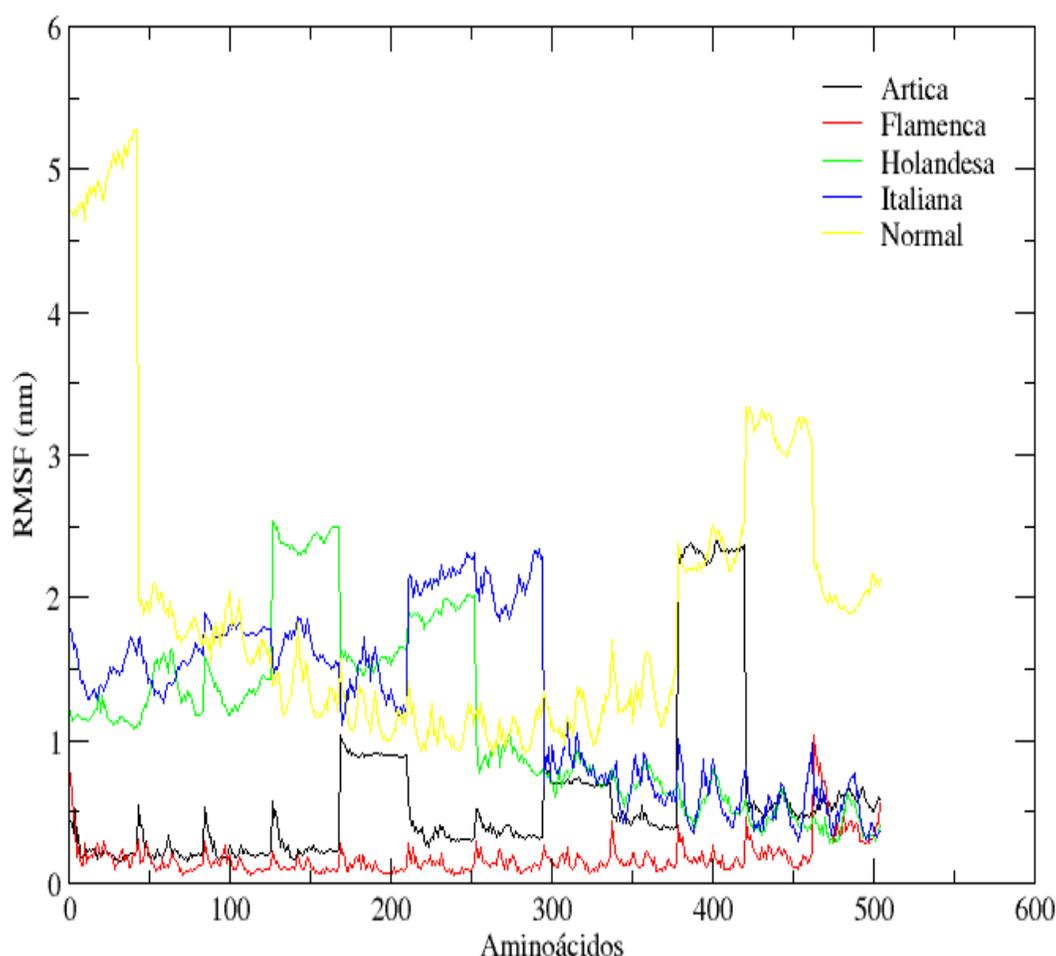


Figura 4.9: RMSF de los dodecámeros de β -amiloides estabilizados.

El gráfico de Ramachandran nos muestra el cambio de posición de los ángulos de las estructuras estables. En la figura 4.10.a podemos apreciar que el dodecámero de β -amiloide normal presenta un 1.7% de aminoácidos fuera de las regiones favorecidas y permitidas, los cuales se pueden apreciar en los cuadrados rojos (glicina, histidina, valina, aspartato, lisina, alanina y fenilalanina); un 16.9% en las regiones permitidas y un 81.4% en las regiones favorecidas, haciendo un total de 98.3%. En la figura 4.10.b se muestra que los aminoácidos se encuentran principalmente en las regiones de glicina favorecida (naranja oscuro) y glicina permitida (naranja claro).

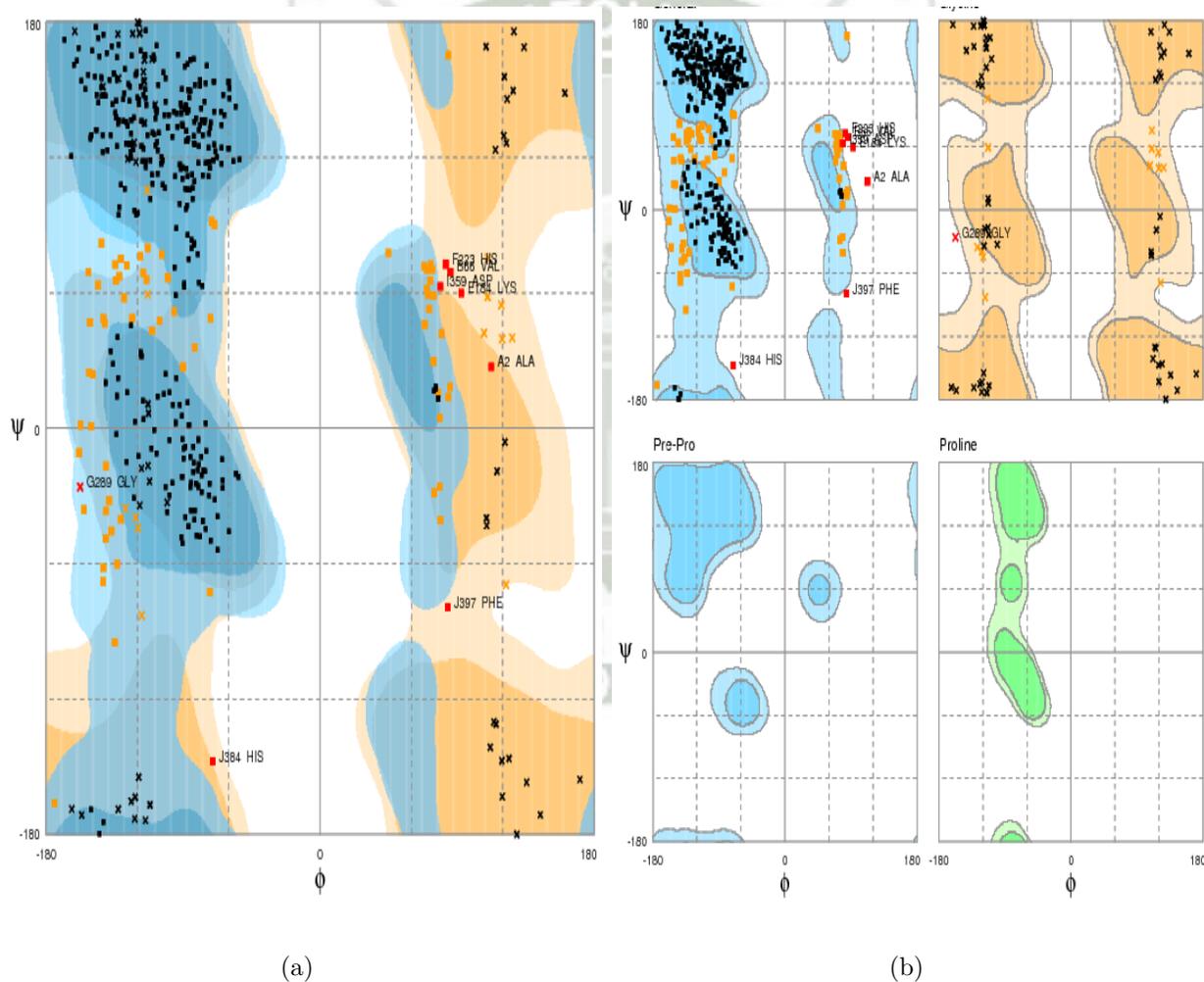


Figura 4.10: Gráfico de Ramachandran del dodecámero de β -amiloide normal. Se muestran el (a) gráfico de Ramachandran general y el (b) gráfico de Ramachandran específico.

La figura 4.11.a nos muestra el dodecámero de la mutación ártica, el cual presenta un 2.8 % de aminoácidos fuera de las regiones favorecidas y permitidas, los cuales se pueden apreciar en los cuadrados rojos (glicina, leucina, isoleucina, aspartato, lisina, glutamina y alanina); un 16.7% en las regiones permitidas y un 80.6 % en las regiones favorecidas, haciendo un total de 97.3 %. En la figura 4.11.b se muestra que los aminoácidos se encuentran principalmente en las regiones de glicina favorecida (naranja oscuro) y glicina permitida (naranja claro).

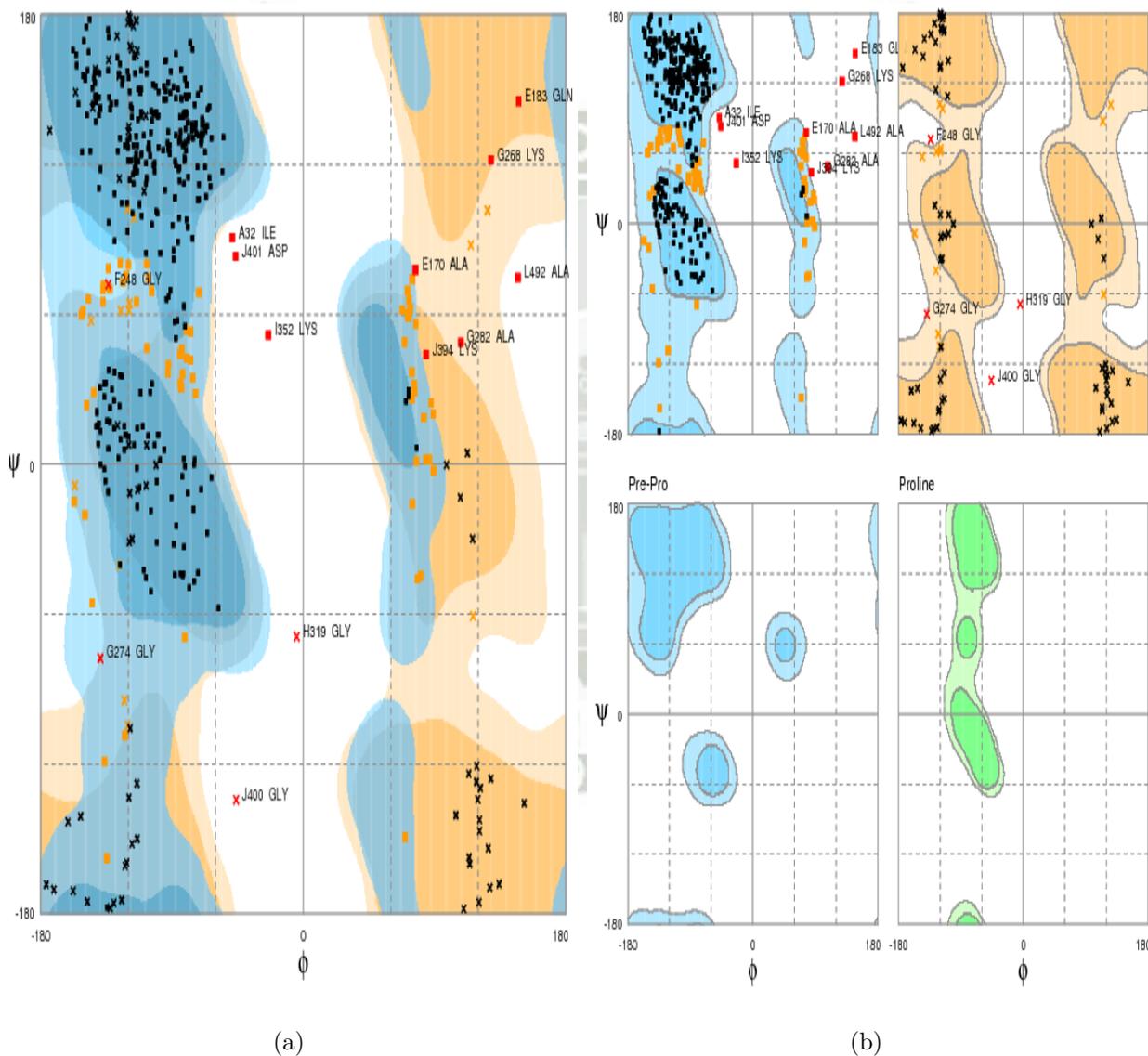


Figura 4.11: Gráfico de Ramachandran del dodecámero de la mutación ártica. Se muestran el (a) gráfico de Ramachandran general y el (b) gráfico de Ramachandran específico.

La figura 4.12.a nos muestra el dodecámero de la mutación flamenca, el cual presenta un 1.3% de aminoácidos fuera de las regiones favorecidas y permitidas, los cuales se pueden apreciar en los cuadrados rojos (glicina, fenilalanina, glutamato, lisina y alanina); un 15.6% en las regiones permitidas y un 83.1% en las regiones favorecidas, haciendo un total de 98.7%. En la figura 4.12.b se muestra que los aminoácidos se encuentran principalmente en las regiones de glicina favorecida (naranja oscuro) y glicina permitida (naranja claro).

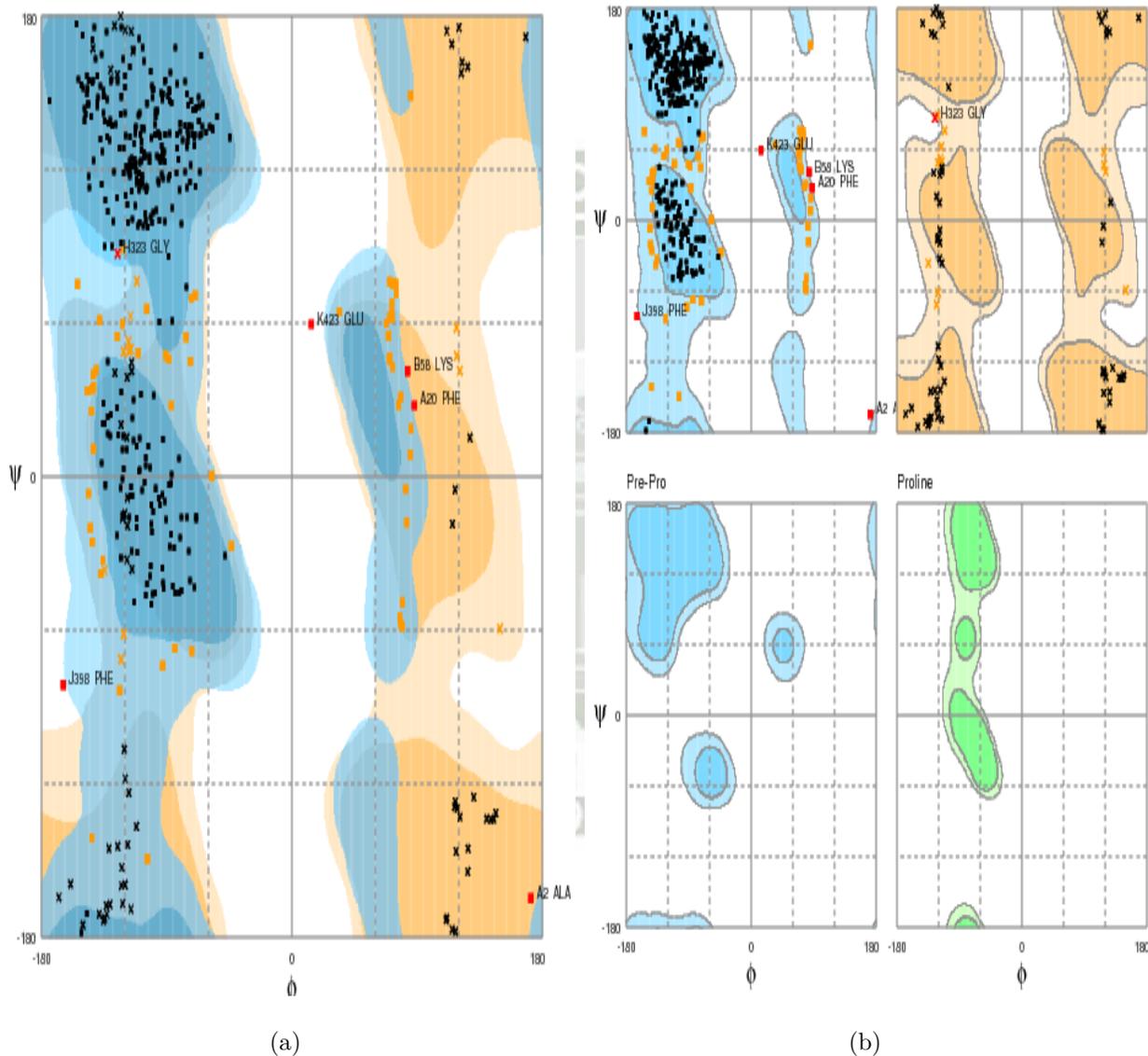


Figura 4.12: Gráfico de Ramachandran del dodecámero de la mutación flamenca. Se muestran el (a) gráfico de Ramachandran general y el (b) gráfico de Ramachandran específico.

La figura 4.13.a nos muestra el dodecámero de la mutación holandesa, el cual presenta un 2.8% de aminoácidos fuera de las regiones favorecidas y permitidas, los cuales se pueden apreciar en los cuadrados rojos (glicina, aspartato, fenilalanina, metionina, histidina y serina); un 15.6% en las regiones permitidas y un 81.6% en las regiones favorecidas, haciendo un total de 97.2%. En la figura 4.13.b se muestra que los aminoácidos se encuentran principalmente en las regiones de glicina favorecida (naranja oscuro) y glicina permitida (naranja claro).

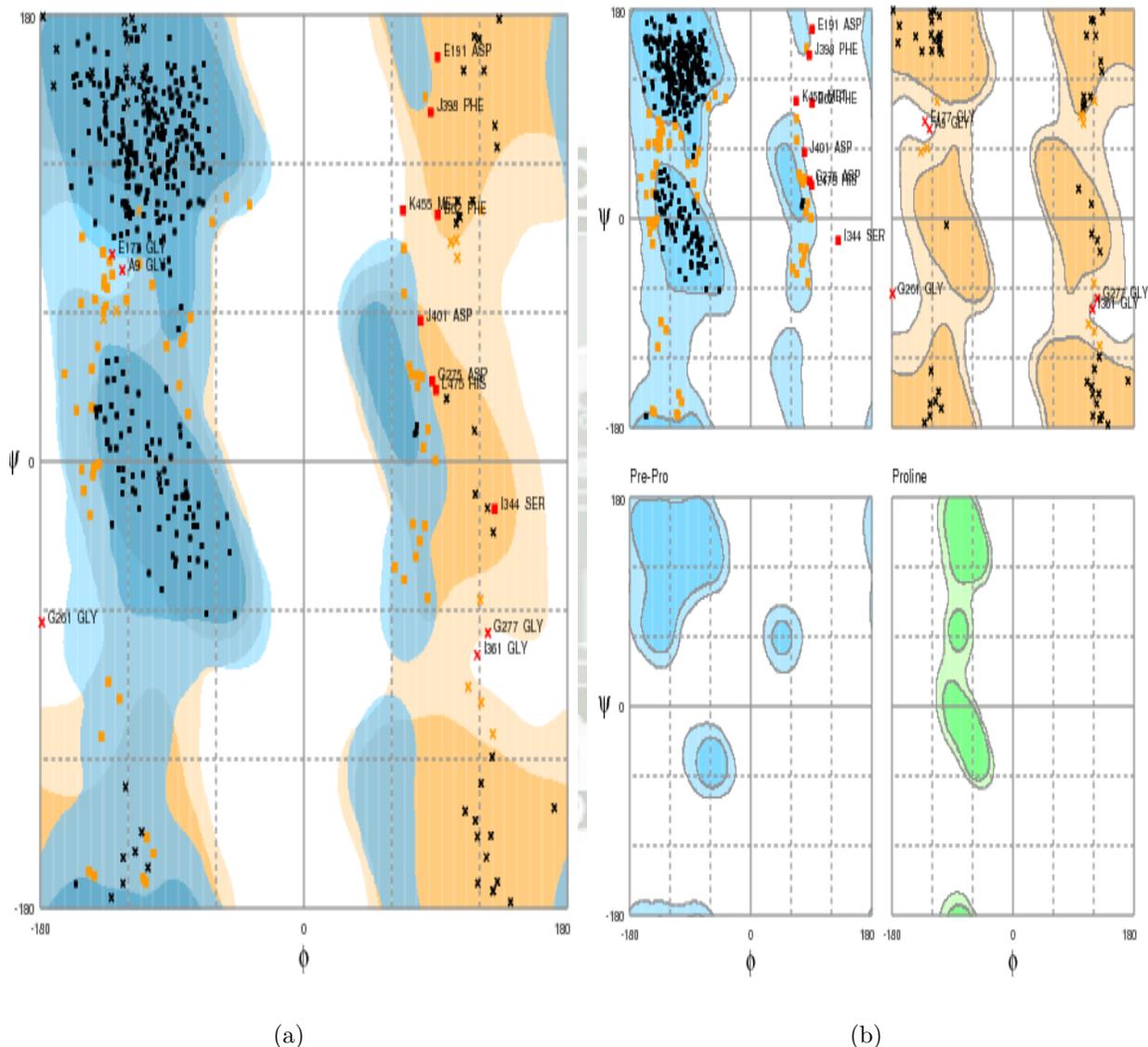


Figura 4.13: Gráfico de Ramachandran del dodecámero de la mutación holandesa. Se muestran el (a) gráfico de Ramachandran general y el (b) gráfico de Ramachandran específico.

La figura 4.14.a nos muestra el dodecámero de la mutación italiana, el cual presenta un 4.5% de aminoácidos fuera de las regiones favorecidas y permitidas, los cuales se pueden apreciar en los cuadrados rojos (glicina, fenilalanina, valina, alanina, metionina, glutamato, lisina, aspartato y serina); un 17.1% en las regiones permitidas y un 78.4% en las regiones favorecidas, haciendo un total de 95.5%. En la figura 4.14.b se muestra que los aminoácidos se encuentran principalmente en las regiones de glicina favorecida (naranja oscuro) y glicina permitida (naranja claro).

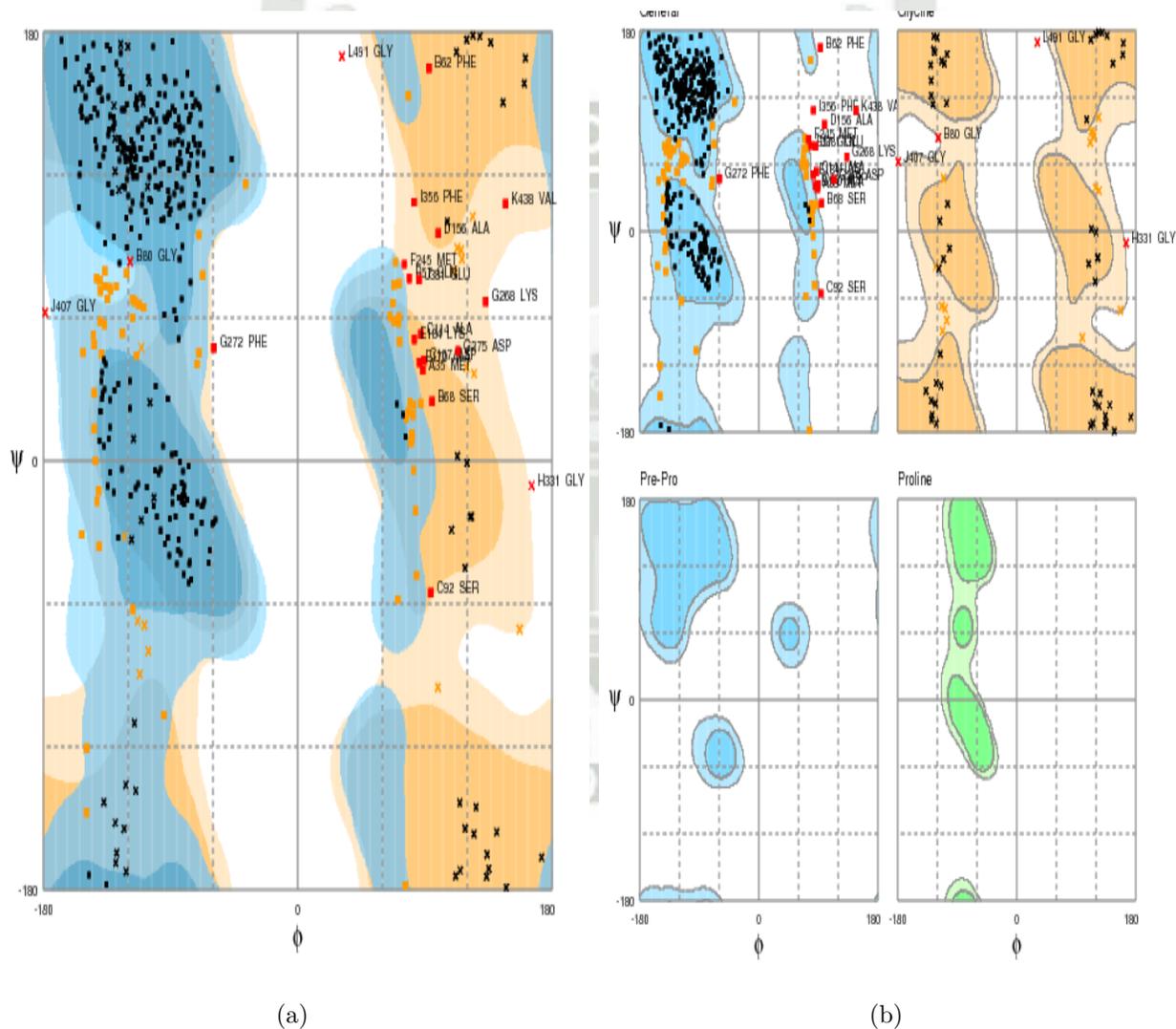


Figura 4.14: Gráfico de Ramachandran del dodecámero de la mutación italiana. Se muestran el (a) gráfico de Ramachandran general y el (b) gráfico de Ramachandran específico.

Cuando analizamos la evolución de las estructuras secundarias durante la simulación molecular, obtenemos gráficos de DSSP, estos nos indican cuán estables son las diferentes estructuras secundarias en nuestra proteína donde apreciamos α -hélices, hojas- β , cuerdas, inclinación de los ángulos, colas, puentes- β , 5- α -hélices y 3- α -hélices. Además, podemos apreciar la evolución de la estructura mediante su codificación de colores, los cuales corresponden a la región de las colas (blanco), a las hojas- β (rojo), a los puentes- β (negro), a la inclinación angular (verde), a los giros (amarillo), a las hélices- α (morado), a la hélice-5 (lila), a la hélice-3 (plomo oscuro), al separador de cadena (plomo claro).

El DSSP del dodecámero normal (ver figura 4.15) nos muestra que presenta hojas- β conservadas en los aminoácidos 30-40, 70-90, 110-120, 160-180, 200-220, 250-270, 290-310, 330-350, 370-380, 400, 420, 430, 460-470. Sin embargo, se observan pérdidas de las hojas- β a lo largo de la simulación, en el lapso de tiempo entre 40 - 53 ns. De color verde se presentan las inclinaciones angulares conservadas a lo largo del tiempo el cual está presente en casi todos los aminoácidos; asimismo, cada 42 aminoácidos se observa una separación de cada cadena. Finalmente se observan los giros de los diedros en los aminoácidos 30, 60, 230, 320, 380 y 440.

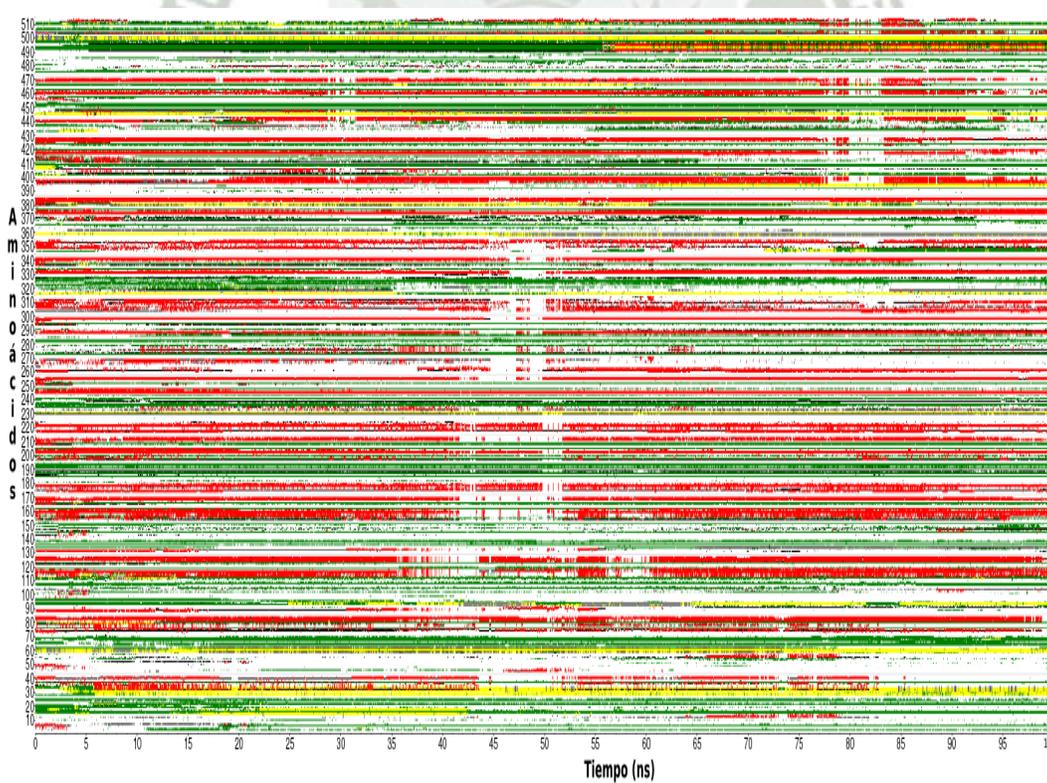


Figura 4.15: Gráfico de DSSP del dodecámero de β -amiloide normal.

El dodecámero perteneciente a la mutación ártica (ver figura 4.16) muestra la presencia de hojas- β conservadas en color rojo en los aminoácidos 40, 80-90, 120-130, 170, 200-210, 250, 300, 340, 380, 420-504. Sin embargo, se observan pequeñas pérdidas de las hojas- β en el lapso de tiempo entre los 80 - 95 ns. De color verde se presentan las inclinaciones angulares conservadas a lo largo del tiempo, presente en casi todos los aminoácidos, asimismo cada 42 aminoácidos se observa una separación de cada cadena. Se observan los giros de los diedros en los aminoácidos 20, 350 y 410, las colas en las regiones coloreadas de blanco y los puentes- β de color negro en los aminoácidos 190, 380, 430 y 500.

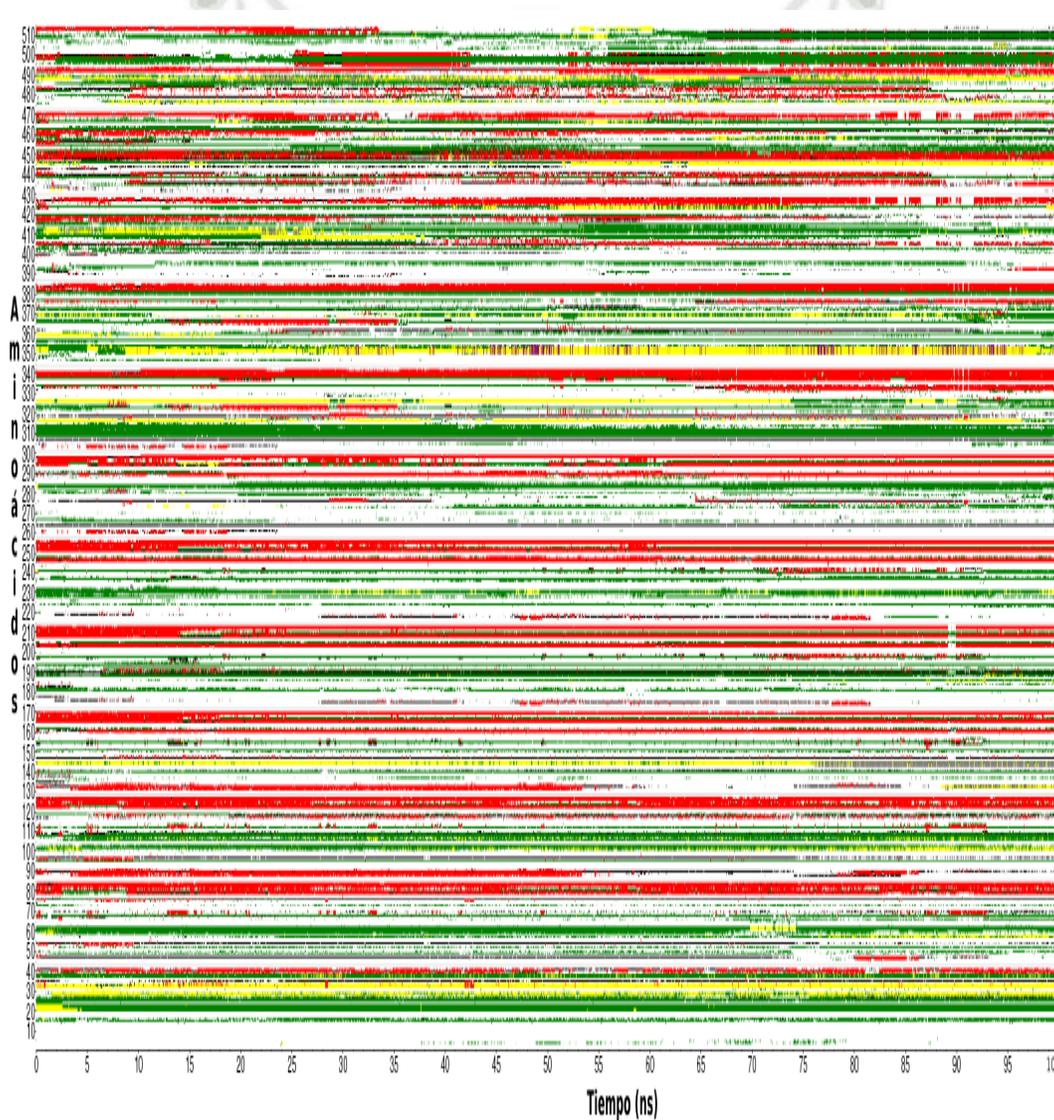


Figura 4.16: Gráfico de DSSP del dodecámero perteneciente a la mutación ártica.

El dodecámero de la mutación flamenca (ver figura 4.17) muestra la presencia de hojas- β conservadas en color rojo en los aminoácidos 40-50, 80-100, 120-130 140, 160-180, 210-220, 250-260, 290-300, 330-340, 350, 380-400, 420-440, 460-470, 490-504. Sin embargo, se observan pequeñas pérdidas de las hojas- β en el lapso de tiempo entre los 30 - 48 ns. De color verde se presentan las inclinaciones angulares conservadas a lo largo del tiempo, presente en casi todos los aminoácidos, asimismo cada 42 aminoácidos se observa una separación de cada cadena. También se observan los giros de los diedros en los aminoácidos 20, 40, 190, 220, 270, 360, 440, 490 y 500, las colas en las regiones coloreadas de blanco y los puentes- β de color negro en los aminoácidos 20, 140, 280, 290, 490, 500.

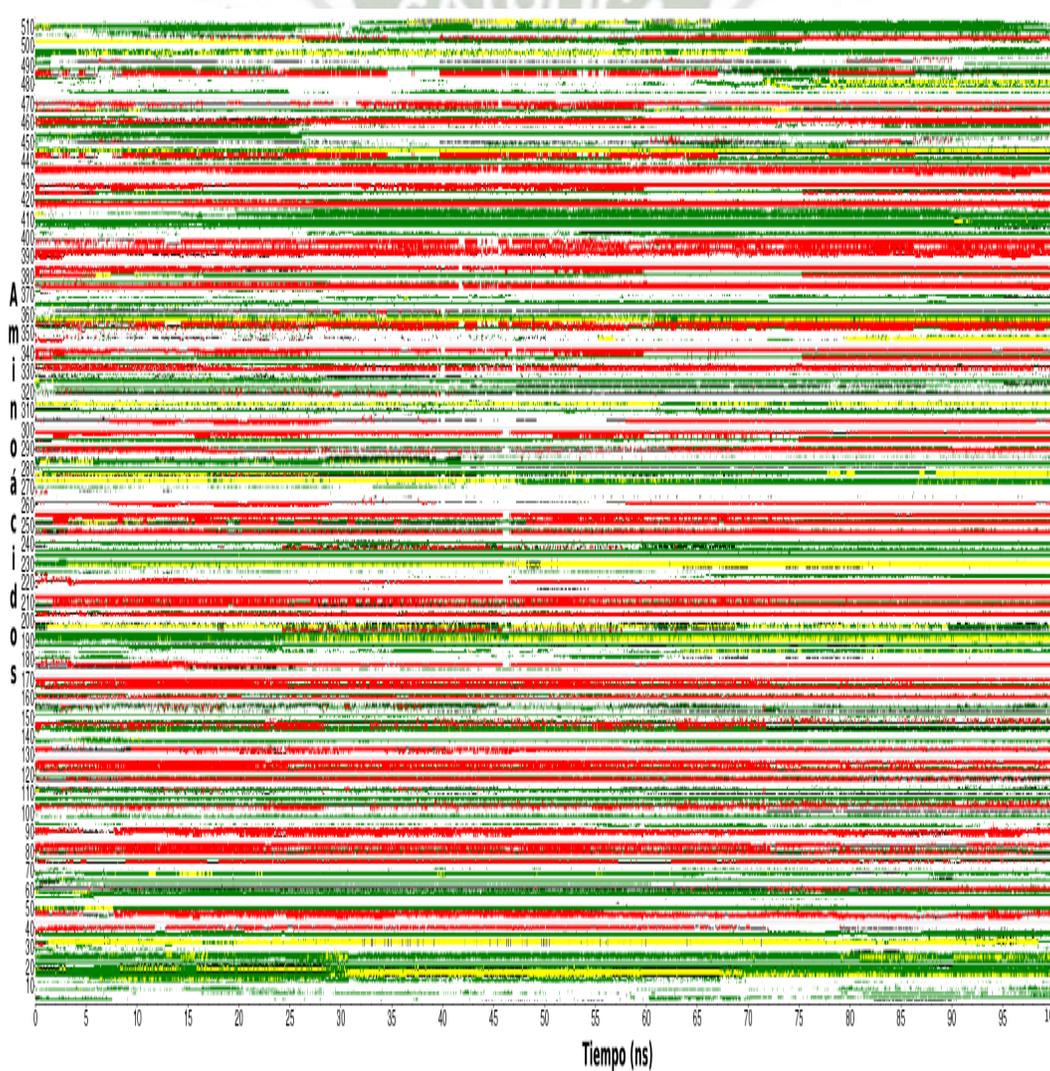


Figura 4.17: Gráfico de DSSP del dodecámero perteneciente a la mutación flamenca.

El dodecámero perteneciente a la mutación holandesa (ver figura 4.18) muestra la presencia de hojas- β conservadas en color rojo en los aminoácidos 30-50, 70-90, 110-130, 160-180, 200-210, 240-250, 290-300, 330-340, 370-380, 410-430, 486-480, 504. Sin embargo, se observan pequeñas pérdidas de las hojas- β en el lapso de tiempo entre los 25 - 35 ns y los 78 - 100 ns. De color verde se presentan las inclinaciones angulares conservadas a lo largo del tiempo, presente en pocos aminoácidos, asimismo cada 42 aminoácidos se observa una separación de cada cadena. También se observan los giros de los diedros en los aminoácidos 60, 190, 230, 290, 360, 400, 440 y 500, las colas en las regiones coloreadas de blanco y los puentes- β de color negro en los aminoácidos 160, 250, 300, 350, 430 y 470.

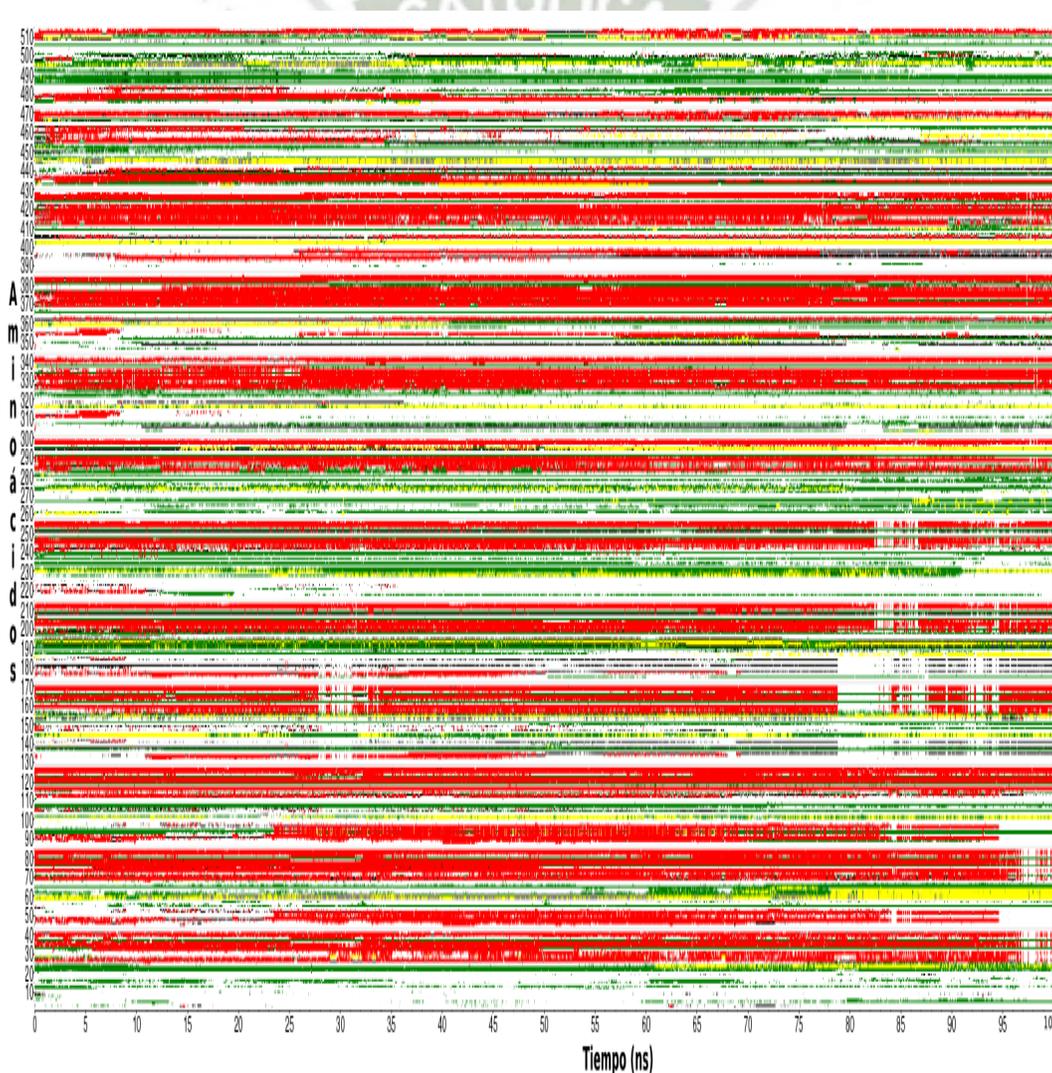


Figura 4.18: Gráfico de DSSP del dodecámero perteneciente a la mutación holandesa.

El dodecámero de la mutación italiana (ver figura 4.19) muestra la presencia de hojas- β conservadas en color rojo en los aminoácidos 40, 70-90, 110-130, 160-180, 200-210, 240-250, 280-300, 320-340, 360-380, 410-430, 460-470. Sin embargo, se observan pequeñas pérdidas de las hojas- β en el lapso de tiempo entre los 60 - 93 ns. De color verde se presentan las inclinaciones angulares conservadas a lo largo del tiempo, presente en pocos aminoácidos, asimismo cada 42 aminoácidos se observa una separación de cada cadena. También se observan los giros de los diedros en los aminoácidos 20, 60, 230, 270, 400 y 450-504, las colas en las regiones coloreadas de blanco y los puentes- β de color negro en los aminoácidos 40, 160, 180, 240, 290, 340 500.

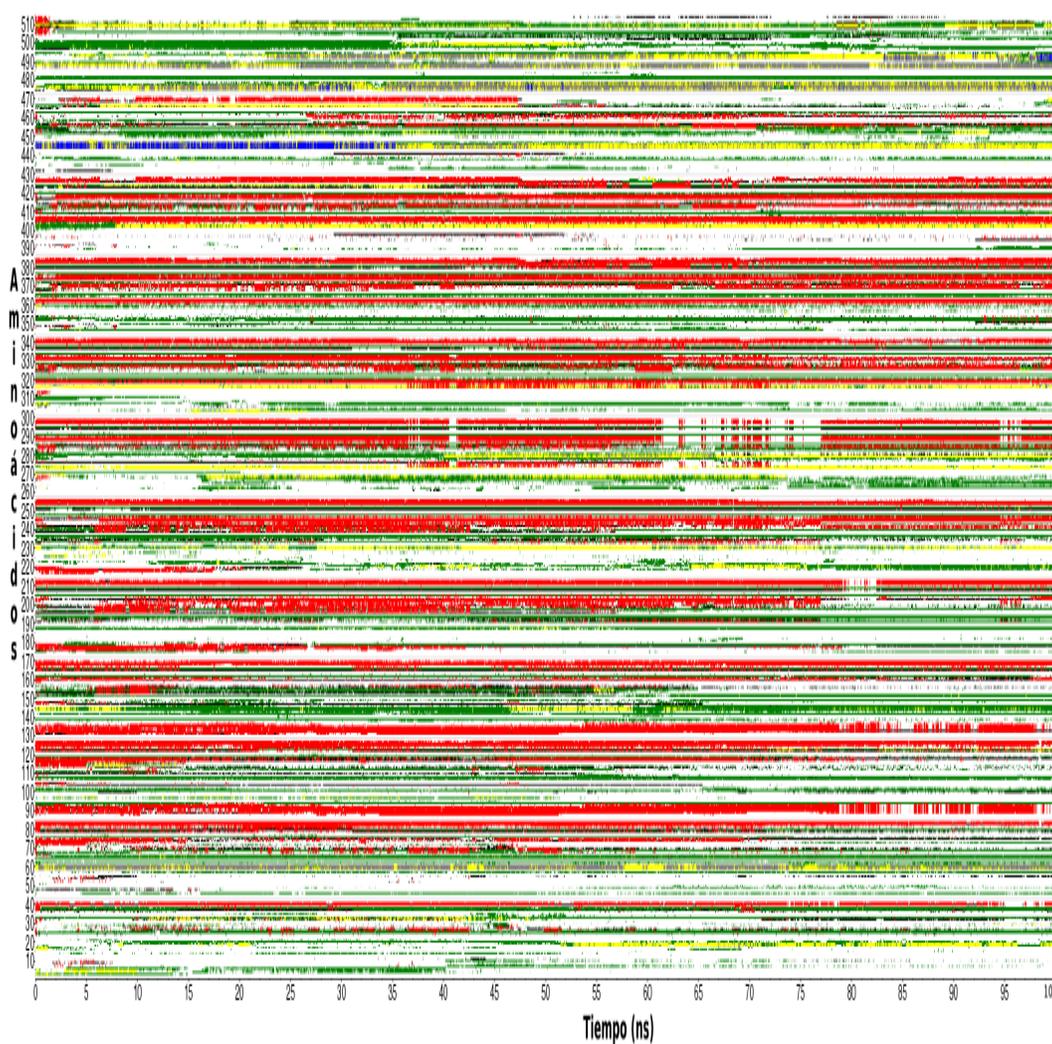


Figura 4.19: Gráfico de DSSP del dodecámero perteneciente a la mutación italiana.

La generación de hipersuperficies de potencial electrostático nos permite visualizar el mapa de potencial electrostático de cada molécula, el cuál nos da información sobre las posibles zonas de interacción que puede presentar el receptor (dodecámero de β -amiloide) con el ligando (ciclótido). Dependiendo de las características del receptor, se pueden presentar zonas coloreadas de rojo intenso que muestran zonas con carga negativa y por ende, un ligando ávido de electrones tendría una mayor afinidad por esas zonas electrofílicas. Por el contrario, si el receptor muestra zonas coloreadas de azul intenso que muestran zonas con carga positiva o deficientes de electrones, permitirían que un ligando con exceso electrónico tenga una mayor afinidad por estas zonas. El dodecámero de β -amiloide normal muestra varias zonas coloreadas de rojo (ver figura 4.20a), donde se puede apreciar que existe la posibilidad de un ataque electrofílico de una especie ávida de cargas negativas (ciclótido *caripe 4*). Por otro lado, el ciclótido muestra zonas coloreadas de azul (ver figura 4.20b), donde se observa la posibilidad de un ataque nucleofílico de una especie ávida de cargas positivas (β -amiloide normal).

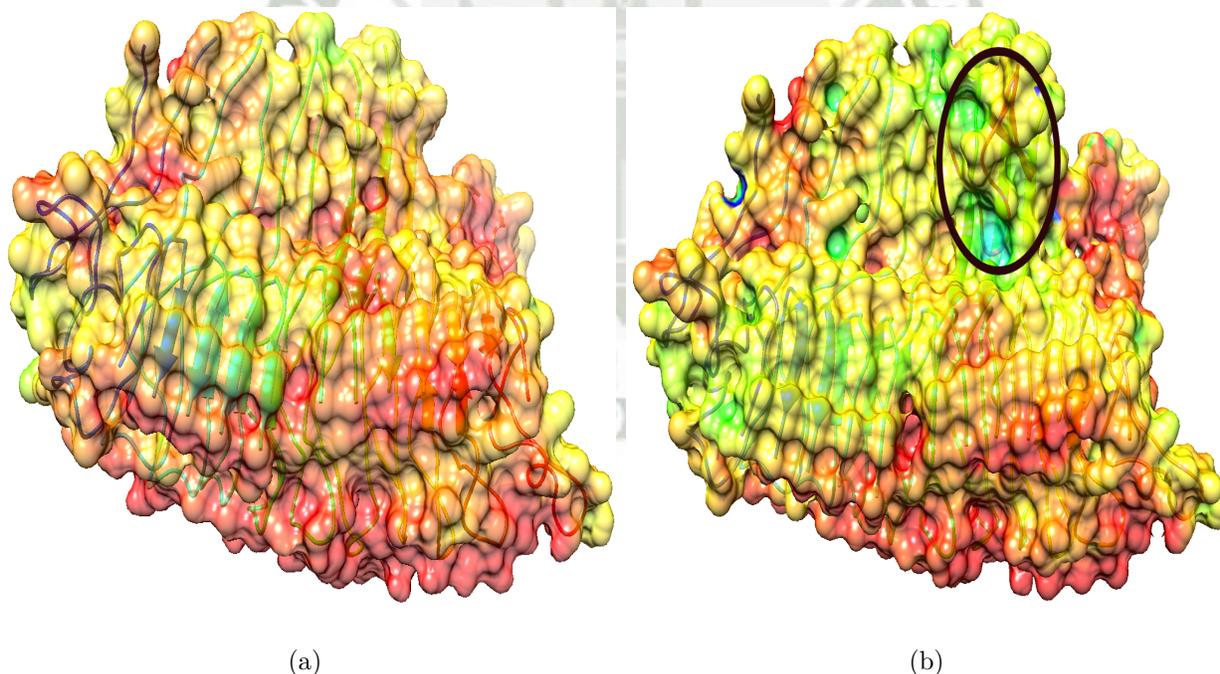


Figura 4.20: Mapas de potencial electrostático. Se muestran los (a) sitios activos del dodecámero de β -amiloide normal de color rojo, (b) se visualiza la afinidad del ciclótido *caripe 4* por las zonas ávidas de cargas positivas en el dodecámero de β -amiloide normal.

La mutación ártica presenta varias zonas coloreadas de rojo (ver figura 4.21a), donde se puede apreciar que existe la posibilidad de un ataque electrofílico de una especie ávida de cargas negativas (ciclótido *caripe 4*). Por otro lado, el ciclótido muestra zonas coloreadas de azul (ver figura 4.21b), donde se observa la posibilidad de un ataque nucleofílico de una especie ávida de cargas positivas (mutación ártica).

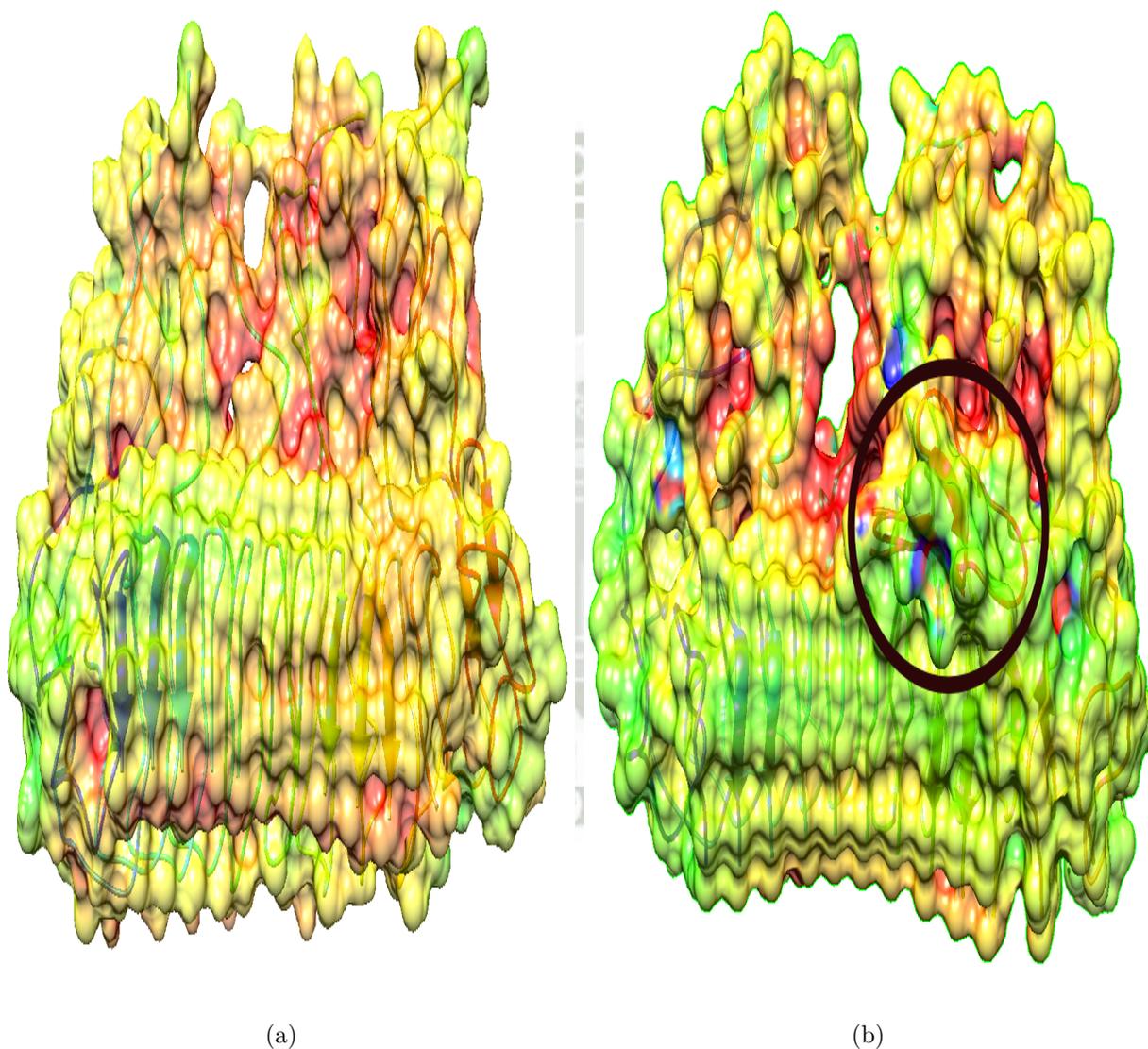


Figura 4.21: Mapas de potencial electrostático. Se muestran los (a) sitios activos de la mutación ártica coloreados de color rojo, (b) se visualiza la afinidad del ciclótido *caripe 4* por las zonas ávidas de cargas positivas en la mutación ártica.

La mutación flamenca muestra varias zonas coloreadas de rojo (ver figura 4.22a), donde se puede apreciar que existe la posibilidad de un ataque electrofílico de una especie ávida de cargas negativas (ciclótido *caripe 4*). Por otro lado, el ciclótido muestra zonas coloreadas de azul (ver figura 4.22b), donde se observa la posibilidad de un ataque nucleofílico de una especie ávida de cargas positivas (mutación flamenca).

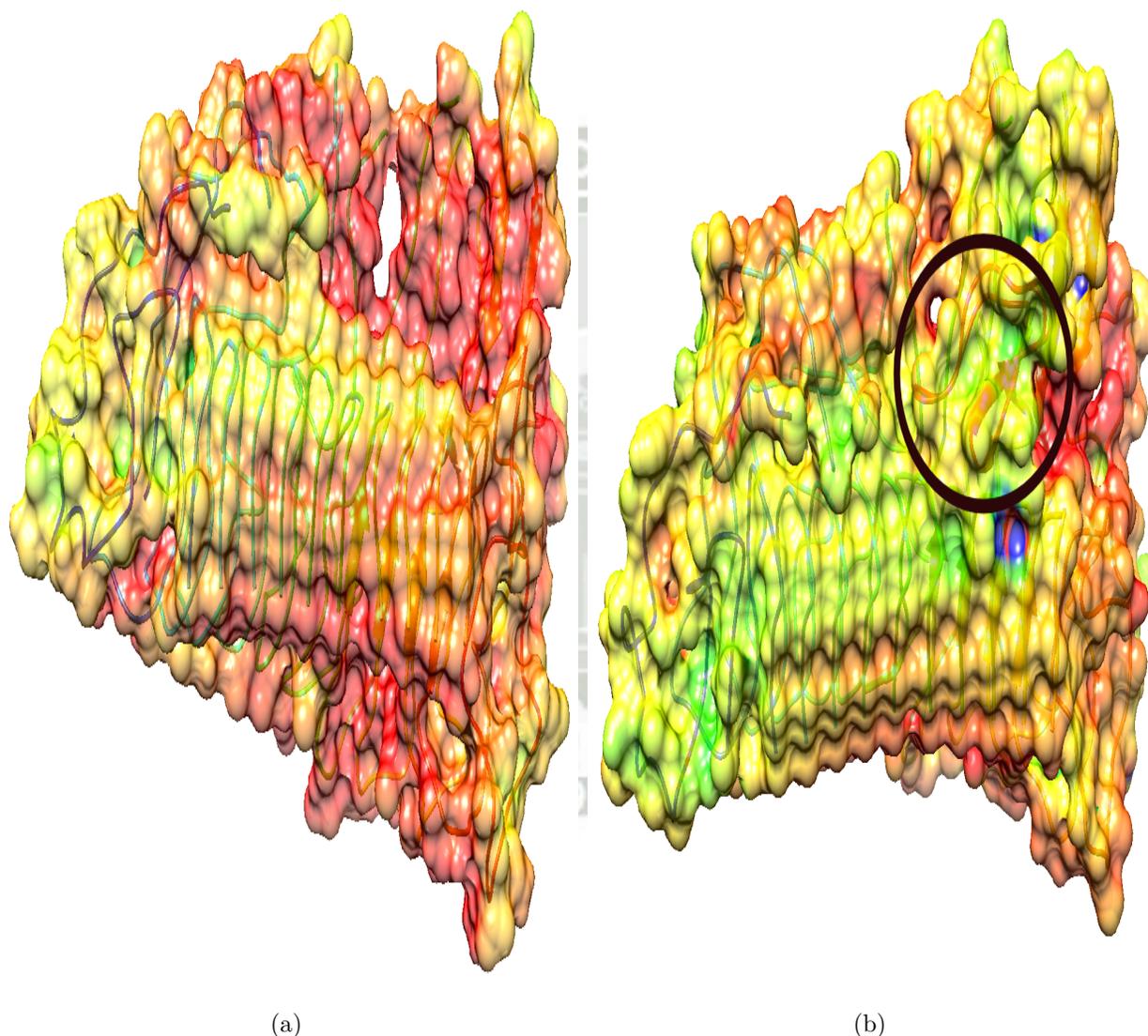


Figura 4.22: Mapas de potencial electrostático. Se muestran los (a) sitios activos de la mutación flamenca coloreados de color rojo, (b) se visualiza la afinidad del ciclótido *caripe 4* por las zonas ávidas de cargas positivas en la mutación flamenca.

La mutación holandesa muestra varias zonas coloreadas de rojo (ver figura 4.23a), donde se puede apreciar que existe la posibilidad de un ataque electrofílico de una especie ávida de cargas negativas (ciclótido *caripe 4*). Por otro lado, el ciclótido muestra zonas coloreadas de azul (ver figura 4.23b), donde se observa la posibilidad de un ataque nucleofílico de una especie ávida de cargas positivas (mutación holandesa).

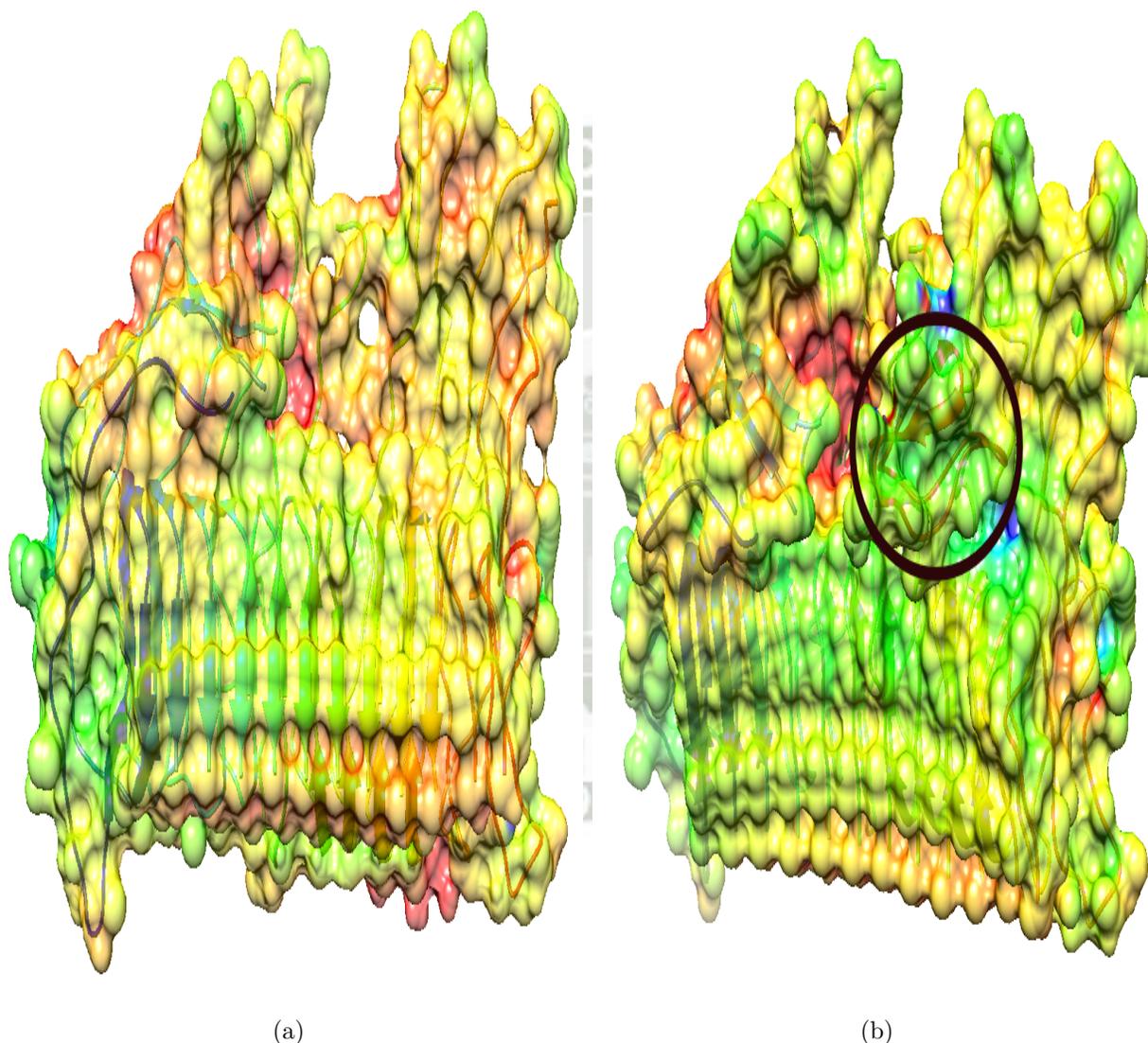


Figura 4.23: Mapas de potencial electrostático. Se muestran los (a) sitios activos de la mutación holandesa coloreados de color rojo, (b) se visualiza la afinidad del ciclótido *caripe 4* por las zonas ávidas de cargas positivas en la mutación holandesa.

La mutación italiana muestra varias zonas coloreadas de rojo (ver figura 4.24a), donde se puede apreciar que existe la posibilidad de un ataque electrofílico de una especie ávida de cargas negativas (ciclótido *caripe 4*). Por otro lado, el ciclótido muestra zonas coloreadas de azul (ver figura 4.24b), donde se observa la posibilidad de un ataque nucleofílico de una especie ávida de cargas positivas (mutación italiana).

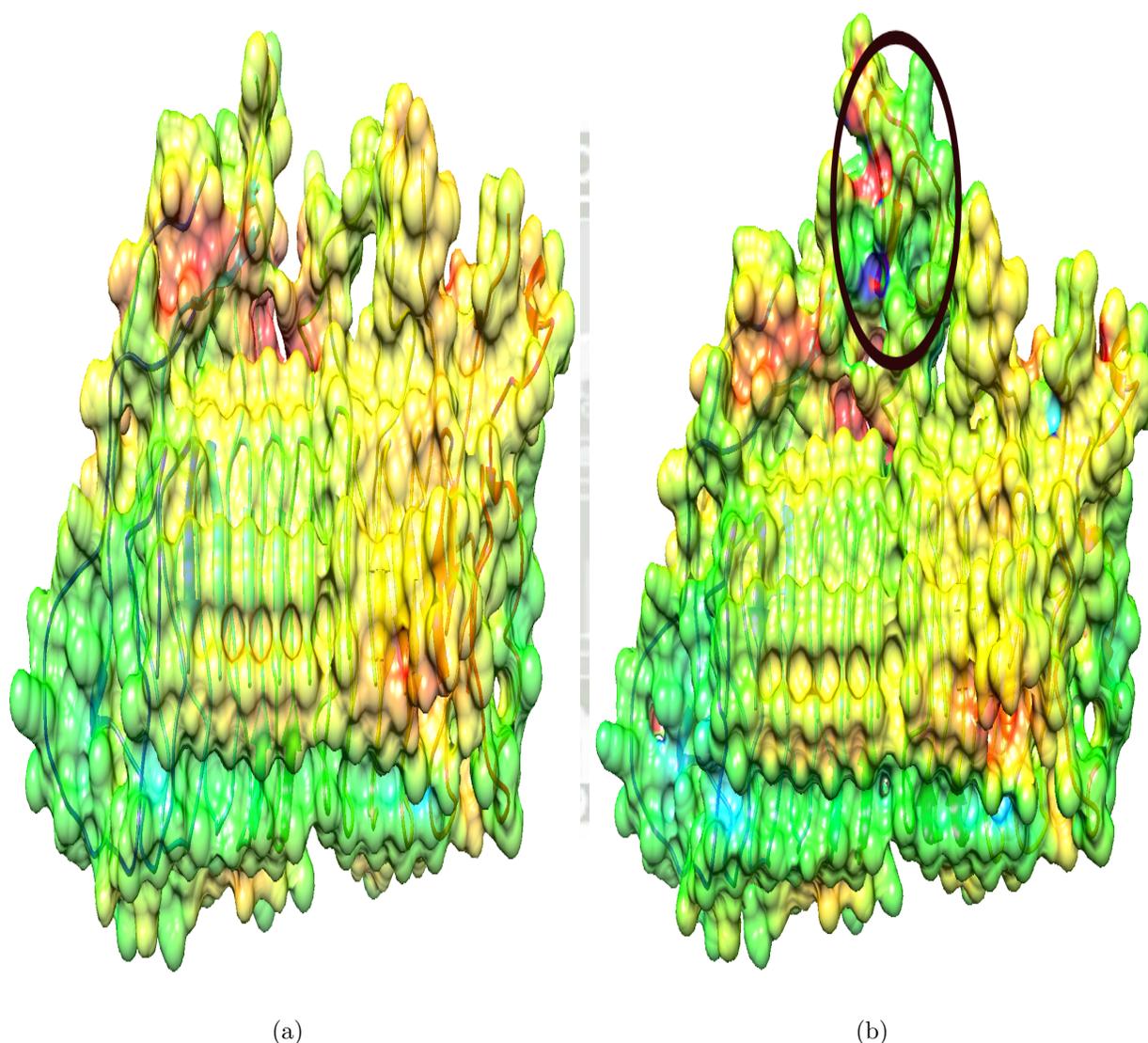


Figura 4.24: Mapas de potencial electrostático. Se muestran los (a) sitios activos de la mutación italiana coloreados de color rojo, (b) se visualiza la afinidad del ciclótido *caripe 4* por las zonas ávidas de cargas positivas en la mutación italiana.

Para realizar el acoplamiento molecular del ciclótido *caripe 4* perteneciente a la familia Rubiaceae de la planta *Carapichea ipecacuanha* [100] (que también se encuentra en el Perú), con el dodecámero de β -amiloide normal y los dodecámeros de β -amiloides mutados, se empleó el servidor PATCH DOCK [162]. Este servidor nos proporcionó las estructuras acopladas que tuvieran la menor energía de unión (ΔG), la cual es representada mediante la energía de contacto atómico (**ACE**), dicha energía nos permite dilucidar que el ciclótido *caripe 4* tiene una buena afinidad frente al dodecámero de la mutación ártica, al dodecámero la mutación flamenca y al dodecámero del β -amiloide normal (ver Tabla 4.1). Además, # es el número de solución obtenido a partir del refinamiento con el servidor FIREDOCK, dicho resultado nos permite obtener las estructuras acopladas con la mínima energía de unión de acuerdo a los scores (puntuajes) y **Glob** es la energía global de la solución, la cual nos permite corroborar que existe una mayor afinidad del ciclótido frente a los dodecámeros de β -amiloides previamente mencionados.

Tabla 4.1: Resultados del acoplamiento molecular de los dodecámeros con el ciclótido *caripe 4*.

-	Artica	Flamenca	Holandesa	Italiana	Normal
#	391	41	182	658	483
Glob (Kcal/mol)	-101.77	-82.70	-80.86	-102.54	-94.39
Glob (KJ/mol)	-425.80	-346.02	-338.32	-429.03	-394.93
ACE (Kcal/mol)	-18.73	-15.49	-9.24	-12.33	-14.65
ACE (KJ/mol)	-78.37	-64.81	-38.66	-51.59	-61.3

Las estructuras acopladas (ver figura 4.25) mostraron tener concordancia con los sitios activos en los mapas de potencial electrostático, dándonos indicios que el ciclótido tiene afinidad por las zonas ávidas de cargas positivas en los dodecámeros de β -amiloide. Esto genera un aporte valioso, el cuál puede ser aprovechado en la ingeniería, desarrollo y diseño de los fármacos.

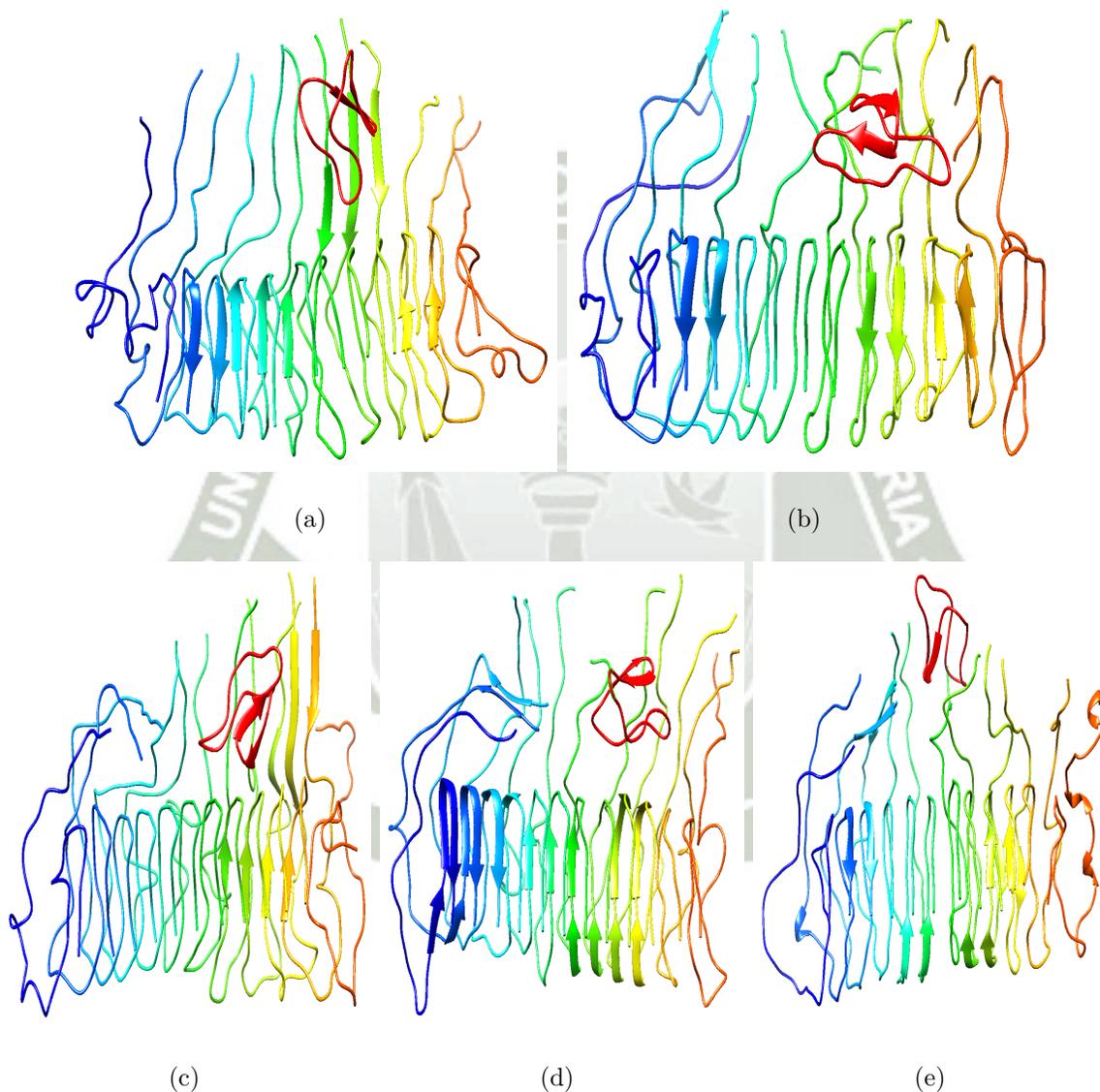


Figura 4.25: Estructuras acopladas de los oligómeros de β -amiloide con el ciclótido *Caripe 4*. Se muestran el (a) el β -amiloide normal, (b) la mutación ártica, (c) la mutación flamenca, (d) la mutación holandesa y (e) la mutación italiana.

La obtención de las estructuras acopladas en el equilibrio se realizaron en tres etapas usando dinámica molecular. En la primera etapa (ver figura 4.26 a), se le han añadido moléculas de agua al sistema, para que la simulación sea lo más realista posible, teniendo como referencia las condiciones fisiológicas del cuerpo humano. El número de moléculas de agua añadidas dependieron del tamaño de la caja paralelepípeda de cada dodecámero en el vacío (ver figura 4.26 b): al dodecámero de β -amiloide normal acoplado, el software GROMACS [158] le agregó 19076 moléculas de agua; al acoplamiento del dodecámero ártica le agregó 15127; al dodecámero flamenca le agregó 14550; al dodecámero holandesa le agregó 17108 y al dodecámero italiana le agregó 20340. Posteriormente, se agregaron moléculas de sodio en la neutralización (ver figura 4.26 c). Para que el sistema tenga carga cero, el número de moléculas de sodio (Na) dependieron de la carga que poseía cada dodecámero acoplado: al dodecámero de β -amiloide normal acoplado, el software GROMACS [158] le agregó 36 moléculas de sodio (Na), al dodecámero ártica acoplado le agregó 24 moléculas de sodio (Na), al dodecámero flamenca acoplado le agregó 36 moléculas de sodio (Na), al dodecámero holandesa acoplado le agregó 24 moléculas de sodio (Na) y al dodecámero italiana acoplado le agregó 12 moléculas de sodio (Na).

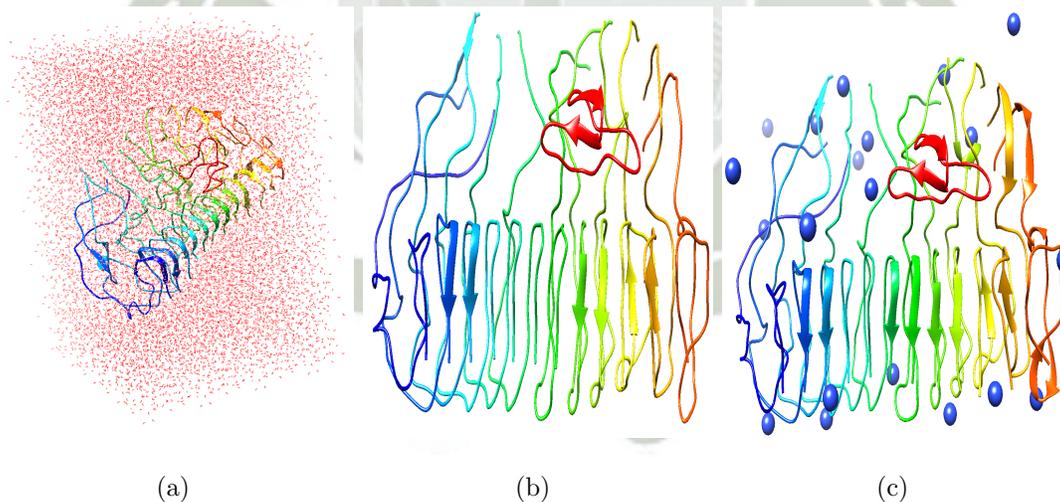


Figura 4.26: Etapas para la obtención de estructuras acopladas estables para los dodecámeros de β -amiloides con el ciclótido *caripe 4*. Se presentan las estructuras de los acoplamientos moleculares en (a) solvatación, (b) vacío y (c) neutralización. En el caso del inciso c, se muestran los iones de sodio (Na) agrandadas sólo por motivos de visualización.

Segundo, en la etapa de minimización de las fuerzas, se relajan las estructuras acopladas. Finalmente se procedió con la etapa de la simulación de dinámica molecular, la cual se realizó utilizando un ensamble canónico, un tiempo de simulación de 50 ns y un termostato de rescalamiento de Verlet que nos permitió mantener la temperatura constante. Las condiciones finales empleadas nos permitieron simular un ambiente cercano a las condiciones fisiológicas del ser humano en el cerebro. Las estructuras obtenidas a partir de la simulación de dinámica molecular (ver figura 4.27), mostraron la conservación de algunas hojas- β . En la región de las colas, conformadas por los 15 primeros aminoácidos, se observa que el ciclótido *caripe 4* no desestabiliza a los dodecámeros de β -amiloide, al acoplarse en la mitad de estos. Por el contrario, el dodecámero flamenca (ver figura 4.27.c) se rompe en dos pedazos al acoplarse al ciclótido *caripe 4*, luego de finalizar la simulación. Los posteriores análisis estructurales nos aseveran que el ciclótido desestabiliza esta estructura.

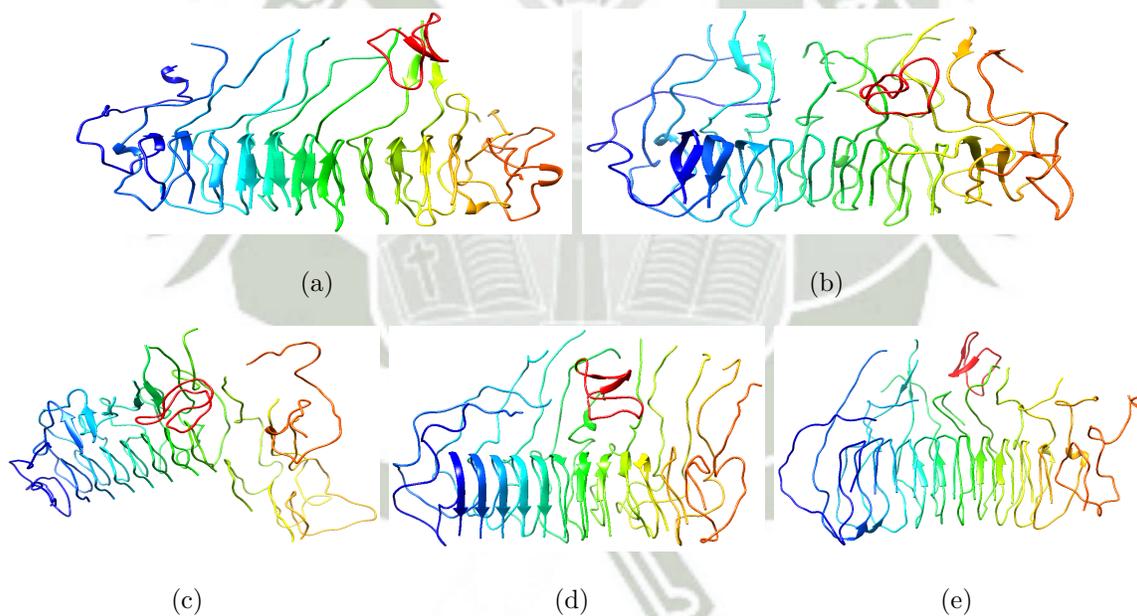


Figura 4.27: Estructuras de los dodecámeros acoplados con el ciclótido *caripe 4* después de la simulación de dinámica molecular. Se muestran el (a) dodecámero normal acoplado (b) la mutación ártica acoplada, (c) la mutación flamenca acoplada, (d) la mutación holandesa acoplada y (e) la mutación italiana acoplada. En todos los casos, en las figuras se obviaron las moléculas de agua y de iones para obtener una mejor visualización de los resultados.

El análisis del RMSD de las simulaciones efectuadas (ver figura 4.28) mostró una fluctuación promedio de 0.2 nm para los acoplamientos del dodecámero normal, las mutaciones ártica e italiana con el ciclótido *caripe 4*. La mutación holandesa presentó una fluctuación promedio de 0.2 nm a lo largo del tiempo de simulación, no obstante, a los 19 ns, se observa una fluctuación promedio de 0.5 nm, la cual no es significativa, debido a la gran cantidad de aminoácidos (531) que presenta la estructura acoplada [155], por lo que podemos decir que la estructura acoplada es estable.

Raíz Cuadrática de la Desviación Media

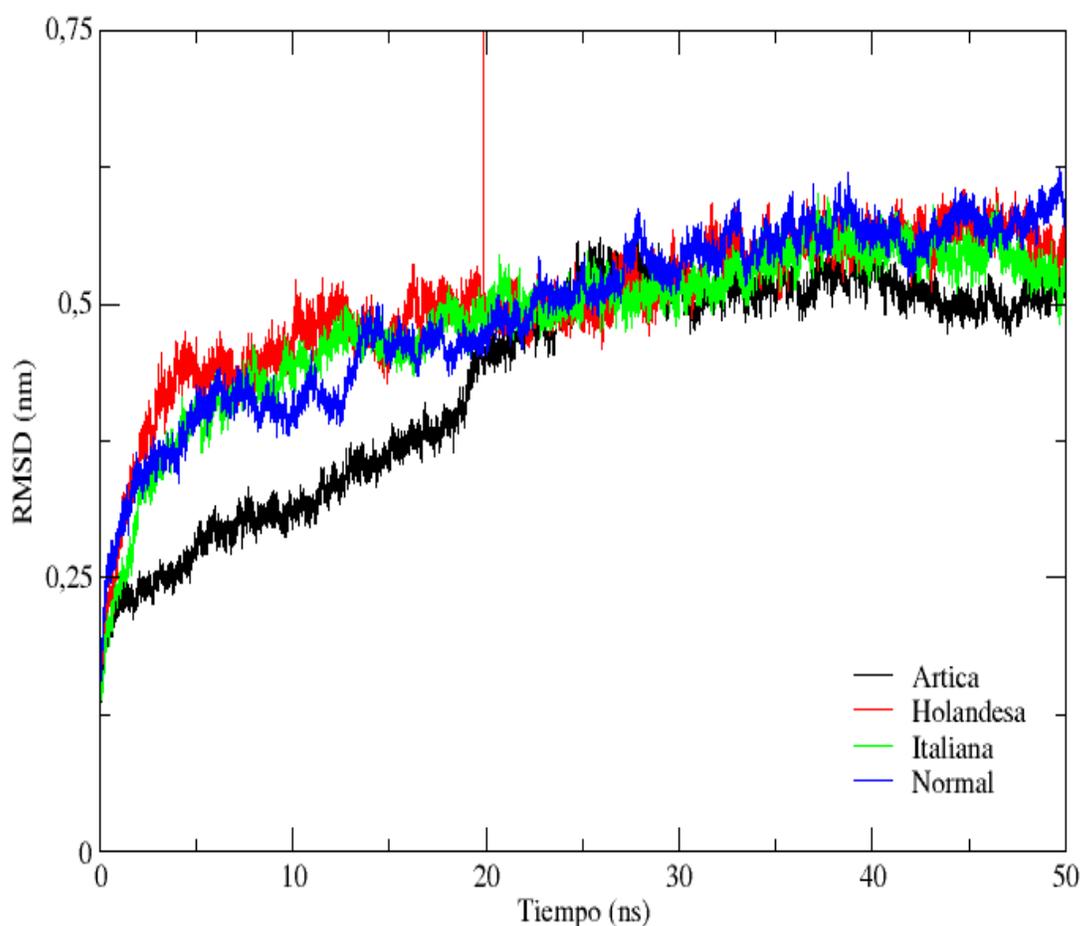


Figura 4.28: RMSD del acoplamiento molecular de dodecámeros de β -amiloides con el ciclótido.

El análisis del RMSF (figura 4.29) muestra movimientos en los aminoácidos que se encuentran conformando la región frontal de las hojas- β en los acoplamiento molecular del dodecámero normal (alanina 420 y 504) y de la mutación ártica (alanina 504). Este movimiento puede deberse a la apolaridad de dichos aminoácidos y al ataque nucleofílico del ciclótido *caripe* 4.

Raíz Cuadrática Media por Aminoácido (RMSF)

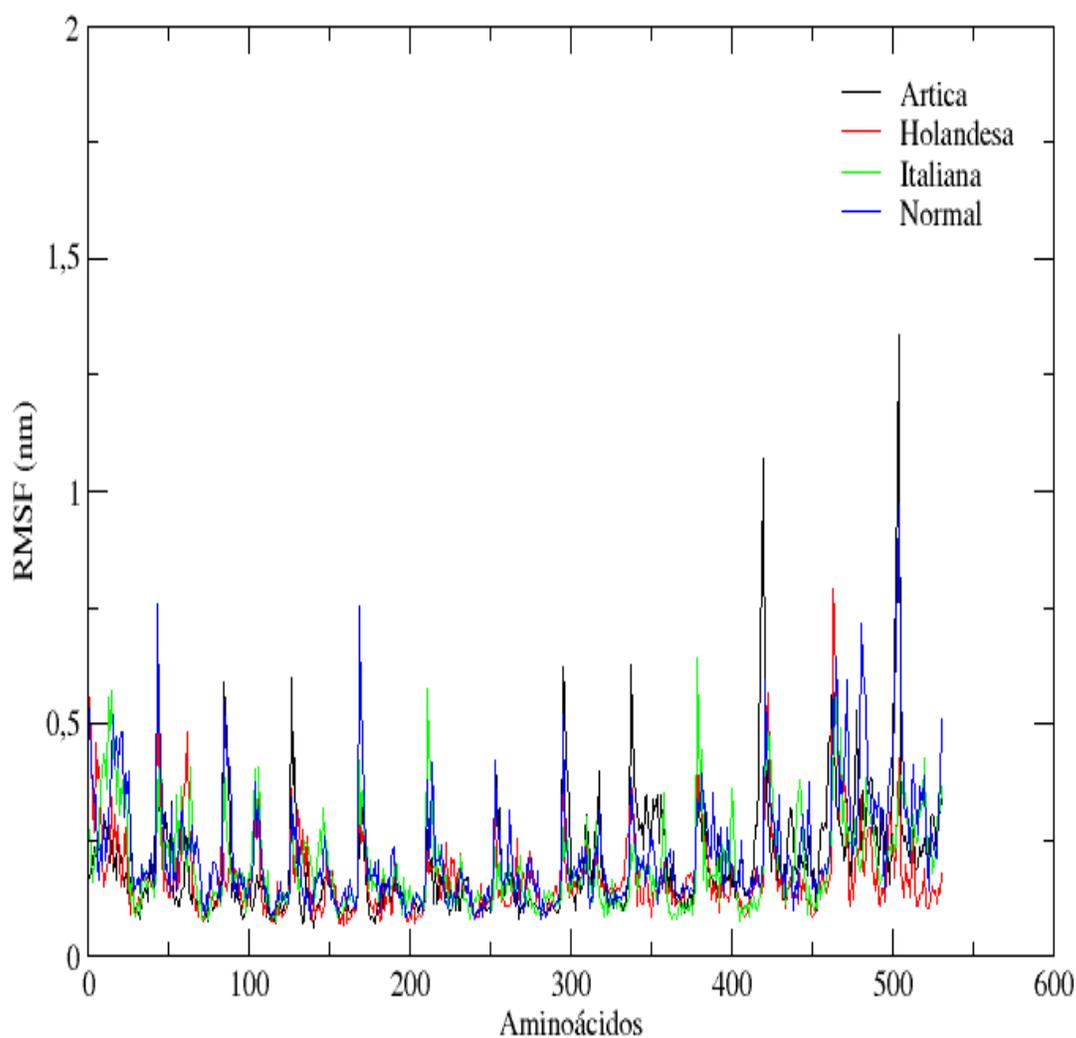


Figura 4.29: RMSF de los dodecámeros de β -amiloides estabilizados.

Por otro lado, el RMSD del acoplamiento de la mutación flamenca (ver figura 4.30), fue donde se observó una fluctuación mayor de 0.5 nm entre los 25 - 35 ns y a partir de los 42 ns hasta terminar la simulación, lo que nos indica que al realizarse la simulación de dinámica molecular, el ciclótido *caripe 4* desestabiliza a la mutación flamenca durante el tiempo de simulación (ver figura 4.30), por lo tanto el presente acoplamiento es muy probable que suceda en la realidad. Asimismo, el RMSF (ver figura 4.30) del acoplamiento de la mutación flamenca al igual que en el análisis del RMSD, muestra movimientos abruptos tanto en la región de las hojas- β como en la región de las colas. Estos hallazgos habren la posibilidad de que el ciclótido *caripe 4* pueda ser un candidato en el diseño de fármacos contra la mutación flamenca que origina la enfermedad del Alzheimer Temprano.

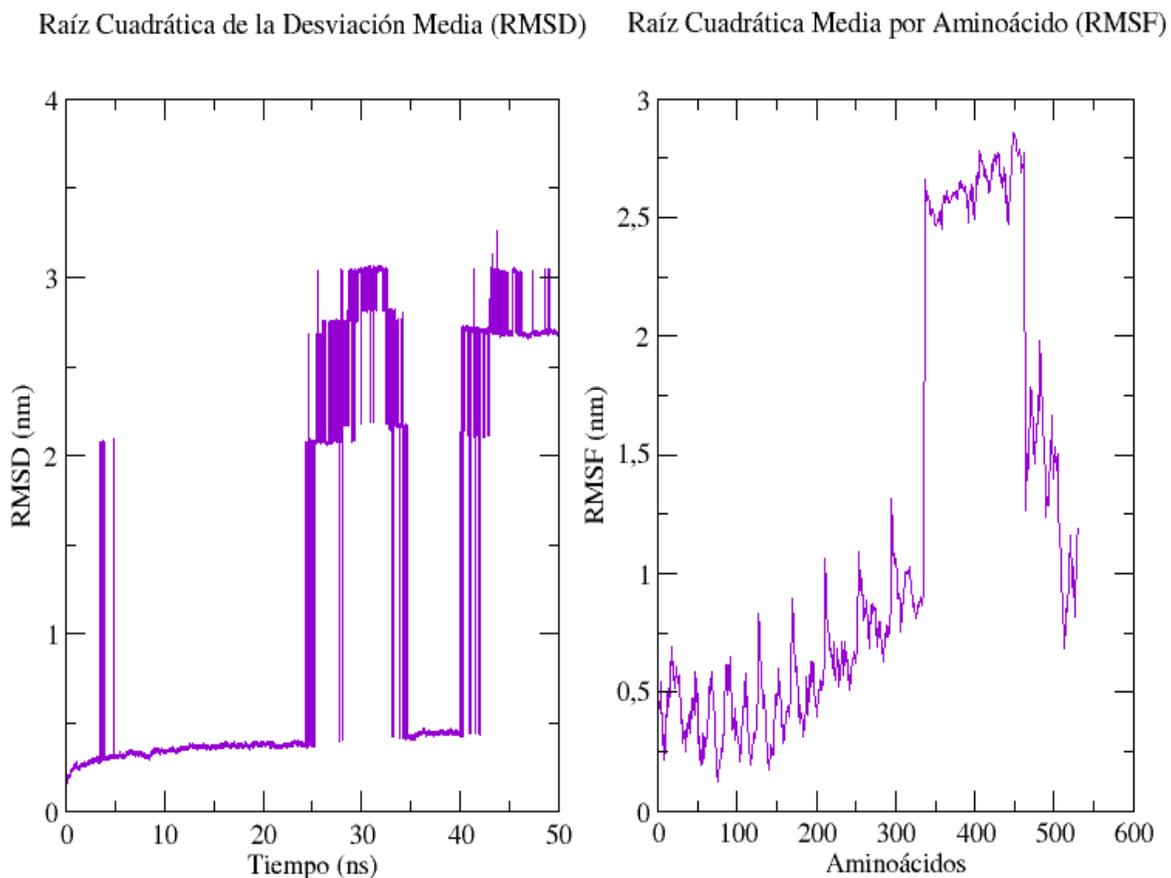


Figura 4.30: Gráfico del RMSD y RMSF del acoplamiento molecular de la mutación flamenca con el ciclótido *caripe 4*; fuente propia.

El gráfico de Ramachandran nos muestra el cambio de posición de los ángulos de las estructuras acopladas estables. En la figura 4.31.a podemos apreciar al dodecámero de β -amiloide normal acoplado, el cual presenta un 2.6% de aminoácidos fuera de las regiones favorecidas y permitidas, los cuales se pueden apreciar en los cuadrados rojos (serina, leucina, lisina, glicina, valina, histidina y aspartato.); un 14.8% en las regiones permitidas y un 82.6% en las regiones favorecidas, haciendo un total de 97.4%. En la figura 4.31.b se muestra que los aminoácidos del dodecámero normal y el ciclótido *caripe 4* se encuentran principalmente en las regiones de glicina favorecida (naranja oscuro) y glicina permitida (naranja claro), mientras que los aminoácidos del ciclótido *caripe 4* se encuentran en las regiones de pre-prolina favorecida (celeste intenso) y prolina favorecida (verde intenso).

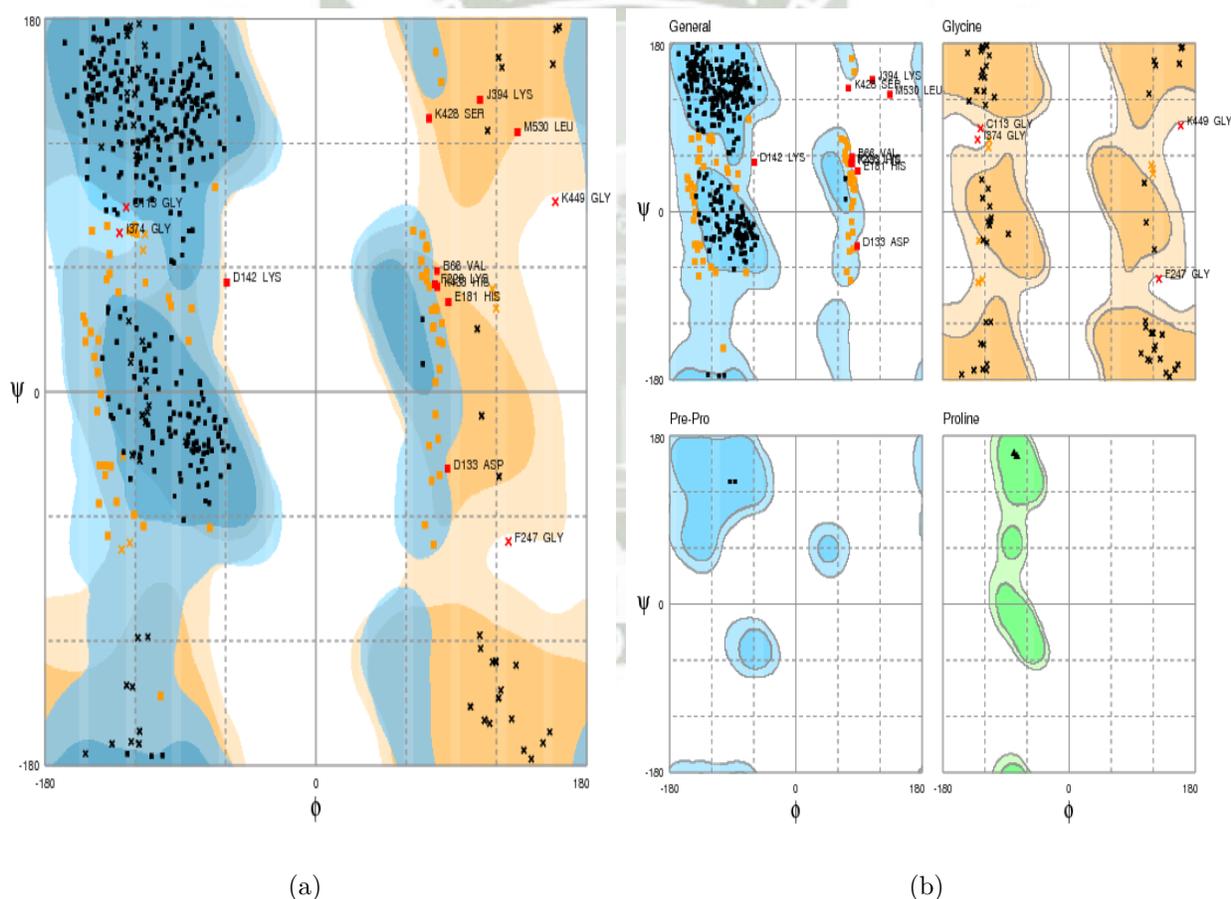


Figura 4.31: Gráfico de Ramachandran del acoplamiento molecular del dodecámero normal con el ciclótido *caripe 4*. Se muestran el (a) gráfico de Ramachandran general y el (b) gráfico de Ramachandran específico.

La figura 4.33.a nos muestra a la mutación flamenca acoplada, la cual presenta un 2.0% de aminoácidos fuera de las regiones favorecidas y permitidas, los cuales se pueden apreciar en los cuadrados rojos (histidina, aspartato, fenilalanina, metionina y serina.); un 17.4% en las regiones permitidas y un 80.5% en las regiones favorecidas, haciendo un total de 97.9%. En la figura 4.33.b se muestra que los aminoácidos de la mutación flamenca y el ciclótido *caripe 4* se encuentran principalmente en las regiones de glicina favorecida (naranja oscuro) y glicina permitida (naranja claro), mientras que los aminoácidos del ciclótido *caripe 4* se encuentran en las regiones de pre-prolina favorecida (celeste intenso) y prolina favorecida (verde intenso).

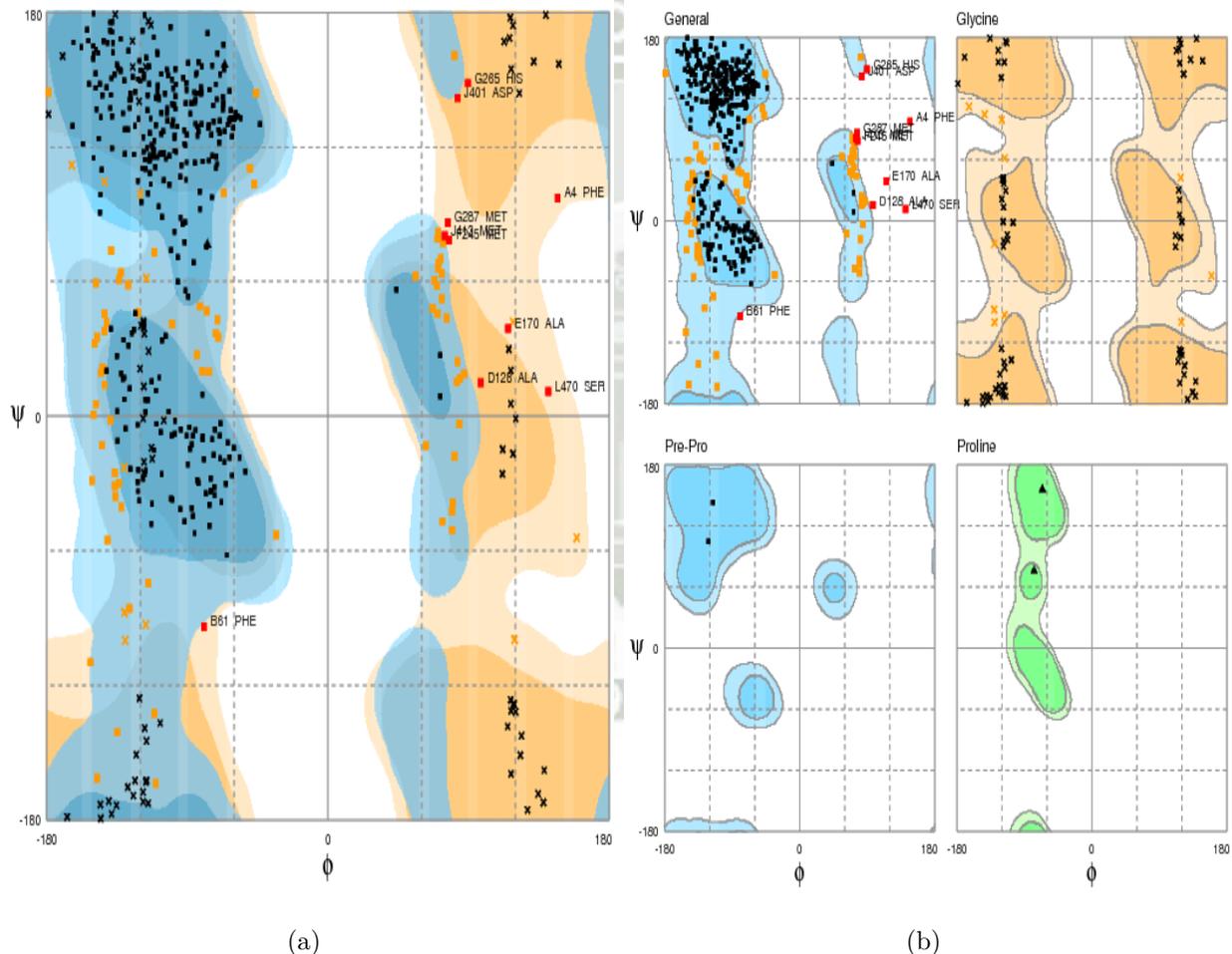


Figura 4.33: Gráfico de Ramachandran del acoplamiento molecular de la mutación flamenca con el ciclótido *caripe 4*. Se muestran el (a) gráfico de Ramachandran general y el (b) gráfico de Ramachandran específico.

La figura 4.34.a nos muestra a la mutación holandesa acoplada, la cual presenta un 2.0% de aminoácidos fuera de las regiones favorecidas y permitidas, los cuales se pueden apreciar en los cuadrados rojos (serina, fenilalanina, glutamina, histidina, tirosina y valina.); un 14.6% en las regiones permitidas y un 83.4% en las regiones favorecidas, haciendo un total de 98.0%. En la figura 4.34.b se muestra que los aminoácidos de la mutación holandesa y el ciclótido *caripe 4* se encuentran principalmente en las regiones de glicina favorecida (naranja oscuro) y glicina permitida (naranja claro), mientras que los aminoácidos del ciclótido *caripe 4* se encuentran en las regiones de pre-prolina favorecida (celestes intenso) y prolina favorecida (verde intenso).

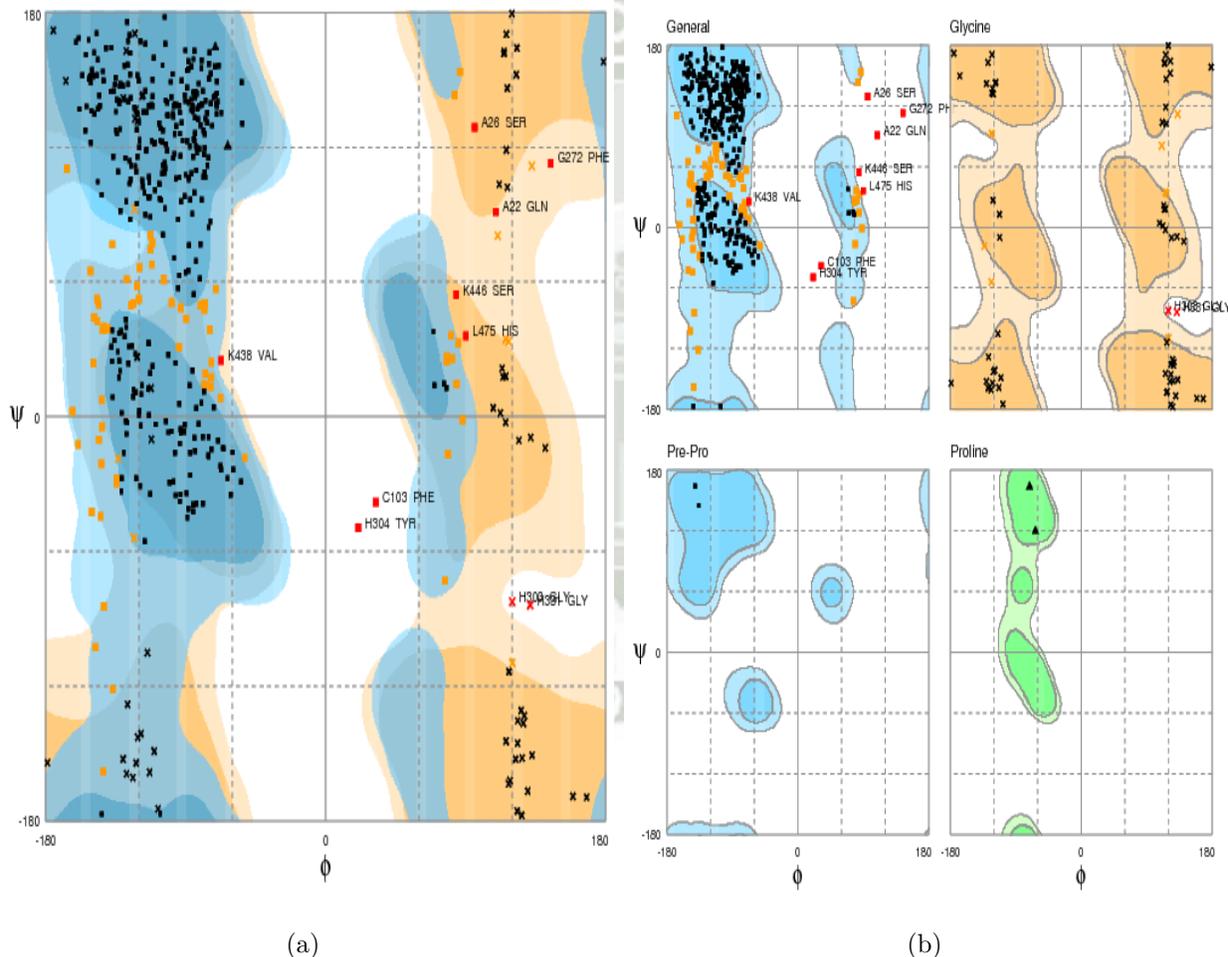


Figura 4.34: Gráfico de Ramachandran del acoplamiento molecular de la mutación holandesa con el ciclótido *caripe 4*. Se muestran el (a) gráfico de Ramachandran general y el (b) gráfico de Ramachandran específico.

La figura 4.35.a nos muestra a la mutación italiana acoplada, la cual presenta un 3.4 % de aminoácidos fuera de las regiones favorecidas y permitidas, los cuales se pueden apreciar en los cuadrados rojos (arginina, lisina, cisteína, leucina, valina, fenilalanina, aspartato, serina y alanina.); un 15.8 % en las regiones permitidas y un 80.7 % en las regiones favorecidas, haciendo un total de 96.5 %. En la figura 4.35.b se muestra que los aminoácidos de la mutación italiana y el ciclótido *caripe 4* se encuentran principalmente en las regiones de glicina favorecida (naranja oscuro) y glicina permitida (naranja claro), mientras que los aminoácidos del ciclótido *caripe 4* se encuentran en las regiones de pre-prolina favorecida (celeste intenso) y prolina favorecida (verde intenso).

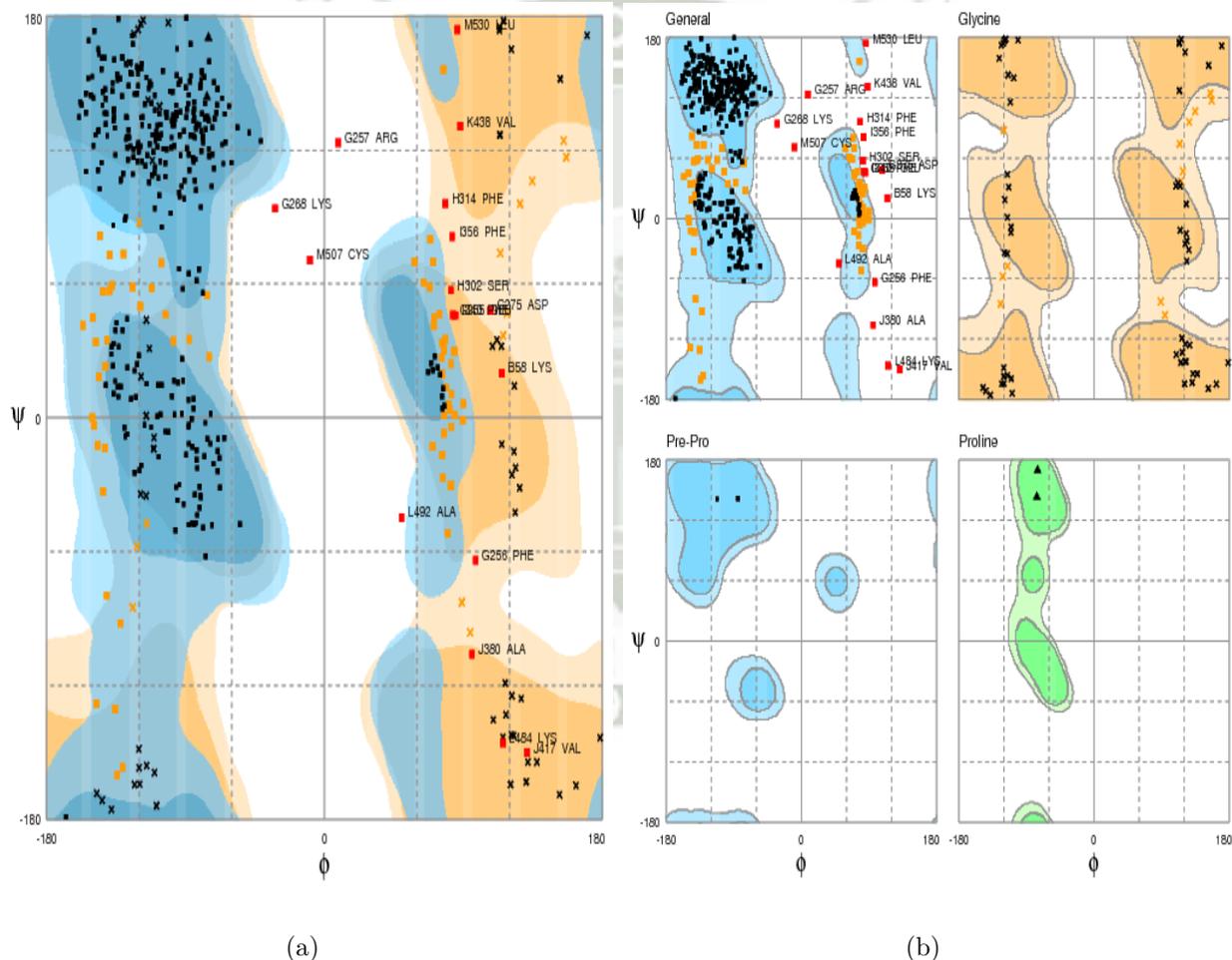


Figura 4.35: Gráfico de Ramachandran del acoplamiento molecular de la mutación italiana con el ciclótido *caripe 4*. Se muestran el (a) gráfico de Ramachandran general y el (b) gráfico de Ramachandran específico.

Cuando analizamos la evolución de las estructuras secundarias durante la simulación molecular, obtenemos gráficos de DSSP, estos nos indican cuán estables son las diferentes estructuras secundarias en nuestra proteína donde apreciamos α -hélices, hojas- β , cuerdas, inclinación de los ángulos, colas, puentes- β , 5- α -hélices y 3- α -hélices. Además, podemos apreciar la evolución de la estructura mediante su codificación de colores, los cuales corresponden a la región de las colas (blanco), a las hojas- β (rojo), a los puentes- β (negro), a la inclinación angular (verde), a los giros (amarillo), a las hélices- α (morado), a la hélice-5 (lila), a la hélice-3 (plomo oscuro), al separador de cadena (plomo claro).

El DSSP del acoplamiento molecular del dodecámero normal (ver figura 4.36) nos muestra que presenta hojas- β conservadas en los aminoácidos 40, 80, 120-130, 160-170, 200-210, 240-260, 290-310, 340-350, 380, 420, 460-470 y los aminoácidos que corresponden al ciclótido *caripe 4* (530). Sin embargo, se observan pérdidas de las hojas- β al contrastar con el DSSP del dodecámero normal; de color verde se presentan las inclinaciones angulares conservadas a lo largo del tiempo presente en casi todos los aminoácidos. Asimismo, cada 42 aminoácidos se observa una separación de cada cadena y finalmente se observan los giros de los diedros en los aminoácidos 20, 320 y 400-420.

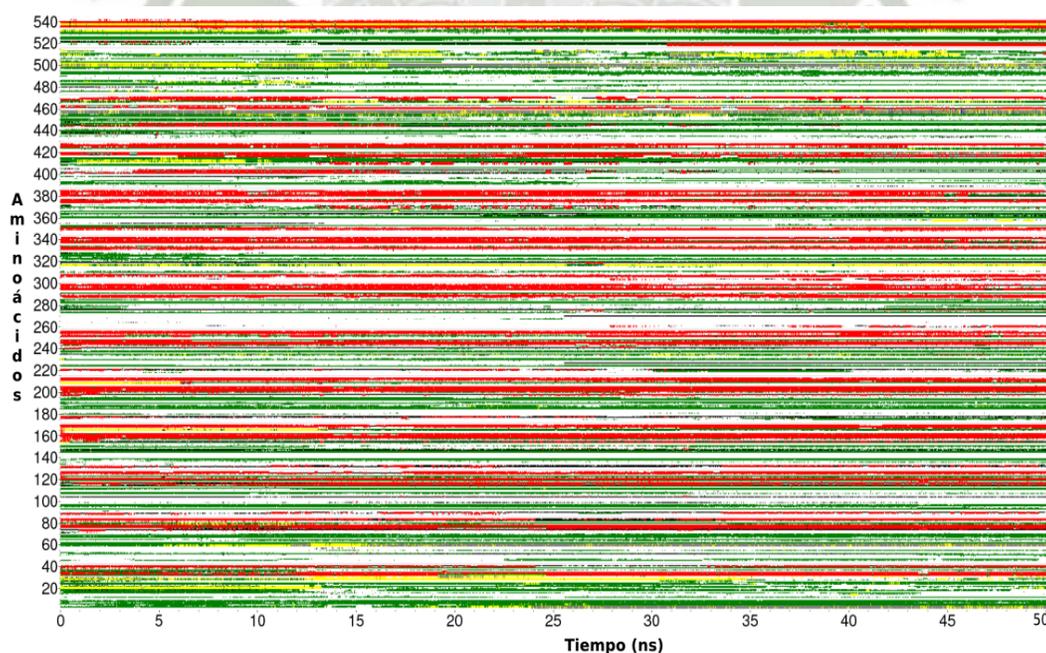


Figura 4.36: Gráfico de DSSP del acoplamiento molecular del dodecámero normal.

El acoplamiento de la mutación ártica (ver figura 4.37) muestra la presencia de hojas- β conservadas en color rojo, en los aminoácidos 40-50, 80-150, 160-170, 200-220, 250-260, 270, 340, 420, 460-470, 500-510. Sin embargo, se observan pérdidas de las hojas- β al contrastar con el DSSP de la mutación ártica; de color verde se presentan las inclinaciones angulares conservadas a lo largo del tiempo presente en casi todos los aminoácidos. Asimismo cada 42 aminoácidos se observa una separación de cada cadena; se observan los giros de los diedros en los aminoácidos 100, 180-200, 350 y 470, las colas en las regiones coloreadas de blanco y los puentes- β de color negro en los aminoácidos 230, 380, 500 y 520-531.

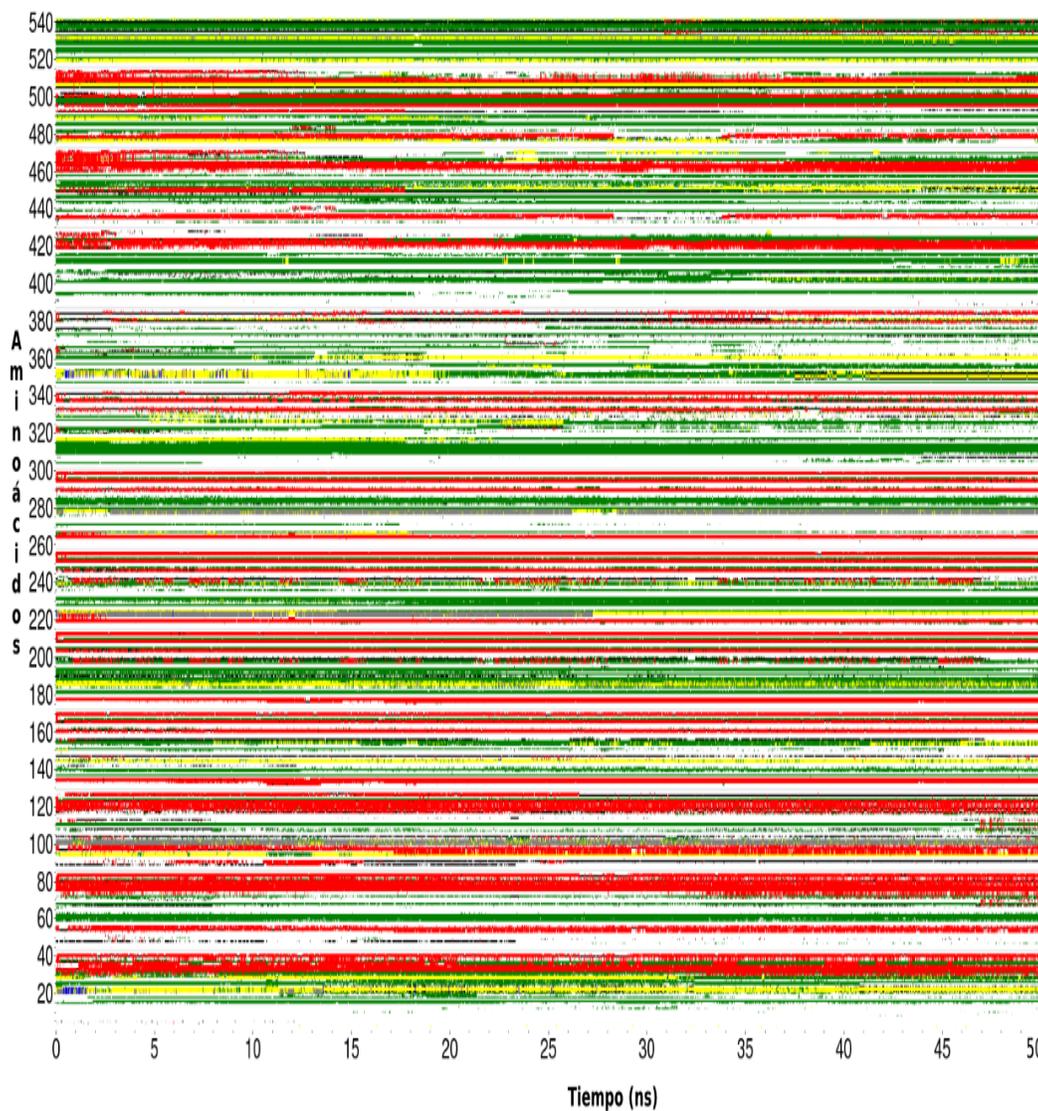


Figura 4.37: Gráfico de DSSP del acoplamiento molecular de la mutación ártica.

El acoplamiento de la mutación flamenca (ver figura 4.38) muestra la presencia de hojas- β conservadas en color rojo, en los aminoácidos 50, 80-100, 110-130, 160-180, 210-220, 250-260, 290-300, 310-340, 380-390, 440, 460, 590 y 530. Sin embargo, se observan pérdidas de las hojas- β al contrastar con el DSSP de la mutación flamenca; de color verde se presentan las inclinaciones angulares consevadas a lo largo del tiempo presente en casi todos los aminoácidos. Asimismo, cada 42 aminoácidos se observa una separación de cada cadena; se observan los giros de los diedros en los aminoácidos 10-20, 180-200, 270-280 y 530; las colas en las regiones coloreadas de blanco y los puentes- β de color negro en los aminoácidos 200, 440 y 460.

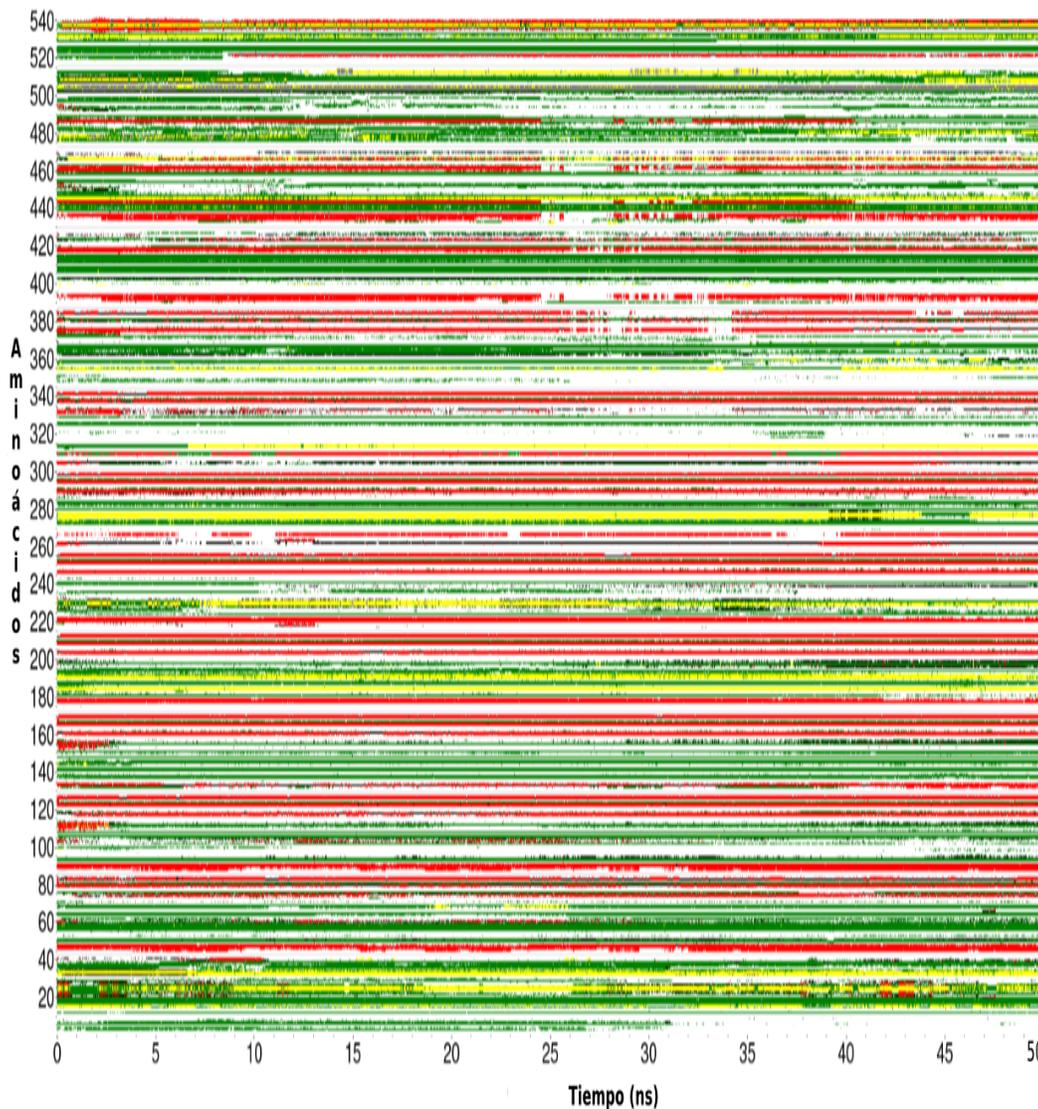


Figura 4.38: Gráfico de DSSP del acoplamiento molecular de la mutación flamenca.

El acoplamiento de la mutación holandesa (ver figura 4.39) muestra la presencia de hojas- β conservadas en color rojo, en los aminoácidos 30-40, 70-80, 120-130, 160-170, 200-210, 240-250, 290-300, 330-340, 380, 420 y 520-530. Sin embargo, se observan pérdidas de las hojas- β al contrastar con el DSSP de la mutación holandesa; de color verde se presentan las inclinaciones angulares conservadas a lo largo del tiempo presente en casi todos los aminoácidos. Asimismo, cada 42 aminoácidos se observa una separación de cada cadena; se observan los giros de los diedros en los aminoácidos 20-30, 190, 320, 440 y 510; las colas en las regiones coloreadas de blanco y los puentes- β de color negro en los aminoácidos 40, 80, 120, 160, 210, 250, 460 y 500.

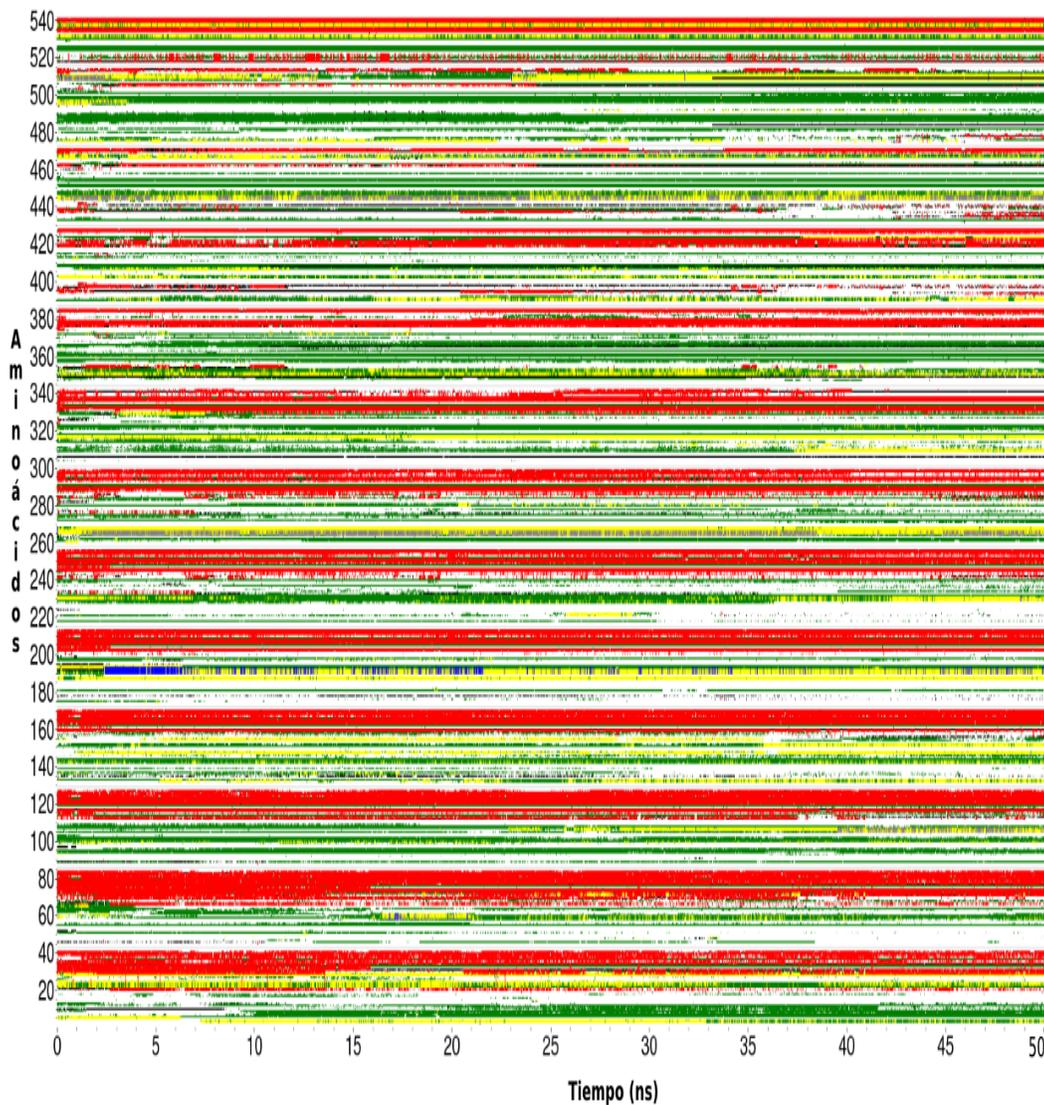


Figura 4.39: Gráfico de DSSP del acoplamiento molecular de la mutación holandesa.

El acoplamiento de la mutación italiana (ver figura 4.40) muestra la presencia de hojas- β conservadas en color rojo, en los aminoácidos 30, 70-160, 200-210, 250-260, 280-340, 370-380, 400-420, 460-470 y 530. Sin embargo, se observan pérdidas de las hojas- β al contrastar con el DSSP de la mutación italiana; de color verde se presentan las inclinaciones angulares conservadas a lo largo del tiempo presente en casi todos los aminoácidos. Asimismo, cada 42 aminoácidos se observa una separación de cada cadena; se observan los giros de los diedros en los aminoácidos 50-60, 170, 310 y 490; las colas en las regiones coloreadas de blanco y los puentes- β de color negro en los aminoácidos 80, 330, 370, 460 y 500.

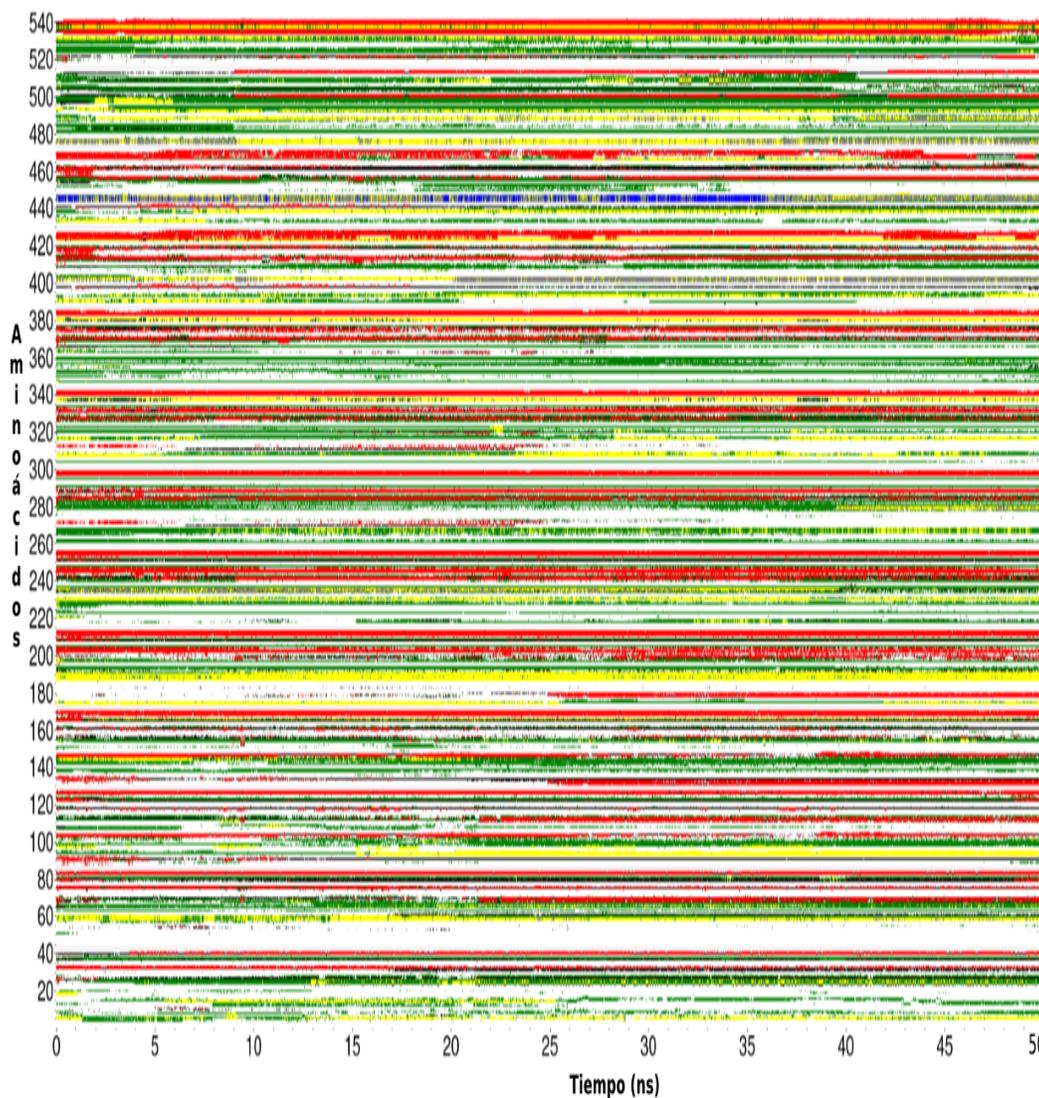


Figura 4.40: Gráfico de DSSP del acoplamiento molecular de la mutación italiana.

Conclusiones

1. Se determinaron las estructuras de menor energía de los ciclótidos peruanos presentes en la familia Rubiaceae susceptibles de interactuar con el oligómero de β -amiloide normal y los oligómeros de β -amiloides mutados. Las estructuras de los ciclótidos fueron proporcionadas por el proyecto FONDECYT-139. El ciclótido peruano de menor energía y uno de los más estables fue el ciclótido *Caripe 4*.
2. Se modelaron y evaluaron el dodecámero de β -amiloide normal y los dodecámeros de β -amiloides mutados (ártica, flamenca, holandesa e italiana) observando que las estructuras se mantuvieron estables durante los 100 ns de simulación.
3. Se generaron hipersuperficies de potencial electrostático, para los procesos de interacción ciclótido – proteína, tanto para los dodecámeros del β -amiloide normal como para los dodecámeros de β -amiloides mutadas, observando una interacción nucleofílica por parte de los dodecámeros hacia el ciclótido y un ataque electrofílico por parte del ciclótido hacia los dodecámeros.
4. Se evaluó la interacción del ciclótido peruano *caripe 4* de la familia Rubiaceae con los dodecámeros de la β -amiloide normal y las β -amiloide mutadas, dándonos como resultado la desestabilización del dodecámero flamenca al romperse en dos partes, después de su acoplamiento con el ciclótido *Caripe 4*.

Recomendaciones

1. Cambiar las condiciones de la simulación de dinámica molecular para todos los sistemas estudiados; por ejemplo, aumentar el alcance de las interacciones (cut-off) y aumentar el tiempo de la simulación (llegar a 200 ns).
2. Realizar una simulación de dinámica molecular de la agregación de 12 monómeros del péptido β -amiloide con el fin de visualizar a partir de qué tiempo de simulación se forman los agregados (dímeros o trímeros).
3. Realizar un acoplamiento molecular con los oligómeros de β -amiloides mutados y otros ciclótidos estables con el fin de encontrar posibles fármacos que puedan emplearse para la enfermedad del Alzheimer Temprano.

Bibliografía

- [1] Ryan NS, Rossor MN, Fox NC. Alzheimer's disease in the 100 years since Alzheimer's death. *Brain*. 2015;p. 316.
- [2] Sambamurti K, Greig NH, Utsuki T, Barnwell EL, Sharma E, Mazell C, et al. Targets for AD treatment: conflicting messages from γ -secretase inhibitors. *Journal of neurochemistry*. 2011;117(3):359–374.
- [3] Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, Feldman H, Giacobini E, Jones R, et al. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *Journal of internal medicine*. 2014;275(3):251–283.
- [4] Rafii MS, Aisen PS. Advances in Alzheimer's disease drug development. *BMC medicine*. 2015;13(1):1.
- [5] H Ferreira-Vieira T, M Guimaraes I, R Silva F, M Ribeiro F. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Current neuropharmacology*. 2016;14(1):101–115.
- [6] Larson ME, Lesné SE. Soluble A β oligomer production and toxicity. *Journal of neurochemistry*. 2012;120(s1):125–139.
- [7] Jefferson AL, Beiser AS, Seshadri S, Wolf PA, Au R. APOE and mild cognitive impairment: the Framingham Heart Study. *Age and ageing*. 2015;44(2):307–311.
- [8] Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *The Lancet Neurology*. 2013;12(2):207–216.

- [9] Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, et al. The Arctic APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nature neuroscience*. 2001;4(9):887–893.
- [10] Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature genetics*. 1992;1(3):218–221.
- [11] Fernandez-Madrid I, Levy E, Marder K, Frangione B. Codon 618 variant of Alzheimer amyloid gene associated with inherited cerebral hemorrhage. *Annals of neurology*. 1991;30(5):730–733.
- [12] Bugiani O, Giaccone G, Rossi G, Mangieri M, Capobianco R, Morbin M, et al. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP. *Archives of neurology*. 2010;67(8):987–995.
- [13] Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A [beta] oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nature neuroscience*. 2012;15(3):349–357.
- [14] Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell stem cell*. 2013;12(4):487–496.
- [15] Chopra K, Misra S, Kuhad A. Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2011;12(3):335–350.
- [16] Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016;537(7618):50–56.
- [17] Anderson RM, Hadjichrysanthou C, Evans S, Wong MM. Why do so many clinical trials of therapies for Alzheimer's disease fail? *The Lancet*. 2017;390(10110):2327–2329.
- [18] Das P, Kang Sg, Temple S, Belfort G. Interaction of amyloid inhibitor proteins with amyloid beta peptides: insight from molecular dynamics simulations. *PloS one*. 2014;9(11):e113041.

- [19] Kumar P, Pillay V, Choonara YE, Modi G, Naidoo D, Du Toit LC. In silico theoretical molecular modeling for Alzheimer's disease: the nicotine-curcumin paradigm in neuroprotection and neurotherapy. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(1):694–724.
- [20] Craik DJ, Swedberg JE, Mylne JS, Cemazar M. Cyclotides as a basis for drug design. *Expert opinion on drug discovery*. 2012;7(3):179–194.
- [21] Nawae W, Hannongbua S, Ruengjitchatchawalya M. Molecular dynamics exploration of poration and leaking caused by Kalata B1 in HIV-infected cell membrane compared to host and HIV membranes. *Scientific reports*. 2017;7(1):3638.
- [22] Cascales L, Henriques ST, Kerr MC, Huang YH, Sweet MJ, Daly NL, et al. Identification and characterization of a new family of cell-penetrating peptides cyclic cell-penetrating peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(42):36932–36943.
- [23] Leach AR. *Molecular modelling: principles and applications*. 2001. Harlow: Prentice Hall. 2010;24(744):2.
- [24] Alzheimer's A. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*. 2015;11(3):332.
- [25] Pilon MH, Poulin S, Fortin MP, Houde M, Verret L, Bouchard RW, et al. Differences in Rate of Cognitive Decline and Caregiver Burden between Alzheimer's Disease and Vascular Dementia: a Retrospective Study. *Neurology (E-Cronicon)*. 2016;2(6):278.
- [26] Prince MJ. *World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends*. *Alzheimer's Disease International*; 2015.
- [27] Prince M, Ali GC, Guerchet M, Prina AM, Albanese E, Wu YT. Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2016;8(1):23.
- [28] Dawkins E, Small DH. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 2014;129(5):756–769.

- [29] Kennedy ME, Stamford AW, Chen X, Cox K, Cumming JN, Dockendorf MF, et al. The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. *Science translational medicine*. 2016;8(363):363ra150–363ra150.
- [30] Crespo-Biel N, Theunis C, Van Leuven F. Protein tau: prime cause of synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;2012.
- [31] Iqbal K, Liu F, Gong CX. Alzheimer disease therapeutics: focus on the disease and not just plaques and tangles. *Biochemical pharmacology*. 2014;88(4):631–639.
- [32] Zhang B, Carroll J, Trojanowski JQ, Yao Y, Iba M, Potuzak JS, et al. The microtubule-stabilizing agent, epothilone D, reduces axonal dysfunction, neurotoxicity, cognitive deficits, and Alzheimer-like pathology in an interventional study with aged tau transgenic mice. *Journal of Neuroscience*. 2012;32(11):3601–3611.
- [33] Panza F, Solfrizzi V, Seripa D, Imbimbo BP, Lozupone M, Santamato A, et al. Tau-centric targets and drugs in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease. *BioMed research international*. 2016;2016.
- [34] Joubert S, Brambati SM, Ansado J, Barbeau EJ, Felician O, Didic M, et al. The cognitive and neural expression of semantic memory impairment in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neuropsychologia*. 2010;48(4):978–988.
- [35] Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Genetic insights in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 2013;12(1):92–104.
- [36] Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*. 1993;11(4):575–580.
- [37] Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology*. 2013;9(2):106–118.

- [38] Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine*. 2015;18(5):421–430.
- [39] Murakami K, Irie K, Morimoto A, Ohigashi H, Shindo M, Nagao M, et al. Neurotoxicity and physicochemical properties of A β mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(46):46179–46187.
- [40] Lanoiselée HM, Nicolas G, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Lacour M, Rousseau S, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Medicine*. 2017;14(3):e1002270.
- [41] Nicolas M, Hassan BA. Amyloid precursor protein and neural development. *Development*. 2014;141(13):2543–2548.
- [42] Hamley I. The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization. *Chemical reviews*. 2012;112(10):5147–5192.
- [43] Hong L, Carducci TM, Bush WD, Dudzik CG, Millhauser GL, Simon JD. Quantification of the Binding Properties of Cu²⁺ to the Amyloid Beta Peptide: Coordination Spheres for Human and Rat Peptides and Implication on Cu²⁺-Induced Aggregation†. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114(34):11261–11271.
- [44] Catricala S, Torti M, Ricevuti G. Alzheimer disease and platelets: how's that relevant. *Immunity & Ageing*. 2012;9(1):1.
- [45] Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Hartmann T. Neprilysin and A β clearance: impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*. 2013;5:98.
- [46] Beckett C, Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ. Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. *Cellular signalling*. 2012;24(2):402–409.
- [47] Xu X. γ -Secretase catalyzes sequential cleavages of the A β PP transmembrane domain. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2009;16(2):211–224.

- [48] Kretner B, Fukumori A, Kuhn PH, Pérez-Revuelta BI, Lichtenthaler SF, Haass C, et al. Important functional role of residue x of the presenilin GxGD protease active site motif for APP substrate cleavage specificity and substrate selectivity of γ -secretase. *Journal of neurochemistry*. 2013;125(1):144–156.
- [49] Subramaniam D, Ponnurangam S, Ramamoorthy P, Standing D, Battafarano RJ, Anant S, et al. Curcumin induces cell death in esophageal cancer cells through modulating Notch signaling. *PloS one*. 2012;7(2):e30590.
- [50] D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends in neurosciences*. 2012;35(11):700–709.
- [51] Wang XJ, Cao Q, Zhang Y, Su XD. Activation and regulation of caspase-6 and its role in neurodegenerative diseases. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2015;55:553–572.
- [52] Drummond E, Goñi F, Liu S, Prelli F, Scholtzova H, Wisniewski T. Potential novel approaches to understand the pathogenesis and treat Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018;(Preprint):1–14.
- [53] Roberts BR, Ryan TM, Bush AI, Masters CL, Duce JA. The role of metallobiology and amyloid- β peptides in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 2012;120(s1):149–166.
- [54] Nimrich V, Draguhn A, Axmacher N. Neuronal network oscillations in neurodegenerative diseases. *Neuromolecular medicine*. 2015;17(3):270–284.
- [55] Palop JJ, Mucke L. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2016;.
- [56] Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(6):384–396.
- [57] Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto Si, et al. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(27):E2518–E2527.

- [58] Masters CL, Selkoe DJ. Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(6):a006262.
- [59] Chasseigneaux S, Allinquant B. Functions of $A\beta$, sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *Journal of neurochemistry*. 2012;120(s1):99–108.
- [60] Morley JE, Farr SA. The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochemical pharmacology*. 2014;88(4):479–485.
- [61] Ly PT, Wu Y, Zou H, Wang R, Zhou W, Kinoshita A, et al. Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(1):224–235.
- [62] Ahmed M, Davis J, Aucoin D, Sato T, Ahuja S, Aimoto S, et al. Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1–42 oligomers to fibrils. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2010;17(5):561.
- [63] Sakono M, Zako T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of $A\beta$ oligomers. *The FEBS journal*. 2010;277(6):1348–1358.
- [64] Lee SJC, Nam E, Lee HJ, Savelieff MG, Lim MH. Towards an understanding of amyloid- β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chemical Society Reviews*. 2017;46(2):310–323.
- [65] Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013;501(7465):45–51.
- [66] Liu C, Zhao M, Jiang L, Cheng PN, Park J, Sawaya MR, et al. Out-of-register β -sheets suggest a pathway to toxic amyloid aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(51):20913–20918.
- [67] Fitzpatrick AW, Debelouchina GT, Bayro MJ, Clare DK, Caporini MA, Bajaj VS, et al. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(14):5468–5473.

- [68] Tycko R, Wickner RB. Molecular structures of amyloid and prion fibrils: consensus versus controversy. *Accounts of chemical research*. 2013;46(7):1487–1496.
- [69] Garvey M, Meehan S, Gras SL, Schirra HJ, Craik DJ, Van der Weerden NL, et al. A radish seed antifungal peptide with a high amyloid fibril-forming propensity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2013;1834(8):1615–1623.
- [70] Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, et al. Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature*. 2007;447(7143):453.
- [71] Fändrich M. Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity. *Journal of molecular biology*. 2012;421(4):427–440.
- [72] Bieschke J, Herbst M, Wiglenda T, Friedrich RP, Boeddrich A, Schiele F, et al. Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils. *Nature chemical biology*. 2012;8(1):93–101.
- [73] Scheidt HA, Morgado I, Rothmund S, Huster D, Fändrich M. Solid-State NMR Spectroscopic Investigation of A β Protofibrils: Implication of a β -Sheet Remodeling upon Maturation into Terminal Amyloid Fibrils. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011;50(12):2837–2840.
- [74] Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*. 2012;148(6):1188–1203.
- [75] Butterfield SM, Lashuel HA. Amyloidogenic protein-membrane interactions: mechanistic insight from model systems. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010;49(33):5628–5654.
- [76] Broersen K, Rousseau F, Schymkowitz J. The culprit behind amyloid beta peptide related neurotoxicity in Alzheimer's disease: oligomer size or conformation? *Alzheimer's research & therapy*. 2010;2(4):1.

- [77] Kotler SA, Walsh P, Brender JR, Ramamoorthy A. Differences between amyloid- β aggregation in solution and on the membrane: insights into elucidation of the mechanistic details of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews*. 2014;43(19):6692–6700.
- [78] Baldassarre M, Bennett M, Barth A. Simultaneous acquisition of infrared, fluorescence and light scattering spectra of proteins: direct evidence for pre-fibrillar species in amyloid fibril formation. *Analyst*. 2016;141(3):963–973.
- [79] Gu L, Liu C, Stroud JC, Ngo S, Jiang L, Guo Z. Antiparallel triple-strand architecture for prefibrillar A β 42 oligomers. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(39):27300–27313.
- [80] J Baranello R, L Bharani K, Padmaraju V, Chopra N, K Lahiri D, H Greig N, et al. Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. 2015;12(1):32–46.
- [81] Moreth J, Kroker KS, Schwanzar D, Schnack C, von Arnim CA, Hengerer B, et al. Globular and protofibrillar A β aggregates impair neurotransmission by different mechanisms. *Biochemistry*. 2013;52(8):1466–1476.
- [82] Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci*. 2013;38(1):6–23.
- [83] Antal M, Beneduce BM, Regehr WG. The substantia nigra conveys target-dependent excitatory and inhibitory outputs from the basal ganglia to the thalamus. *The Journal of Neuroscience*. 2014;34(23):8032–8042.
- [84] Rajkowska G, A Stockmeier C. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Current drug targets*. 2013;14(11):1225–1236.
- [85] Pomierny-Chamioło L, Rup K, Pomierny B, Niedzielska E, Kalivas PW, Filip M. Metabotropic glutamatergic receptors and their ligands in drug addiction. *Pharmacology & therapeutics*. 2014;142(3):281–305.
- [86] Danbolt N, Furness D, Zhou Y. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochemistry international*. 2016;.

- [87] Takahashi K, Kong Q, Lin Y, Stouffer N, Schulte DA, Lai L, et al. Restored glial glutamate transporter EAAT2 function as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(3):319–332.
- [88] Sokolow S, Luu SH, Nandy K, Miller CA, Vinters HV, Poon WW, et al. Preferential accumulation of amyloid-beta in presynaptic glutamatergic terminals (VGluT1 and VGluT2) in Alzheimer's disease cortex. *Neurobiology of disease*. 2012;45(1):381–387.
- [89] Scott HA, Gebhardt FM, Mitrovic AD, Vandenberg RJ, Dodd PR. Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2011;32(3):553–e1.
- [90] Yeh CY, Verkhatsky A, Terzieva S, Rodríguez JJ. Glutamine synthetase in astrocytes from entorhinal cortex of the triple transgenic animal model of Alzheimer's disease is not affected by pathological progression. *Biogerontology*. 2013;14(6):777–787.
- [91] Erickson MA, Banks WA. Blood–brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013;33(10):1500–1513.
- [92] Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma P. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European journal of pharmacology*. 2013;698(1):6–18.
- [93] Grill JD, Cummings JL. Novel targets for Alzheimer's disease treatment. *Expert review of neurotherapeutics*. 2010;10(5):711.
- [94] Devi KP, Shanmuganathan B, Manayi A, Nabavi SF, Nabavi SM. Molecular and therapeutic targets of genistein in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*. 2017;54(9):7028–7041.
- [95] MUSHTAQ Z, IQBAL T, AHMED N, JAMIL A. ANTIOXIDANTS FROM SELECTED INDIGENOUS PLANTS POSSESSING CYCLOTIDES. *Oxidation Communications*. 2017;40(1-I):102–119.

- [96] Ravipati AS, Poth AG, Troeira Henriques S, Bhandari M, Huang YH, Nino J, et al. Understanding the diversity and distribution of cyclotides from plants of varied genetic origin. *Journal of natural products*. 2017;80(5):1522–1530.
- [97] Gerlach SL, Burman R, Bohlin L, Mondal D, Goransson U. Isolation, characterization, and bioactivity of cyclotides from the Micronesian plant *Psychotria leptothyrsa*. *Journal of natural products*. 2010;73(7):1207–1213.
- [98] Grage SL, Sani MA, Cheneval O, Henriques ST, Schalck C, Heinzmann R, et al. Orientation and Location of the Cyclotide Kalata B1 in Lipid Bilayers Revealed by Solid-State NMR. *Biophysical Journal*. 2017;112(4):630–642.
- [99] Daly NL, Rosengren KJ. Chapter Six-Structural Studies of Cyclotides. *Advances in Botanical Research*. 2015;76:155–186.
- [100] Koehbach J, Attah AF, Berger A, Hellinger R, Kutchan TM, Carpenter EJ, et al. Cyclotide discovery in Gentianales revisited—identification and characterization of cyclic cystine-knot peptides and their phylogenetic distribution in Rubiaceae plants. *Peptide Science*. 2013;100(5):438–452.
- [101] Slazak B, Jacobsson E, Kuta E, Göransson U. Exogenous plant hormones and cyclotide expression in *Viola uliginosa* (Violaceae). *Phytochemistry*. 2015;117:527–536.
- [102] Göransson U, Burman R, Gunasekera S, Strömstedt AA, Rosengren KJ. Circular proteins from plants and fungi. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(32):27001–27006.
- [103] Craik DJ, Daly NL, Waine C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon*. 2001;39(1):43–60.
- [104] Kritzer JA, Hamamichi S, McCaffery JM, Santagata S, Naumann TA, Caldwell KA, et al. Rapid selection of cyclic peptides that reduce α -synuclein toxicity in yeast and animal models. *Nature chemical biology*. 2009;5(9):655–663.
- [105] Kintzing JR, Cochran JR. Engineered knottin peptides as diagnostics, therapeutics, and drug delivery vehicles. *Current opinion in chemical biology*. 2016;34:143–150.

- [106] Narayani M, Chadha A, Srivastava S. Cyclotides from the Indian Medicinal Plant *Viola odorata* (Banafsha): Identification and Characterization. *Journal of natural products*. 2017;80(7):1972–1980.
- [107] Thell K, Hellinger R, Sahin E, Michenthaler P, Gold-Binder M, Haider T, et al. Oral activity of a nature-derived cyclic peptide for the treatment of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(15):3960–3965.
- [108] Zhou Y, Cai M. Novel approaches to the design of bioavailable melanotropins. *Expert opinion on drug discovery*. 2017;12(10):1023–1030.
- [109] Jagadish K, Camarero JA. Recombinant expression of cyclotides using split inteins. In: *Split Inteins*. Springer; 2017. p. 41–55.
- [110] Gunasekera S, Foley FM, Clark RJ, Sando L, Fabri LJ, Craik DJ, et al. Engineering stabilized vascular endothelial growth factor-A antagonists: synthesis, structural characterization, and bioactivity of grafted analogues of cyclotides. *Journal of medicinal chemistry*. 2008;51(24):7697–7704.
- [111] Kanmert D, Cantlon A, Muratore CR, Jin M, O'Malley TT, Lee G, et al. C-terminally truncated forms of tau, but not full-length tau or its C-terminal fragments, are released from neurons independently of cell death. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(30):10851–10865.
- [112] Rodriguez JA, Ivanova MI, Sawaya MR, Cascio D, Reyes FE, Shi D, et al. Structure of the toxic core of [agr]-synuclein from invisible crystals. *Nature*. 2015;525(7570):486–490.
- [113] Fittler H, Avrutina O, Empting M, Kolmar H. Potent inhibitors of human matriptase-1 based on the scaffold of sunflower trypsin inhibitor. *Journal of Peptide Science*. 2014;20(6):415–420.
- [114] White AM, Craik DJ. Discovery and optimization of peptide macrocycles. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2016;11(12):1151–1163.

- [115] Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural product reports*. 2013;30(1):108–160.
- [116] Gould A, Camarero JA. Cyclotides: Overview and Biotechnological Applications. *ChemBioChem*. 2017;.
- [117] Grosse-Holz FM, Hoorn RA. Juggling jobs: roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants. *New Phytologist*. 2016;.
- [118] Conlan BF, Colgrave ML, Gillon AD, Guarino R, Craik DJ, Anderson MA. Insights into processing and cyclization events associated with biosynthesis of the cyclic Peptide kalata B1. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(33):28037–28046.
- [119] Craik DJ, Malik U. Cyclotide biosynthesis. *Current opinion in chemical biology*. 2013;17(4):546–554.
- [120] Okuda A, Matsusaki M, Masuda T, Urade R. Identification and characterization of GmPDIL7, a soybean ER membrane-bound protein disulfide isomerase family protein. *The FEBS Journal*. 2017;284(3):414–428.
- [121] Camarero JA. Legume cyclotides shed light on the genetic origin of knotted circular proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(25):10025–10026.
- [122] Hoerter T, Brgoch J, Ewing WR, Glasgow K, Greenblatt L, Kosbar L, et al. Supply and Demand of Chemists in the United States. In: *Jobs, Collaborations, and Women Leaders in the Global Chemistry Enterprise*. ACS Publications; 2015. p. 15–33.
- [123] March-Vila E, Pinzi L, Sturm N, Tinivella A, Engkvist O, Chen H, et al. On the integration of in silico drug design methods for drug repurposing. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:298.
- [124] Lewars EG. *Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*. Springer; 2016.

- [125] Pottel J, Moitessier N. EfficiEnt transition statE ModELing Using MolEcUlar MEcha-nics forcE fiElDs for thE EvEryday chEMist. *Reviews in Computational Chemistry*. 2016;29:152.
- [126] Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 1996;118(45):11225–11236.
- [127] Jalaie M, Lipkowitz KB. Published force field parameters for molecular mechanics, molecular dynamics, and Monte Carlo simulations. *Reviews in Computational Chemistry*, Volume 14. 2000;p. 441–486.
- [128] Li P, Merz Jr KM. Metal ion modeling using classical mechanics. *Chemical reviews*. 2017;117(3):1564–1686.
- [129] Stone A. *The theory of intermolecular forces*. OUP Oxford; 2013.
- [130] Young D. *Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems*. John Wiley & Sons; 2004.
- [131] Jensen F. *Introduction to computational chemistry*. John wiley & sons; 2017.
- [132] Tee LS, Gotoh S, Stewart WE. Molecular parameters for normal fluids. Lennard-Jones 12-6 Potential. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*. 1966;5(3):356–363.
- [133] Duboue-Dijon E, Laage D. Characterization of the local structure in liquid water by various order parameters. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2015;119(26):8406–8418.
- [134] Luty BA, Davis ME, Tironi IG, Van Gunsteren WF. A comparison of particle-particle, particle-mesh and Ewald methods for calculating electrostatic interactions in periodic molecular systems. *Molecular Simulation*. 1994;14(1):11–20.
- [135] Wells BA, Chaffee AL. Ewald summation for molecular simulations. *Journal of chemical theory and computation*. 2015;11(8):3684–3695.
- [136] Hirshman SP, Whitson J. Steepest-descent moment method for three-dimensional magnetohydrodynamic equilibria. *The Physics of fluids*. 1983;26(12):3553–3568.

- [137] Fisher CL, Roberts VA, Hagler AT. Influence of environment on the antifolate drug trimethoprim: energy minimization studies. *Biochemistry*. 1991;30(14):3518–3526.
- [138] Specht KM, Nam J, Ho DM, Berova N, Kondru RK, Beratan DN, et al. Determining absolute configuration in flexible molecules: a case study. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123(37):8961–8966.
- [139] Nosé S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular physics*. 1984;52(2):255–268.
- [140] Reinhardt A, Doye JP. Effects of surface interactions on heterogeneous ice nucleation for a monatomic water model. *The Journal of chemical physics*. 2014;141(8):084501.
- [141] Leimkuhler B, Matthews C. *MOLECULAR DYNAMICS*. Springer; 2016.
- [142] Swope WC, Andersen HC, Berens PH, Wilson KR. A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *The Journal of Chemical Physics*. 1982;76(1):637–649.
- [143] Hockney R, Goel S, Eastwood J. Quiet high-resolution computer models of a plasma. *Journal of Computational Physics*. 1974;14(2):148–158.
- [144] Pall S, Abraham MJ, Kutzner C, Hess B, Lindahl E. Tackling exascale software challenges in molecular dynamics simulations with GROMACS. In: *International Conference on Exascale Applications and Software*. Springer; 2014. p. 3–27.
- [145] Schlecht MF. *Molecular Modeling on the PC with 3.5 Disk*. John Wiley & Sons, Inc.; 1998.
- [146] Czarnecki MA, Morisawa Y, Futami Y, Ozaki Y. Advances in molecular structure and interaction studies using near-infrared spectroscopy. *Chemical reviews*. 2015;115(18):9707–9744.
- [147] Berendsen H. Transport properties computed by linear response through weak coupling to a bath. In: *Computer Simulation in Materials Science*. Springer; 1991. p. 139–155.

- [148] Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*. 2007;126(1):014101.
- [149] Pope S, Riddoch D. Processing, on multiple processors, data flows received through a single socket. *Google Patents*; 2016. US Patent 9,304,825.
- [150] Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation*. 2008;4(3):435–447.
- [151] Huang SY. Comprehensive assessment of flexible-ligand docking algorithms: current effectiveness and challenges. *Briefings in Bioinformatics*. 2017;p. bbx030.
- [152] Atkovska K, Samsonov SA, Paszkowski-Rogacz M, Pisabarro MT. Multipose binding in molecular docking. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(2):2622–2645.
- [153] Duhovny D, Nussinov R, Wolfson HJ. Efficient unbound docking of rigid molecules. *Lecture notes in computer science*. 2002;2452:185–200.
- [154] Audie J, Swanson J. Advances in the Prediction of Protein–Peptide Binding Affinities: Implications for Peptide-Based Drug Discovery. *Chemical biology & drug design*. 2013;81(1):50–60.
- [155] Reva BA, Finkelstein AV, Skolnick J. What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å? *Folding and Design*. 1998;3(2):141–147.
- [156] Kukol A. *Molecular modeling of proteins*. vol. 443. Springer; 2008.
- [157] Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, et al. Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ , ψ and $C\beta$ deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2003;50(3):437–450.
- [158] Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1:19–25.

- [159] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*. 2004;25(13):1605–1612.
- [160] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*. 1996;14(1):33–38.
- [161] Schaftenaar G, Noordik JH. Molden: a pre-and post-processing program for molecular and electronic structures. *Journal of computer-aided molecular design*. 2000;14(2):123–134.
- [162] Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic acids research*. 2005;33(suppl_2):W363–W367.
- [163] Mashiach E, Schneidman-Duhovny D, Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic acids research*. 2008;36(suppl_2):W229–W232.
- [164] Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2007;69(1):139–159.
- [165] Wang CK, Kaas Q, Chiche L, Craik DJ. CyBase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. *Nucleic acids research*. 2007;36(suppl_1):D206–D210.
- [166] Mulvenna JP, Wang C, Craik DJ. CyBase: a database of cyclic protein sequence and structure. *Nucleic acids research*. 2006;34(suppl_1):D192–D194.
- [167] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank, 1999–. In: *International Tables for Crystallography Volume F: Crystallography of biological macromolecules*. Springer; 2006. p. 675–684.
- [168] Xiao Y, Ma B, McElheny D, Parthasarathy S, Long F, Hoshi M, et al. A [beta](1-42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nature structural & molecular biology*. 2015;22(6):499–505.

- [169] Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, Nielsen JE, Jensen JH, Klebe G, et al. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic acids research*. 2007;35(suppl_2):W522–W525.
- [170] Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(18):10037–10041.

