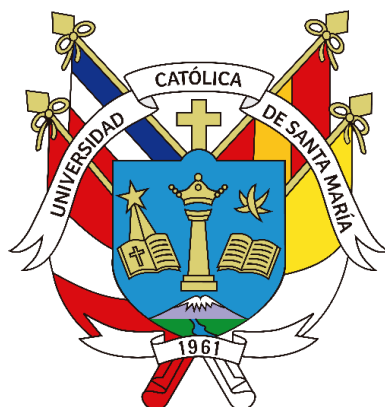


**Universidad Católica de Santa María**  
**Escuela de Postgrado**  
**Maestría en Bioquímica y Biología Molecular**



**Análisis por simulación de dinámica molecular de la inhibición de la enzima topoisomerasa 1 humana (TOP1) por metabolitos presentes en la pulpa de *Annona cherimola*.**

Tesis presentada por el Bachiller:

**Muñoz Salas, Carlos Francisco**

**ORCID: 0009-0002-1667-9866**

para optar el Grado Académico de Maestro en Bioquímica y Biología Molecular

Asesor:

**Dr. Gómez Valdez, Badhin**

**ORCID: 0000-0001-6539-1207**

**Arequipa- Perú**

**2024**

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS**

Arequipa, 17 de Julio del 2024

**Dictamen: 010137-C-EPG-2024**

Visto el borrador del expediente 010137, presentado por:

**2022002851 - MUÑOZ SALAS CARLOS FRANCISCO**

Titulado:

**ANÁLISIS POR SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  
TOPOISOMERASA 1 HUMANA (TOP1) POR METABOLITOS PRESENTES EN LA PULPA DE ANNONA  
CHERIMOLA.**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**41404327 - BARREDA DEL CARPIO JAIME ERNESTO  
DICTAMINADOR**



**42671615 - CARPIO CARPIO JOSE MIGUEL  
DICTAMINADOR**



**44361522 - BARAZORDA CCAHUANA HARUNA LUZ  
DICTAMINADOR**



# Análisis por simulación de dinámica molecular de la inhibición de la enzima topoisomerasa 1 humana (TOP1) por metabolitos presentes en la pulpa de Annona cherimola.

## INFORME DE ORIGINALIDAD

9%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://sedici.unlp.edu.ar">sedici.unlp.edu.ar</a> Fuente de Internet	1%
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
3	<a href="http://www.gromacs.org">www.gromacs.org</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://www.coursehero.com">www.coursehero.com</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://rashmikumari.github.io">rashmikumari.github.io</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://revistabiociencias.uan.edu.mx">revistabiociencias.uan.edu.mx</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://repositorio.unal.edu.co">repositorio.unal.edu.co</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%

## DEDICATORIA

*Dedicado a la gran cantidad de personas que han hecho este trabajo y este sueño posible.*



## AGRADECIMIENTOS

Gracias Señor Jesús, por permitirme cursar esta maestría, terminarla y sostenerme durante cada minuto de su duración. Toda la gloria es para Ti.

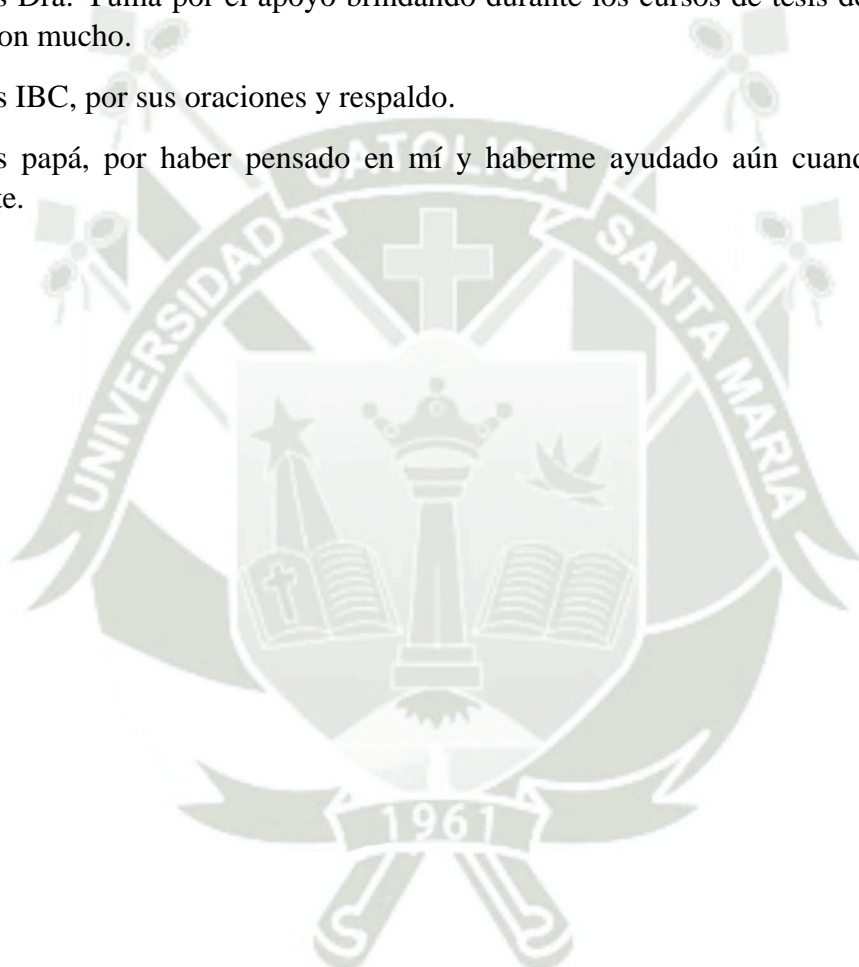
Gracias familia, su paciencia y consejos me empujaron hasta acá.

Gracias Dr. Badhin por aceptarme dentro del CIIM cuando más necesitaba un lugar donde realizar este proyecto, además del tiempo invertido en la asesoría. He aprendido mucho en un área que siempre fue difícil para mí.

Gracias Dra. Yuma por el apoyo brindando durante los cursos de tesis de la maestría. Me ayudaron mucho.

Gracias IBC, por sus oraciones y respaldo.

Gracias papá, por haber pensado en mí y haberme ayudado aún cuando ya no estabas presente.

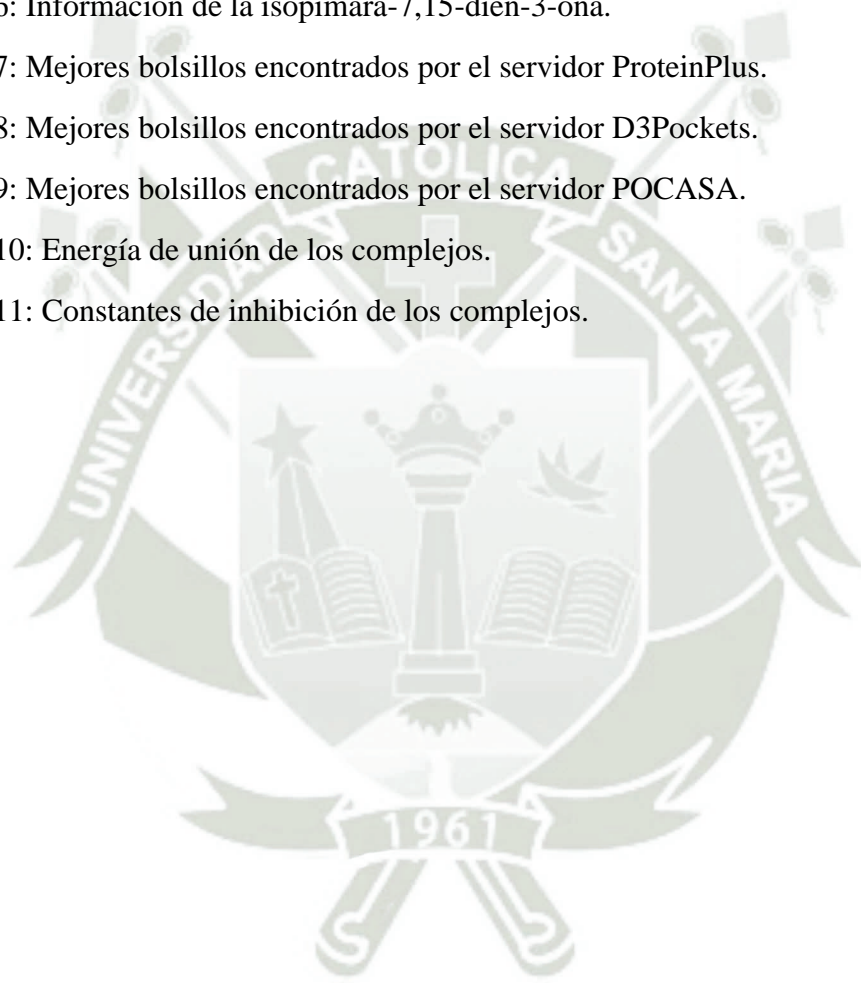


## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
<i>Familia Annonaceae</i>	4
<i>Replicación del ADN</i>	9
<i>Inhibición enzimática</i>	12
<i>Herramientas bioinformáticas</i>	13
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	21
<i>Métodos</i>	21
<i>Búsqueda de estructuras</i>	21
<i>Generación de estructuras equilibradas</i>	21
<i>Búsqueda de bolsillos</i>	22
<i>Docking Molecular</i>	22
<i>Análisis de estructuras acopladas</i>	22
<i>Análisis MM-PBSA</i>	23
<i>Workstation</i>	23
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
<i>Estructuras equilibradas generadas</i>	24
<i>Bolsillos drugables encontrados</i>	28
<i>Docking Molecular</i>	44
<i>Dinámica Molecular de los complejos</i>	47
<i>Interacciones Proteína-Ligando</i>	59
<i>Análisis MM-PBSA</i>	62
CONCLUSIONES	64
RECOMENDACIONES	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía de <i>Annona cherimola</i> .	5
Tabla 2: Parámetros de cultivo de <i>Annona cherimola</i> .	5
Tabla 3: Información del kauran-15-ol.	7
Tabla 4: Información del ácido gumiferólico.	7
Tabla 5: Información del kauran-16-ol.	8
Tabla 6: Información de la isopimara-7,15-dien-3-ona.	9
Tabla 7: Mejores bolsillos encontrados por el servidor ProteinPlus.	42
Tabla 8: Mejores bolsillos encontrados por el servidor D3Pockets.	43
Tabla 9: Mejores bolsillos encontrados por el servidor POCASA.	43
Tabla 10: Energía de unión de los complejos.	62
Tabla 11: Constantes de inhibición de los complejos.	63



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del kauran-15-ol.	7
Figura 2: Estructura del ácido gumiferólico.	8
Figura 3: Estructura del kauran-16-ol	8
Figura 4: Estructura de la isopimara-7,15-dien-3-ona.	9
Figura 5: Dominio de TOP1Hs y estructura cristalizada PDB 1K4T.	12
Figura 6: Energía libre de unión.	17
Figura 7: Cálculo de energía libre de unión $\Delta G_{\text{bind,solv}}$ .	17
Figura 8: Estructura PDB:1EJ9 que muestra el complejo hTOP1-DNA	24
Figura 9: Estructura final de TOP1.	25
Figura 10: RMSD de la estructura final.	26
Figura 11: RMSF por residuos de la estructura final.	26
Figura 12: Radio de giro de la estructura final.	27
Figura 13: Estructuras finales de los ligandos: a) Ácido Gumiferólico. b) Isopimara -7,15-dien-3-ona. c) Kauran-15-ol y d) Kauran-16-ol.	28
Figura 14: Bolsillo 1 (P_0) generado por ProteinPlus.	29
Figura 15: Bolsillo 2 (P_1) generado por ProteinPlus.	30
Figura 16: Bolsillo 3 (P_2) generado por ProteinPlus.	31
Figura 17: Bolsillo 4 (P_3) generado por ProteinPlus.	32
Figura 18: Bolsillo 5 (P_4) generado por ProteinPlus.	33
Figura 19: Bolsillo 1 (1) generado por D3Pockets.	34
Figura 20: Bolsillo 2 (2) generado por D3Pockets.	35
Figura 21: Bolsillo 3 (4) generado por D3Pockets.	36
Figura 22: Bolsillo 4 (7) generado por D3Pockets.	37
Figura 23: Bolsillo 5 (3) generado por D3Pockets.	38
Figura 24: Bolsillos generados por el servidor POCASA.	39
Figura 25: Bolsillo 1 (54) generado por el servidor POCASA.	40
Figura 26: Bolsillo 2 (217) generado por el servidor POCASA.	40
Figura 27: Bolsillo 3 (183) generado por el servidor POCASA.	41
Figura 28: Bolsillo 4 (515) generado por el servidor POCASA.	41

Figura 29: Bolsillo 5 (237) generado por el servidor POCASA.	42
Figura 30: Complejo 1EJ9-Ácido Gumiferólico (morado) generado por AutoDock Vina.	44
Figura 31: Complejo 1EJ9-Isopimara-7,15-dien-3-ona (morado) generado por AutoDock Vina.	45
Figura 32: Complejo 1EJ9-Kauran-15-ol (morado) generado por AutoDock Vina.	46
Figura 33: Complejo 1EJ9-Kauran-16-ol (morado) generado por AutoDock Vina.	46
Figura 34: RMSD del complejo 1EJ9-GUM.	47
Figura 35: RMS del complejo 1EJ9-GUM.	47
Figura 36: Radio de giro del complejo 1EJ9-GUM.	48
Figura 37: Diagrama de Ramachandran del complejo 1EJ9-GUM.	49
Figura 38: Complejo 1EJ9-GUM después de la simulación de MD.	49
Figura 39: RMSD del complejo 1EJ9-ISO.	50
Figura 40: RMS del complejo 1EJ9-ISO.	50
Figura 41: Radio de giro del complejo 1EJ9-ISO.	51
Figura 42: Ploteo de Ramachandran del complejo 1EJ9-ISO.	52
Figura 43: Complejo 1EJ9-ISO después de la simulación de MD.	52
Figura 44: RMSD del complejo 1EJ9-K15.	53
Figura 45: RMS del complejo 1EJ9-K15.	53
Figura 46: Radio de giro del complejo 1EJ9-K15.	54
Figura 47: Ploteo de Ramachandran del complejo 1EJ9-K15.	55
Figura 48: Complejo 1EJ9-K15 después de la simulación de MD.	55
Figura 49: RMSD del complejo 1EJ9-K16.	56
Figura 50: RMS del complejo 1EJ9-K16	56
Figura 51: Radio de giro del complejo 1EJ9-K16.	57
Figura 52: Ploteo de Ramachandran del complejo 1EJ9-K16.	58
Figura 53: Complejo 1EJ9-K16 después de la simulación de MD.	58
Figura 54: Mapa de interacciones del complejo 1EJ9-GUM.	59
Figura 55: Mapa de interacciones del complejo 1EJ9-ISO.	60
Figura 56: Mapa de interacciones del complejo 1EJ9-K15.	61
Figura 57: Mapa de interacción del complejo 1EJ9-K16.	62

## RESUMEN

La familia *Annonaceae* comprende 108 géneros y más de 2400 especies; esta familia parece haberse originado en los Andes Americanos en Perú y Ecuador, sin embargo, se reconocen especies de esta familia en diferentes zonas tropicales de Africa y Asia. Las especies del género *Annona* se usan en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades, estas especies muestran un abanico de compuestos bioactivos que incluyen acetogeninas, flavonoides, alcaloides, esteroides y péptidos; mientras que diversos estudios han probado que este género presenta actividad biológica como: antitumoral, antioxidante, antimicrobiana y antifúngica. *Annona cherimola*, conocida tradicionalmente como chirimoya, es una fruta exótica de este género consumida en Sudamérica. La actividad anti-topoisomerasa del extracto de pulpa de esta fruta se asocia con presencia de cuatro diterpenoides de la familia de los kauranos: ácido gumiferólico (GUM), isopimara-7,15-dien-3-ona (ISO), kauran-15-ol (K15) y kauran-16-ol (K16). Debido a que la topoisomerasa 1 humana (TOP1) es un blanco terapéutico para quimioterapia, es importante conocer el mecanismo de inhibición de esta enzima por parte de estos compuestos. Para este fin se utilizaron herramientas bioinformáticas para generar modelos moleculares de TOP1, GUM, ISO, K15 y K16. Estos modelos fueron sometidos a simulación de dinámica molecular (MD) y mecánica molecular (MM) para prepararlos para el docking molecular correspondiente. Los complejos generados fueron sometidos a simulación MD y analizados mediante GROMACS, LigPlot+ y el método MM-PBSA. El complejo GUM-1EJ9 mostró la mayor energía de interacción, así como la mayor constante de inhibición, además de interacciones con aminoácidos del centro activo de la enzima, por lo que GUM podría actuar como un inhibidor competitivo de la enzima TOP1.

### PALABRAS CLAVE

*Annona cherimola*, Topoisomerasa 1 humana, ácido gumiferólico, bioinformática, inhibición enzimática.

## ABSTRACT

The *Annonaceae* plant family includes 108 genres and more than 2400 species, this family probably has its origins in the South American Andes in Peru and Ecuador, however, multiple species of this family are recognized in tropical areas of Africa and Asia. The species of the *Annona* genre are used in traditional medicine for treating a number of illnesses, these species show a variety of bioactive compounds including acetogenins, flavonoids, alkaloids, steroids and peptides; previous research have provided evidence that this genre shows biological activity like antitumor, antioxidant, antimicrobial and antifungal. *Annona cherimola*, known as custard apple, is an exotic fruit consumed in South America. Anti-topoisomerase activity in pulp extracts from this fruit is associated with the presence of four diterpenoids from kauran family: gumiferolic acid (GUM), isopimara-7,15-dien-3-one (ISO), kauran-15-ol (K15) and kauran-16-ol (K16). Human topoisomerase 1 is a therapeutic target in chemotherapy, so its important to know the inhibition mechanism for this enzyme when attacked by these compounds. Bioinformatics tools were used to generate molecular models for TOP1, GUM, ISO, K15 and K16. These models were put into molecular dynamics (MD) and molecular mechanics (MM) simulations in preparation for molecular docking. The generated complex was again put into MD simulation and analyzed using GROMACS, LigPlot+ and the MM-PBSA method. GUM-1EJ9 complex showed the highest binding energy and the higher inhibition constant among the four ligands; furthermore, the complex showed hydrophobic interactions with amino acid residues from the enzyme catalytic center, so GUM is suggested as a competitive inhibitor of TOP1.

## KEYWORDS

*Annona cherimola*, Human topoisomerase 1, gumiferolic acid, bioinformatics, enzyme inhibition.

## INTRODUCCIÓN

La utilización de remedios naturales para el tratamiento de enfermedades se remonta hasta los inicios de la humanidad. Se conoce que las especies de la familia *Annonaceae* se han usado en medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades; relacionándose su efectividad con la presencia de un abanico de compuestos bioactivos.

La *Annona cherimola* conocida popularmente como chirimoya también presenta gran cantidad de compuestos como fenoles, alcaloides, diterpenos, etc. En diversas partes de la planta. En el extracto proveniente de la pulpa del fruto se han encontrado cuatro diterpenoides de la familia de los kauranos con actividad antitopoisomerasa, causante de cierta citotoxicidad frente a líneas celulares de cáncer humanas. Estos cuatro compuestos que son: el kauran-15-ol, el kauran-16-ol, el ácido gumiferólico y la isopimara-7,15-dien-3-ona; los cuales si bien demuestran actividad frente a la enzima topoisomerasa 1 humana (TOP1); el mecanismo de dicha inhibición es desconocido. Se sabe que la enzima TOP1 puede ser inhibida por venenos que impiden la liberación del ADN unido a la enzima e inhibidores competitivos que impiden la unión de este a la enzima. Conocer el mecanismo de inhibición generado por estos ligandos nos ayudaría a tener una mejor aproximación hacia el desarrollo de potenciales fármacos basados en alguno de estos ligandos,

Para poder develar los posibles mecanismos de inhibición se pueden utilizar herramientas bioinformáticas; usando diferentes paquetes para someter los modelos moleculares tanto de TOP1 como de los kauranos a simulaciones de dinámica molecular, mecánica molecular y *docking* molecular para así poder encontrar los complejos enzima-ligando más estables. Estos complejos deben ser sometidos nuevamente a una simulación de dinámica molecular para ser analizados en los parámetros de radio de giro, RMSD, RSMF, ploteo de Ramachandran y la energía libre de unión por el método MM-PBSA, valor a partir del cual es posible obtener una constante de inhibición para cada ligando.

El objetivo de esta investigación es analizar por simulación de dinámica molecular la interacción entre el kauran-15-ol, kauran-16-ol, ácido gumiferólico, isopimara-7,15-dien-3-ona, la enzima topoisomerasa 1 (TOP1).

## HIPÓTESIS

Mediante el uso de métodos de biología computacional, es factible determinar la naturaleza de las interacciones presentes entre la Topoisomerasa 1 humana y metabolitos secundarios (kauran-15-ol, kauran-16-ol, isopimara-7,15-dien-3-ona y ácido gumiferólico) presentes en la *Annona cherimola*.



## OBJETIVOS

### Objetivo general

Analizar por simulación de dinámica molecular la interacción entre el kauran-15-ol, kauran-16-ol, ácido gumíferólico, isopimara-7,15-dien-3-ona, la enzima topoisomerasa 1 (TOP1).

### Objetivos específicos

1. Generar modelos moleculares de TOP1, kauran-15-ol, kauran-16-ol, ácido gumíferólico y isopimara-7,15-dien-3-ona.
2. Determinar las estructuras de equilibrio de los sistemas TOP1, kauran-15-ol, kauran-16-ol, ácido gumíferólico y isopimara-7,15-dien-3-ona.
3. Localizar los sitios drugables “*pockets*” de TOP1.
4. Encontrar un posible mecanismo de acción de la inhibición de TOP1 en la interacción de TOP1 con los ligandos kauran-15-ol, kauran-16-ol, ácido gumíferólico y isopimara-7,15-dien-3-ona.

## CAPÍTULO I.

### MARCO TEORICO

#### 1.1 FAMILIA ANNONACEAE

La familia *Annonaceae* comprende 108 géneros y más de 2400 especies; esta familia parece haberse originado en los Andes Americanos en Perú y Ecuador, sin embargo, se reconocen especies de esta familia en diferentes zonas tropicales de Africa y Asia. Las especies de esta familia se desarrollan en condiciones geográficas de humedad, temperaturas, suelo y altitud. Las especies comerciales más representativas de esta familia pertenecen al género *Annona*, siendo las más interesantes *Annona squamosa*, *Annona muricata*, *Annona cherimola* y el híbrido *Annona squamosa* x *Annona cherimola*. (1) (3) (87)

Las especies del género *Annona* se usan en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades, estas especies muestran un abanico de compuestos bioactivos que incluyen acetogeninas, flavonoides, alcaloides, esteroides y péptidos; mientras que diversos estudios han probado actividades biológicas como: antitumoral, antioxidante, antimicrobiana y antifúngica. (43)(42)(40)

#### 2.1.1 ANNONA CHERIMOLA

##### 2.1.1.1 GENERALIDADES

*Annona cherimola*, conocida tradicionalmente como chirimoya, es una fruta exótica de este género, la cual es consumida en Sudamérica (42). Es también la más comercializada y explotada de este género. (1)

Los frutos de *Annona cherimola* son carnosos y contienen numerosas semillas, tienen forma cónica o de corazón con pulpa blanca jugosa y dulce; cubierto por una cáscara dura. El peso del fruto está en un rango de 200-700 g y su longitud entre 7.5-12.5 cm. La pulpa además presenta un sabor algo ácido y un olor similar al de la piña o el plátano. (42)

En el Perú, el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, reporta una producción de 23,451 miles de toneladas de chirimoya entre enero y diciembre del 2022, esto supone un incremento respecto al año 2021. (2)

Tabla 1: Taxonomía de *Annona cherimola*.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Subfamilia	Annonoideae
Tribu	Annoneai
Género	Annona
Especie	A. cherimola

Los parámetros de cultivo asumidos para *Annona cherimola* se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Parámetros de cultivo de *Annona cherimola*.

Parámetro	Valor
Tiempo mínimo de crecimiento	240 días
Tiempo máximo de crecimiento	270 días
Temperatura de muerte	1 °C
Temperatura mínima (sin daños)	7 °C
Temperatura mínima óptima	17 °C
Temperatura máxima óptima	25 °C
Temperatura máxima (sin daños)	32 °C
Precipitación mínima	600 mm
Precipitación mínima óptima	800 mm
Precipitación máxima óptima	1200 mm
Precipitación máxima	2200 mm

**Fuente:** Extraído de Rodríguez-Núñez JR, Campos-Rojas E, Andrés-Agustín J, Alia-Tejagal I, Ortega-Acosta SA, Peña-Caballero V, et al. Distribution, eco-climatic characterization, and potential growing regions of *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae) in Mexico. *Ethnobiology and Conservation*. 1 de enero de 2021 ;10.

### 2.1.1.2 DISTRIBUCIÓN

Debido a su probable origen andino, la *Annona cherimola* se encuentra principalmente en Perú y Ecuador en el continente americano (42). Sin embargo, la similitud en climas en algunas regiones del continente hace que pueda ser adaptada a otras zonas como América

Central y México. (3) En Perú, las regiones productoras más representativas son: Cajamarca, Lima y Ayacucho, sin embargo, el comercio y consumo se extiende a todas las regiones, en especial Cusco, Lambayeque y La Libertad.

*Annona cherimola* es la única especie de este género que es apropiada para su cultivo en climas subtropicales o montañas tropicales. El cultivo de la chirimoya se ha extendido a regiones mediterráneas en donde no se producen heladas y fue introducida a España entre el siglo dieciséis y dieciocho. La distribución de la chirimoya en las regiones mediterráneas se extiende a Portugal, España, Italia, Islas Canarias, Argelia y Egipto; sin embargo, ha llegado a introducirse incluso en Libia, Eritrea y Somalia. También se ha extendido a las regiones tropicales de Asia incluyendo Singapur, India y Tailandia. (42)

### **2.1.1.3 PROPIEDADES BIOACTIVAS**

La *Annona cherimola* presenta una serie de propiedades bioactivas como actividad antioxidante, capacidad de inhibición enzimática y actividad antiagregación plaquetaria.

Se han evaluado metabolitos no solamente del fruto, sino también de hojas, tallos y raíces; en busca de compuestos bioactivos de interés, es así que distintos reportes indican la presencia de una gama de compuestos que van desde alcaloides, compuestos fenólicos, acetogeninas, diterpenos, entre otros que serían responsables de la actividad antioxidante y antitumoral exhibida en algunos extractos. Estos extractos han sido estudiados frente a diversas líneas celulares de cáncer humano, mostrando su capacidad para frenar su proliferación, sin embargo, no se conoce un mecanismo exacto por el que se observa esta actividad. (37)(36)(49)(54)

### **2.1.2 KAURANOS PRESENTES EN ANNONA CHERIMOLA**

Se ha probado la actividad anti-topoisomerasa de los extractos de *Annona cherimola* encontrando que la enzima topoisomerasa I era inhibida en un 22% en células mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, el análisis por GC-MS reveló la presencia de 4 diterpenoides en el extracto; el kauran-15-ol, el kauran-16-ol, la isopimara-7,15-dien-3-ona y el ácido gumiferólico. (40)

Se ha reportado que estos diterpenoides presentan baja citotoxicidad en células humanas de cáncer, participación en procesos antiinflamatorios y reducción de daño hepático. (40)

Estructuralmente estos compuestos se caracterizan por la presencia de 3 anillos y un enlace “puente” entre 2 carbonos de uno de los anillos. (44)

### 2.1.2.1 KAURAN-15-OL

Tabla 3: Información del kauran-15-ol.

<b>Nombre IUPAC</b>	(1 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,15 <i>S</i> )-5,5,9,14-tetramethyltetracyclo[11.2.1.0 <sup>1,10</sup> .0 <sup>4,9</sup> ]hexadecan-15-ol
<b>PubChem CID</b>	101629837
<b>Peso molecular</b>	290.5 g/mol
<b>Formula molecular</b>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O
<b>Número de donador de enlaces H</b>	1
<b>Número de receptor de enlaces H</b>	1
<b>Reportes previos</b>	No se encontraron reportes previos.

Fuente: PubChem.

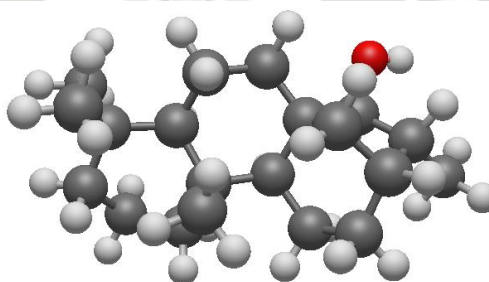


Figura 1: Estructura del kauran-15-ol. Fuente: PubChem.

### 2.1.2.2 ÁCIDO GUMIFERÓLICO

Tabla 4: Información del ácido gumiferólico.

<b>Nombre IUPAC</b>	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>S</i> )-5,9-dimethyl-2-[( <i>Z</i> )-2-methylbut-2-enoyl]oxy-13-methylidenetetracyclo[10.2.2.0 <sup>1,10</sup> .10.0 <sup>4,9</sup> ]hexadecane-5-carboxylic acid
<b>PubChem CID</b>	101316950
<b>Peso molecular</b>	400.5 g/mol
<b>Formula molecular</b>	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>
<b>Número de donador de enlaces H</b>	1
<b>Número de receptor de enlaces H</b>	4
<b>Reportes previos</b>	No se encontraron reportes previos.

Fuente: PubChem.

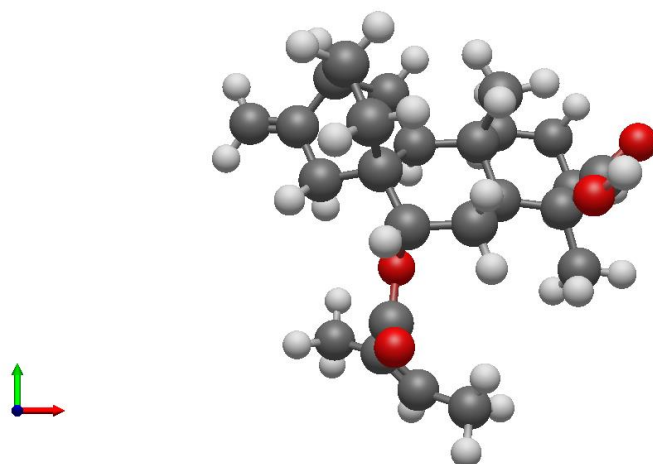


Figura 2: Estructura del Ac gumiferólico. Fuente: PubChem.

### 2.1.2.3 KAURAN-16-OL

Tabla 5: Información del kauran-16-ol.

<b>Nombre IUPAC</b>	5,5,9,14-tetramethyltetracyclo[11.2.1.0 <sup>1,10</sup> .0 <sup>4,9</sup> ]hexadecan-14-ol
<b>PubChem CID</b>	623309
<b>Peso molecular</b>	290.5 g/mol
<b>Formula molecular</b>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O
<b>Número de donador de enlaces H</b>	1
<b>Número de receptor de enlaces H</b>	1
<b>Reportes previos</b>	Estudios lipidómicos.

Fuente: PubChem

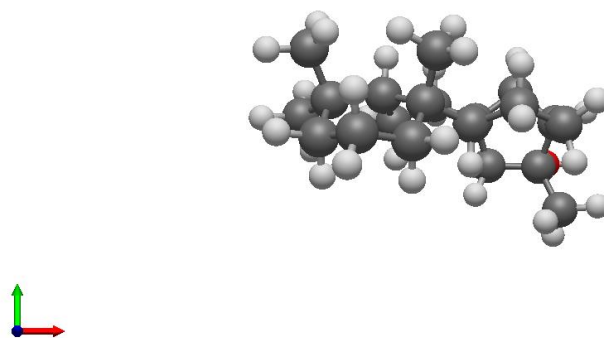


Figura 3: Estructura del kauran-16-ol. Fuente: PubChem.

#### 2.1.2.4 ISOPIMARA-7,15-DIEN-3-ONA

Tabla 6: Información de la isopimara-7,15-dien-3-ona.

<b>Nombre IUPAC</b>	(4aR,4bS,7S,10aR)-7-ethenyl-1,1,4a,7-tetramethyl-3,4,4b,5,6,8,10,10a-octahydrophenanthren-2-one
<b>PubChem CID</b>	15541536
<b>Peso molecular</b>	286.5 g/mol
<b>Formula molecular</b>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O
<b>Número de donador de enlaces H</b>	0
<b>Número de receptor de enlaces H</b>	1
<b>Reportes previos</b>	Actividad antitumoral, antioxidante, antifúngica y antiinflamatoria.

Fuente: PubChem.

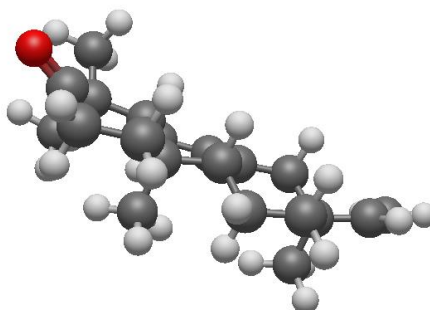


Figura 4: Estructura del isopimara-7,15-dien-3-ona. Fuente: PubChem.

Estos compuestos nunca han sido evaluados frente a la enzima TOP1 y se desconoce el posible mecanismo de inhibición, se puede sugerir una inhibición alostérica como en el caso de la pinostrobin, sin embargo, se debe conocer los mecanismos exactos para el screening de mejores compuestos para esta tarea, ya que TOP1 es un objetivo importante en quimioterapias.

## 2.2 REPLICACION DEL ADN

### 2.2.1 CICLO CELULAR

Las etapas por las que pasa una célula en general desde su origen mediante una división celular hasta la siguiente división para formar dos células hijas se conoce colectivamente como ciclo celular. La mayor parte de la vida celular se invierte en la interfase, el tiempo cuando no ocurre la división celular. Una célula se mantiene activa metabólicamente durante la interfase, sintetizando materiales necesarios (proteínas, lípidos, y otras moléculas biológicamente importantes) y creciendo. Al tiempo entre el fin de la mitosis y el inicio de

la fase S se le llama fase G1 (G simboliza gap, un intervalo durante el que no ocurre síntesis de ADN). El crecimiento y el metabolismo normal suceden durante la fase G1, que típicamente es la fase más larga. Durante la fase de síntesis, o fase S, el ADN se replica y las proteínas histonas son sintetizadas para que la célula pueda hacer una copia de sus cromosomas. Después de completar la fase S, la célula entra a una segunda fase o intervalo, conocida como fase G2. Durante este tiempo, aumenta la síntesis de proteínas, conforme se dan los pasos finales en la preparación de la célula para la división. La fase M implica dos procesos principales, mitosis y citocinesis. La mitosis, corresponde a la división celular que produce dos núcleos con cromosomas idénticos a los del núcleo parental, e inicia al final de la fase G2. La citocinesis, generalmente comienza antes de que la mitosis termine, y corresponde a la división del citoplasma celular para formar dos células hijas. (30)

### **2.2.2 MECANISMOS MOLECULARES DE LA REPLICACIÓN DEL ADN**

Dentro del ciclo celular, la replicación del ADN es una etapa clave para la correcta reproducción de la célula. para cuidar la integridad genómica, se debe de preparar cuidadosamente esta etapa (4). Este proceso ocurre con mucha precisión ya que los fallos llevan a la replicación adicional de fragmentos del genoma y esto genera daño al ADN. Aunque esto normalmente lleva a la apoptosis si es que la célula es incapaz de reparar el daño, se sabe que estos desordenes de regulación de la replicación son factores críticos en el desarrollo del cáncer, sin embargo, se desconoce si es una causa mayor de este desarrollo (60).

La replicación se prepara durante la fase G1 y comienza en la fase S. Siendo promovida por una serie de mecanismos moleculares que permiten tanto la unión de las helicasas replicativas (fase G1) como la activación de estas para la formación de complejos de replicación (fase S) (4).

La replicación se inicia en sitios específicos llamados origen de replicación de ADN, la replicación eficiente en eucariotas requiere muchos orígenes activos por cromosoma. Algunas modificaciones en las histonas juegan un rol activo en la regulación de la cromatina respecto al licenciamiento de orígenes. En particular, la monometilación de la histona H4 lisina 20 (H4K20me1) promueve el licenciamiento de orígenes. La monometiltransferasa SETD8 (PR-Set7) cataliza H4K20me1. La subsecuente trimetilación de la histona H4K20, la cual usa H4K20me1 como sustrato, asegura que los orígenes tardíos se activen durante la fase S. El licenciamiento de orígenes de replicación involucra la acción secuencial de

factores de licenciamiento para la unión del núcleo de la helicasa replicativa, MCM, al ADN. El licenciamiento de orígenes de replicación empieza con el complejo de reconocimiento (ORC, un complejo de unión al ADN compuesto de 6 subunidades Orc1-6), el cual se une directamente a los orígenes de replicación. ORC trabaja con dos factores de unión de helicasas adicionales que son el *cell division cycle 6* (CDC6) y el *CDC10dependent transcript 1* (CDT1), para unir al menos dos hexameros de la helicasa replicativa MCM (complejo de mantenimiento del minicromosoma, seis subunidades MCM 2-7) (4)

Mientras la célula transiciona a la fase S, se activa CDK2 primeramente por la ciclina E (fase S temprana) y luego por la ciclina A (fase S media y tardía) para activar los orígenes de replicación. La acumulación de ciclina A es el resultado de la transcripción dependiente de E2F durante la preparación para la fase S en G1 y la inactivación durante la fase S temprana de APC/C, este complejo ubiquitina la ciclina A de una fase M anterior hasta el final de la fase G1. La activación de CDK y DDK es necesaria para que la replicación comience; CDK2 sirve como un punto de control, en donde se verifica la integridad del ADN y se permite el paso hacia la replicación propiamente dicha. La replicación del ADN debería completarse antes de una nueva fase M. La activación de los orígenes de replicación durante la fase S está regulada por la vía ATR-CHK1, el cual también previene una fase M prematura. (4)

### 2.2.3 TOPOISOMERASA I HUMANA

Las topoisomerasas son un grupo importante de enzimas encargadas de resolver problemas topológicos en todas las células en división. (34)

La topoisomerasa I (TOP 1) es capaz de remover el stress de torsión en las hélices de ADN con el fin de desenrollar las mismas para su replicación o transcripción. La TOP 1 humana pertenece a la familia de las topoisomerasas IB y tiene una longitud de 765 aminoácidos y se reconocen 4 dominios, el extremo N terminal, la región núcleo que está conformado por CAP y CAT, que son los centros catalíticos, un *linker* y el extremo C terminal. También se sabe que presenta acetilaciones y fosforilaciones, siendo importante una fosforilación en un residuo de tirosina en el extremo C-terminal, el cual ayuda a la actividad catalítica. (55)

La modulación del ADN super-enrollado es una función clave de la TOP 1, esta enzima rompe el enlace fosfodiéster en una cadena simple de ADN por un ataque nucleofílico en Tyr 723 y forma un complejo de corte en el cual el extremo 3' de la cadena de ADN rota, se une covalentemente a la enzima. (34)(35)

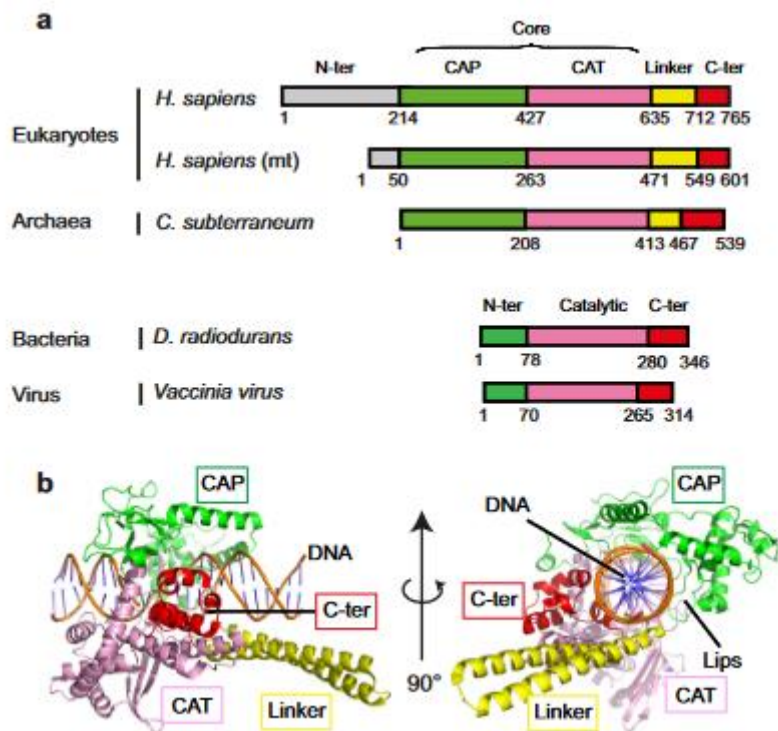


Figura 5: Dominio de TOP1Hs y estructura cristalizada PDB 1K4T. Extraído de Takahashi et al (2022)

### 2.3 INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Los modificadores o moduladores son compuestos que cambian la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Cuando el efecto reduce esta velocidad, se llama inhibición (5).

La inhibición se clasifica en dos grupos: Inhibición reversible e inhibición irreversible. Existen subgrupos dentro de esta clasificación; la inhibición reversible se divide en: Inhibición competitiva, inhibición no competitiva, inhibición mixta e inhibición acompetitiva. Mientras que la inhibición irreversible se divide en: inhibición basada en el mecanismo enzima-sustrato y en inhibición por agentes marcadores de afinidad. La principal diferencia entre los dos grupos principales radica en la unión covalente del inhibidor a la enzima. (5)

La inhibición competitiva se da cuando el inhibidor se une al sitio activo y compite con el sustrato, limitando así la conversión de este último. La inhibición no competitiva ocurre cuando un inhibidor se une a un sitio diferente que el sustrato de la enzima, pero aun así conduce a una inhibición de la actividad de la enzima; la enzima podría unirse tanto al sustrato como al inhibidor al mismo tiempo en un caso extremo. Este caso es raro y

normalmente ocurre la inhibición mixta en donde el inhibidor no competitivo impide la unión del sustrato. Mientras que la inhibición acompetitiva ocurrirá cuando el inhibidor solo pueda unirse al complejo enzima-sustrato (29).

Los inhibidores de TOP 1 pueden ser de dos tipos: venenos, que causan una inhibición acompetitiva y moléculas que impiden la unión TOP 1 – ADN al interactuar con cualquiera de estas. (34)(35)

La camptotecina es uno de los inhibidores de TOP 1 más estudiados, esta molécula se une al centro catalítico de la enzima e inhibe la reformación de la hélice de ADN y la disociación de TOP 1 del ADN, generando así la acumulación de complejo TOP 1 –ADN, lo cual termina en la muerte celular, preferentemente de células cancerígenas las cuales sobre expresan TOP 1. (34)

La pinostroquina un inhibidor alostérico de TOP 1, su mecanismo de inhibición consiste en la unión de este compuesto a la zona interior de la enzima a través de enlaces puente de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas. Este compuesto también interactúa con el ADN mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Esto genera cambios estructurales que impiden la unión de TOP 1 con el ADN, se cree que esto debido a la disminución del centro activo de la enzima. (35)

## 2.4 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

El desarrollo de las técnicas *in silico* ha permitido un avance en el descubrimiento de nuevos fármacos; debido al gran avance en las técnicas de secuenciamiento genómico, la cantidad de estructuras proteicas resueltas ha quedado rezagada, por lo que es necesario el uso de técnicas computacionales para llenar este vacío.

Los aminoácidos son los ladrillos que forman las proteínas y le confieren su estructura terciaria; por lo cual debería ser posible predecir la estructura tridimensional de una proteína conociendo su secuencia de aminoácidos. El modelamiento tiene varios enfoques, siendo los más usados el modelamiento por homología, modelamiento comparativo y el modelamiento *de novo*. Las estructuras resultantes de este modelamiento deben ser evaluadas para conocer la calidad del modelo y asegurar las propiedades estereoquímicas; la mayoría de software o servidores proveen de esta función, utilizando normalmente los ploteos de Ramachandran para graficar la calidad del modelo. (58)

La dinámica molecular es un enfoque computacional significativo al estudio de la estructura equilibrada, dinámica y las propiedades de transporte de las biomoléculas. Este enfoque puede dar información de los cambios y fluctuaciones conformacionales -dependientes del tiempo - en proteínas y otros sistemas; y es útil para entender sus funciones. Las simulaciones de dinámica molecular utilizan campos de fuerzas para ajustar las interacciones entre cada átomo y el resto del sistema; las simulaciones de dinámica molecular también permiten la adición de solventes y iones para generar condiciones neutras, así como la incorporación de barostatos y termostatos para el equilibrio de presión y temperatura. Este conjunto de condiciones se conoce como ensamble y deben ser escogidos según la naturaleza de la simulación. (59)

#### 2.4.1 GROMACS

GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) es un paquete bioinformático, desarrollado para realizar dinámica molecular, es decir, simular las ecuaciones de Newton del movimiento para millones de partículas. Siendo diseñado primariamente para moléculas bioquímicas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (7-14, 73, 74).

GROMACS utiliza diversos algoritmos durante la simulación de dinámica molecular, el integrador por defecto es el algoritmo *leap-frog*. GROMACS también incluye al algoritmo *velocity Verlet* para las simulaciones que no consideran presión y temperatura. GROMACS permite escoger distintos termostatos y baróstatos para realizar una simulación con cuplas de temperatura y presión. La electrostática *long-range* se maneja por el método *particle-mesh Ewald* (PME) (7-14, 73, 74).

GROMACS se desarrolló debido a la necesidad de un modelamiento eficiente, sin embargo, con el transcurso de los años y la contribución de muchos investigadores, GROMACS ha implementado una serie de características como: paralelización heterogénea y aceleración por GPU, simulaciones híbridas Quantum-Classical, aplicaciones de *Accelerated Weight Histogram* entre otros (7-14, 73, 74).

GROMACS implementa tres métodos para la minimización de energía, por defecto se utiliza el método *Steepest descent*, a pesar de no ser el algoritmo más eficiente, es robusto y fácil de implementar. El método *Conjugate gradient* es más lento en las primeras etapas, sin embargo, se vuelve más eficiente cerca de la energía mínima. El método L-BFGS converge

más rápido que los gradientes, sin embargo, debido a los pasos de corrección no ha podido ser paralelizado aún (7-14, 73, 74).

El ensamble NVT (número constante, volumen constante, temperatura constante) se conoce como el ensamble canónico y es muy usado en el cálculo de cantidades en dinámica molecular. GROMACS utiliza el esquema *weak coupling* de Berendsen, randomización estocástica a través del termostato de Andersen, el esquema del ensamble extendido Nosé-Hoover o el esquema *velocity-rescaling* (7-14, 73, 74).

De la misma manera, se puede aplicar un baño de presión, GROMACS brinda soporte al algoritmo de Berendsen que escala las coordenadas y vectores de caja en cada paso, un nuevo algoritmo estocástico de reescalado de caja, el ensamble extendido de Parrinello-Rahman y para las variantes *velocity* Verlet, la implementación MTTK de control de presión (7-14, 73, 74).

Un campo de fuerza se construye de dos componentes: un conjunto de ecuaciones para generar las energías potenciales y sus derivados, las fuerzas y los parámetros de este conjunto de ecuaciones. GROMACS admite una serie de campos de fuerza como GROMOS-96, AMBER, CHARMM, MARTINI, PLUM y OPLS/AA. Este último fue diseñado por Jorgensen et al. en el año 1996 para su uso con moléculas orgánicas y péptidos, considera todos los átomos del sistema y soporta el uso de diversos líquidos orgánicos (7-14, 73, 74).

GROMACS también incluye herramientas para el análisis de estructuras o trayectorias obtenidos. El comando *gmx gyrate* puede calcular el radio de giro total de una estructura y calcular el radio de giro en los tres ejes el plano, este valor nos indica la expansión o compresión de la estructura- El comando *gmx rmsf* calcula la fluctuación de la raíz media cuadrática (RMSF o desviación estándar) de los residuos aminoacídicos, este valor nos indica si las fluctuaciones o movimientos de una determinada región de la estructura proteica durante la simulación. El comando *gmx rsm* calcula la raíz de la desviación cuadrática (RMSD) comparando la estructura deseada con una estructura de referencia, este valor nos indica la estabilidad posicional de la estructura en conjunto durante la simulación (7-14, 73, 74).

### 2.4.2 GAUSSIAN 16

Gaussian 16 es la versión más reciente de una serie de programas Gaussian de estructura electrónica. Contiene una colección de herramientas que permiten el estudio químico de sustancias incluso a nivel complejo en hardware modesto. (21)(22)

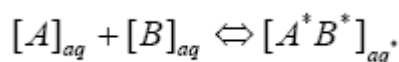
A partir de las leyes fundamentales de la mecánica cuántica Gaussian es capaz de predecir las energías, estructuras moleculares, frecuencias vibracionales y propiedades de los compuestos y reacciones en una variedad de ambientes químicos (21) (22).

### 2.4.3 AUTODOCK VINA

AutoDock Vina es un programa para *docking* molecular y *virtual screening*, es parte de la *suite* Autodock. Vina usa un sofisticado método de optimización de gradiente en su proceso de optimización local. El cálculo de la gradiente es capaz de darle un “sentido de dirección” al algoritmo de optimización a partir de una sola evaluación. Vina ha implementado la paralelización, por lo que puede acelerar los cálculos cuando dispone de múltiples núcleos y apoyo de GPU.

### 2.4.4 MMPBSA

El objetivo principal del método MM-PBSA (Molecular Mechanics – Poisson Boltzmann Surface Area) y su método complementario MM-GBSA es calcular la diferencia de energía libre entre dos estados que comúnmente representan los estados enlazado y no enlazado de dos moléculas solvatadas o alternativamente comparar las energías libres de dos diferentes conformaciones solvatadas de la misma molécula. (69)(70)(73).



Idealmente se podría calcular esta energía libre de unión de manera directa como se muestra en la figura 6: (69)(70) (73).

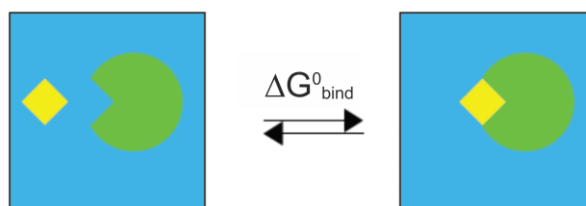


Figura 6: Energía libre de unión.

Sin embargo, en una simulación de estos estados de solvatación, la mayoría de las contribuciones energéticas vendría de interacciones solvente-solvente y las fluctuaciones en la energía total serían de un orden de magnitud superior a la energía de unión. De esta manera el cálculo tomaría una gran cantidad de tiempo para converger. Así, un método más efectivo es dividir el cálculo de acuerdo con el ciclo termodinámico mostrado en la figura: (69)(70) (73).

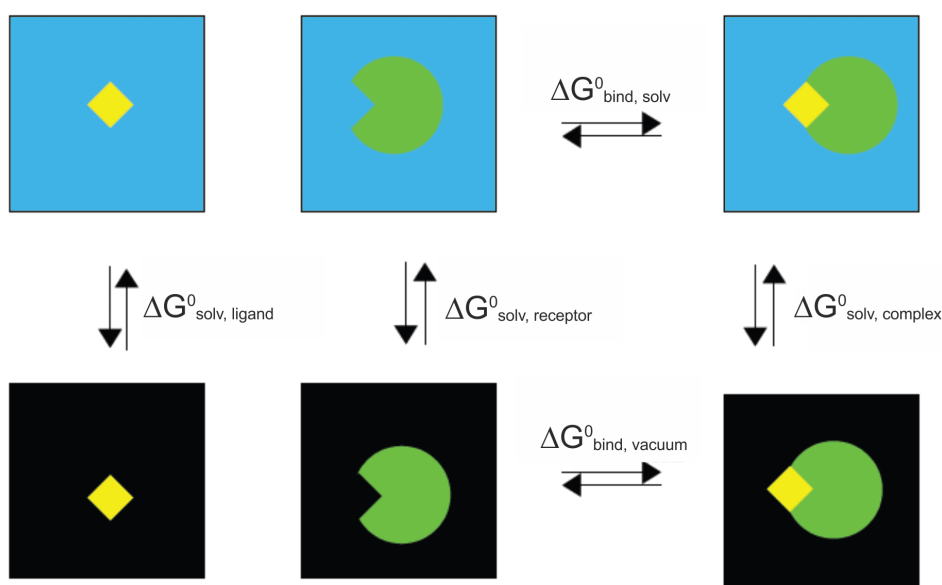


Figura 7: Cálculo de energía libre de unión  $\Delta G_{\text{bind, solv}}^0$ .

De acuerdo a lo mostrado en la figura 7, la energía libre de unión  $\Delta G_{\text{bind, solv}}^0$  puede ser calculada por:

$$\Delta G_{\text{bind, solv}}^0 = \Delta G_{\text{bind, vacuum}}^0 + \Delta G_{\text{solv, complex}}^0 - (\Delta G_{\text{solv, ligand}}^0 + \Delta G_{\text{solv, receptor}}^0)$$

Las energías libres de solvatación son calculadas ya sea por resolver la ecuación linealizada de Poisson Boltzmann o *Generalized Born* para cada uno de los tres estados (esto devuelve

la contribución electrostática a la energía libre de solvatación) y añadiendo un término empírico para las contribuciones hidrofóbicas:

$$\Delta G_{solv}^0 = G_{electrostatic, \epsilon=80}^0 - G_{electrostatic, \epsilon=1}^0 + \Delta G_{hydrophobic}^0$$

$\Delta G_{vacuum}$  se obtiene al calcular el promedio de energía de interacción entre el receptor y el ligando y tomando en cuenta el cambio de entropía al momento del enlace si es necesario o deseado. (69)(70) (73)

$$\Delta G_{vacuum}^0 = \Delta E_{molecular\ mechanics}^0 - T \cdot \Delta S_{normal\ mode\ analysis}^0$$

La contribución entrópica puede ser encontrada al realizar un análisis en modo normal de las tres especies, pero en la práctica las contribuciones entrópicas pueden ser obviadas si solo se desea una comparación de estados de similar entropía como es el caso de dos ligandos uniéndose a la misma proteína. La razón de esto es que los cálculos del análisis en modo normal son costosos computacionalmente y tienden a tener un margen de error grande que introduce una incertidumbre significativa en el resultado. (69)(70) (73)

El promedio de energías de interacción entre receptor y ligando son usualmente obtenidas al hacer cálculos sobre un ensamble de fotografías no correlacionadas, recolectadas de una simulación de dinámica molecular equilibrada. (MD) (69) (70) (73)

*g\_mmpbsa* se desarrolló usando dos softwares de fuente abierta (GROMACS y APBS) y tiene una interfaz similar a otras herramientas de GROMACS. La herramienta calcula los componentes de la energía de unión usando el método MM-PBSA exceptuando el término entrópico y la contribución energética de cada residuo al enlace usando el esquema de descomposición de energía. Los resultados de la herramienta se usaron como entrada en scripts de Python que son provistos en este paquete, para obtener la energía de unión final y la contribución energética de cada residuo. (64)

#### 2.4.5 PROTEINS PLUS

*ProteinsPlus* es una interfaz desarrollada para permitir la disponibilidad en web de herramientas computacionales, desarrolladas por el grupo de investigación AMD del Prof. Matthias Rarey, para diseño molecular basado en estructuras. La colección de herramientas

presentes en *Proteinsplus* permiten trabajar una estructura en formato PDB en una sola interfaz, solucionando la dificultad de tener que reunir muchas herramientas distintas.

DogSiteScorer es un algoritmo completamente automático para la predicción de bolsillos y drogabilidad. Además de considerar las propiedades globales de un bolsillo, también se reflejan las similitudes locales entre compartidas entre bolsillos. Los scores de drogabilidad se predicen a través de un *support vector machine* (SVM), entrenado y probado en el *druggability date set* (DD) y en su versión no redundante (NRDD). El DD consiste en 1069 dianas a las que se les ha asignado las clases: drugable, difícil y no drugable.

#### 2.4.6 D3POCKETS

D3Pockets es un programa y un servidor web desarrollado para detectar y analizar las propiedades dinámicas de bolsillos que se unen a ligandos en una proteína que es una diana de fármacos. No solamente detecta todos los sitios de unión de ligandos posibles en la superficie de la proteína basado en un archivo pdb, sino que también analiza las propiedades dinámicas de los bolsillos: *viz.*, estabilidad, continuidad y correlación basado en una trayectoria de dinámica molecular o un ensamble de conformación. (15)

El procedimiento de trabajo de D3Pockets consiste en los siguientes pasos: obtención de las conformaciones representadas a partir de las conformaciones agrupadas de las trayectorias de dinámica molecular. Luego, los bolsillos potenciales en diferentes conformaciones son detectados por el método KVFinder y LIGSITE. Finalmente, se calculan las propiedades dinámicas de los bolsillos (estabilidad, continuidad y correlación). (15)

#### 2.4.7 POCASA

POCASA es un servidor web para la búsqueda de bolsillos drugables que utiliza un algoritmo de búsqueda puramente geométrico llamado *Roll*. Este método utiliza los sistemas de mala y de sonda esférica. Primero, una malla tridimensional se llena con átomos en la molécula de proteína. Segundo, una sonda esférica se adapta para rodar sobre la superficie de la molécula para generar una “sonda de superficie” basado en el algoritmo de localización del borde interior en el campo del procesamiento de imagen. Entonces las regiones entre la proteína y la sonda de superficie o aquellas rodeadas por la superficie de la proteína son definidas como bolsillos y cavidades respectivamente. Para remover los puntos de ruido se utilizan dos parámetros: el *Single Point Flag* y el *Protein Depth Flag*. *Roll* también puede predecir bolsillos de distinta forma y volumen al ajustar el radio de la sonda esférica.

Finalmente, para el ordenamiento de los bolsillos, se ha designado el parámetro *Volume-Depth* para evaluar la posibilidad de que los bolsillos predichos sean sitios de interacción reales (63).

#### **2.4.8 UCSF CHIMERA X**

UCSF ChimeraX es un programa de visualización molecular de siguiente generación desarrollada por el *Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics* (RBVI). UCSF ChimeraX es un software libre para uso académico, gubernamental, sin fines de lucro y personal (75)(76)(77)(78).

UCSF ChimeraX permite no solamente la visualización de una amplia gama de formatos de imágenes moleculares y películas de dinámica molecular; también incorpora una variedad de herramientas para análisis de secuencias, modelamiento, edición, dinámica molecular, exportación de imágenes, entre otras (75)(76)(77)(78).

#### **2.4.9 LIGPLOT+**

LigPlot+ es el sucesor del programa original LIGPLOT para la generación automática de diagramas de interacción proteína-ligando. Corre en una interfaz java intuitiva lo que permite la edición en pantalla de los diagramas utilizando solo el ratón.

LigPlot utiliza coordenadas 3D para generar los diagramas de interacción. Estos diagramas muestran los patrones de interacción de los enlaces de hidrógeno y los contactos hidrofóbicos entre los ligandos y la cadena principal o elementos secundarios de la proteína. El sistema permite graficar grupos de interacciones en la misma orientación, facilitando el análisis de la unión de moléculas pequeñas a una sola proteína objetivo, un solo ligando a proteínas homologas o un caso general donde cambien tanto la proteína como el ligando (79).

## CAPITULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1 MÉTODOS

##### 2.1.1 BÚSQUEDA DE ESTRUCTURAS.

Se realizó la búsqueda de estructuras de la Topoisomerasa I humana en la base de datos PDB, escogiendo la estructura 1EJ9. Se realizó la búsqueda de estructuras de los metabolitos en la base de datos PubChem, encontrando las estructuras correspondientes.

##### 2.1.2 GENERACIÓN DE ESTRUCTURAS EQUILBRADAS.

La estructura PDB 1EJ9, correspondiente al complejo TOP1-ADN fue editada para su uso en la investigación. Se removió de forma manual las cadenas de DNA incluidas en la estructura utilizando el software UCSF Chimera.

La estructura resultante fue sometida a un proceso de equilibrio usando GROMACS y el campo de fuerza OPLS/AA. La estructura fue solvatada con moléculas de agua y su pH se ajustó a valores fisiológicos añadiendo iones Na y Cl.

La minimización de energía utilizó el algoritmo *steepest descent* a doble precisión incluido en GROMACS.

Para el ensamble NVT, se realizó una simulación de 10ns, utilizando el termostato modificado de Berendsen.

Para el ensamble NPT, se realizó una simulación de 500ns, utilizando el termostato modificado de Berendsen y el algoritmo de Parinello-Rahman.

Luego de la simulación en el ensamble NPT se corrigió la trayectoria del archivo obtenido y se eliminó la periodicidad.

Utilizando los comandos disponibles en GROMACS, se obtuvieron los análisis de RMSD, radio de giro y RMSF por residuos. Los archivos xvg resultantes fueron ploteados utilizando GNUplot para Linux.

Se extrajo un archivo pdb a partir del archivo de trayectoria corregido y se realizó una minimización de energía. Este archivo final se extrajo en formato pdb y se le eliminó el solvente y iones. Esta estructura será utilizada en las simulaciones posteriores.

Se utilizó el software Gaussian 16 para el proceso de equilibrio de las estructuras de los metabolitos mediante simulación de mecánica molecular. El software OpenBabel permitió cambiar de formato rápidamente a los archivos según la necesidad del cálculo.

Las estructuras 3D de los metabolitos fueron adaptadas al campo de fuerza para docking, calculando las cargas de Hirshfeld en el servidor LigParGen y reemplazándolas manualmente en los archivos itp correspondientes.

### **2.1.3. BÚSQUEDA DE BOLSILLOS.**

Se utilizaron los servidores web ProteinPlus, D3Pockets y POCASA para la búsqueda de bolsillos en la estructura corregida. Para los servidores D3Pockets y POCASA se utilizó el archivo pdb de la proteína obtenido en el proceso anterior para alimentar al servidor; mientras que para el servidor ProteinPlus se utilizó el archivo pdb y los archivos sdf correspondientes a los metabolitos. En el servidor ProteinPlus se utilizó el algoritmo DogSiteScorer para calcular los bolsillos drugables de la estructura.

Se seleccionaron los 5 mejores resultados de acuerdo con el score propio de los servidores y al volumen accesible.

### **2.1.4 DOCKING MOLECULAR.**

Se utilizó el software AutoDock Vina para la simulación de 1000 eventos de docking molecular ciego entre la estructura final de 1EJ9 en formato pdb y los archivos pdb correspondientes a cada uno de los metabolitos escogidos.

Se selecciono el evento con el valor más negativo y se generó los archivos pdb de los complejos enzima-ligando.

### **2.1.5 ANÁLISIS DE ESTRUCTURAS ACOPLADAS.**

Se realizó las simulaciones de dinámica molecular de los complejos enzima-ligando, siguiendo los mismos parámetros utilizados anteriormente, a excepción del ensamble NPT el cual solo tuvo una duración de 100ns.

Luego de la simulación en el ensamble NPT se corrigieron las trayectorias de los archivos obtenidos y se eliminó la periodicidad de estos utilizando GROMACS.

Utilizando los comandos disponibles en GROMACS, se obtuvieron los análisis de RMSD, radio de giro y RMSF por residuos para todos los complejos. Los archivos xvg resultantes fueron ploteados utilizando GNUplot para Linux.

Se obtuvieron los gráficos de Ramachandran y los datos de análisis respectivos utilizando el servidor PDBSUM y la herramienta de análisis PROCHECK; se utilizó el archivo pdb de cada complejo como archivo de entrada.

Se utilizó el software LigPlot+ para analizar las interacciones entre el complejo TOP1 y los ligandos en los complejos obtenidos. Se utilizó el archivo pdb de cada complejo como archivo de entrada.

### 2.1.6 ANÁLISIS MM-PBSA

Se utilizó el programa g\_mmpbsa el cual se desarrolla por dos programas de código abierto; GROMACS y APBS. Este programa permitió calcular la energía de unión de los últimos 10 ns de la simulación en el ensamble NPT de los complejos TOP1-ligandos. Una vez obtenidos estos valores se utilizó la siguiente ecuación para calcular las constantes de inhibición:

$$\Delta G = -RT \ln k$$

$$\ln k = \frac{-\Delta G}{RT}$$

$$k = e^{\frac{-\Delta G}{RT}}$$

## 2.2 EQUIPO

El equipo utilizado fue provisto por el Centro de Investigación en Ingeniería Molecular de la Universidad Católica de Santa María. Las especificaciones de la Workstation son las siguientes:

- Procesador Ryzen 9 5950X de 16 núcleos y 32 hilos
- 32 GB de memoria RAM
- 12TB de almacenamiento entre diferentes discos duros
- 2 tarjetas de video NVIDIA 1080Ti

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 ESTRUCTURAS EQUILIBRADAS GENERADAS.

Al realizarse la búsqueda en la base de datos de proteínas (PDB) se seleccionó la estructura con identificador 1EJ9 (ver figura 8). La estructura desde la base de datos contenía un segmento de ADN y moléculas de solvente. La estructura proteína contaba con un total de 483 restos aminoacídicos.

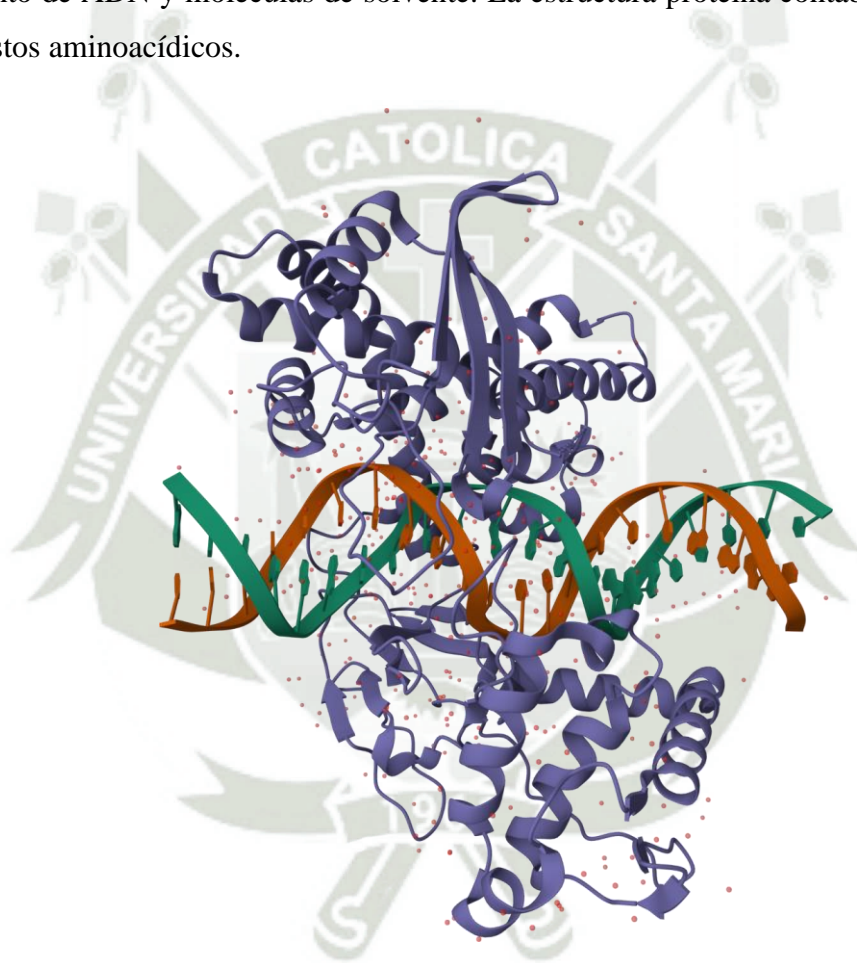


Figura 8.- Estructura PDB:1EJ9 que muestra el complejo hTOP1-DNA.

Se procedió a retirar el ADN utilizando el software UCSF Chimera, así mismo también se eliminaron las moléculas de solvente, mediante el mismo software. Una vez limpia la estructura se procedió a realizar las simulaciones de dinámica molecular.

La estructura limpia obtenida a partir de 1EJ9 se preparó para su corrida en el software GROMACS, para ello consideramos el utilizar el campo de fuerza OPLS/AA, en el proceso de preparación se solvato la proteína en una caja cubica y procedió a la neutralización e introducción de los iones salinos, para representar las condiciones fisiológicas de

funcionamiento de la proteína. Seguidamente se procedió a la minimización de las fuerzas mediante el algoritmo *steepest descent*, y a doble precisión para poder lograr una efectiva convergencia. A la estructura final de la minimización, se le introdujo la temperatura mediante la simulación en el ensamble NVT utilizando el termostato modificado de Berendsen durante una trayectoria de 10ns. Finalmente se realizó la simulación de dinámica molecular, introduciendo la presión en el ensamble NPT utilizando el termostato modificado de Berendsen y el algoritmo de Parinello-Rahman por con una trayectoria de 500ns.

Se corrigió la trayectoria de la estructura obtenida y se eliminó la condición periódica utilizando el software GROMACS. A partir de esta estructura corregida se obtuvieron los gráficos de RMSD, RMSF y radio de giro utilizando el software GROMACS. Luego se obtuvo un archivo pdb a partir de los archivos de trayectoria del ensamble NPT, este archivo pdb se minimizó en GROMACS utilizando el algoritmo *steepest descent*. Finalmente se utilizó el software UCSF Chimera para eliminar las moléculas de solvente y obtener una estructura minimizada, equilibrada y desolvatada.

La estructura final obtenida se muestra en la figura 9.

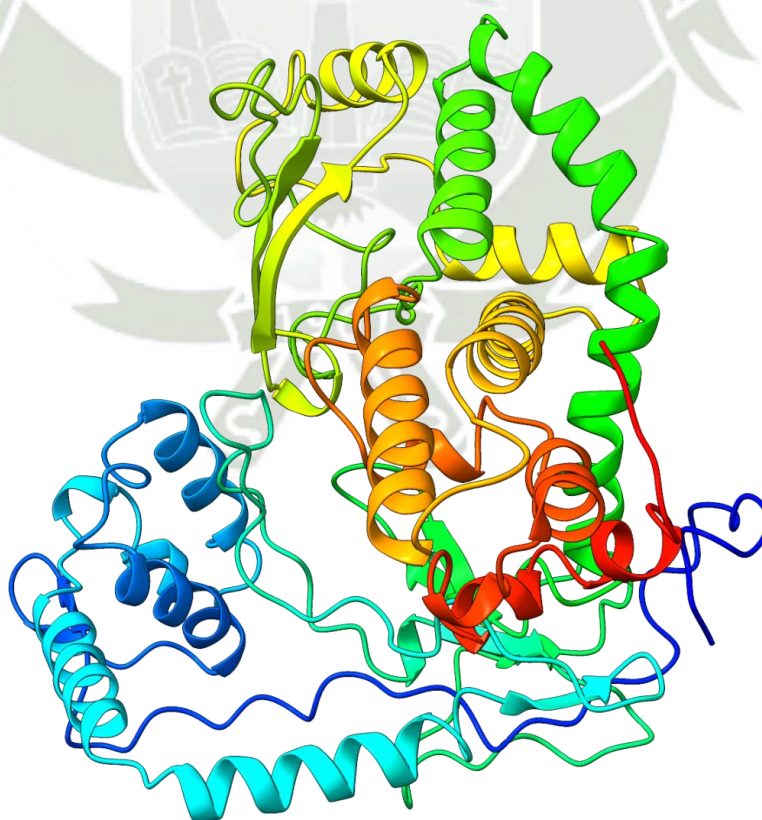


Figura 9: Estructura final de TOP1.

Se utilizó el software GROMACS para obtener los ploteos del radio de giro, RMSD y RMSF de la estructura corregida. Los cuales se muestran en las figuras 10, 11 y 12:

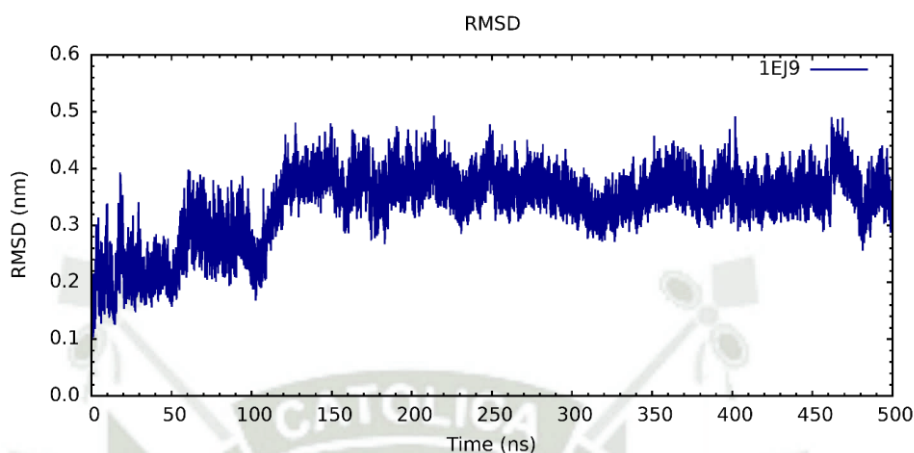


Figura 10: RMSD de la estructura final.

Se puede observar en el gráfico de RMSD que la estructura adopta una conformación estable aproximadamente a partir de los 150 ns. Quedando el valor de RMSD dentro de un rango de 0.2 nm por el resto de la simulación. Esto nos indica que se ha llegado a un estado de equilibrio y que el movimiento dentro de la estructura es mínimo.

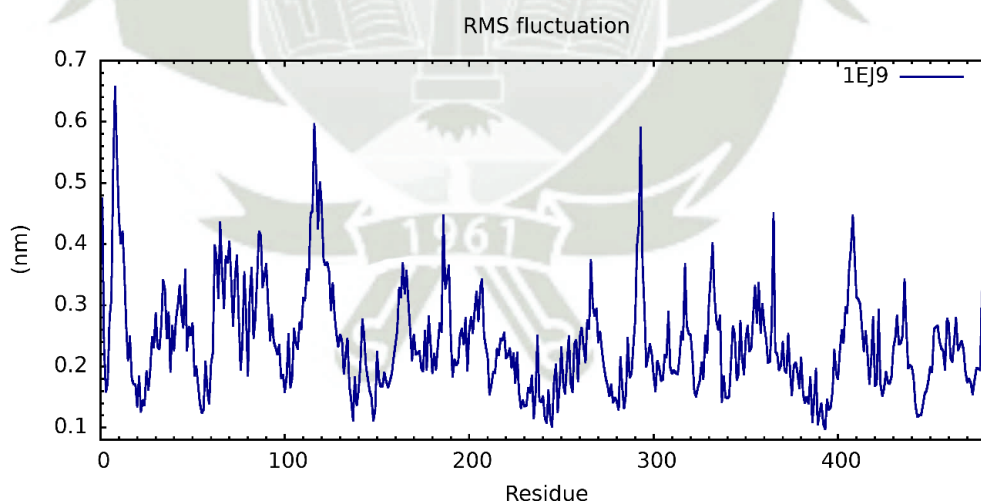


Figura 11: RMSF por residuos de la estructura final.

Se puede observar en el gráfico de RMSF que la estructura presenta las mayores fluctuaciones en los primeros residuos aminoacídicos, lo cual es esperado, también se presentan fluctuaciones en la zona del residuo GLU-322 e ILE-482.

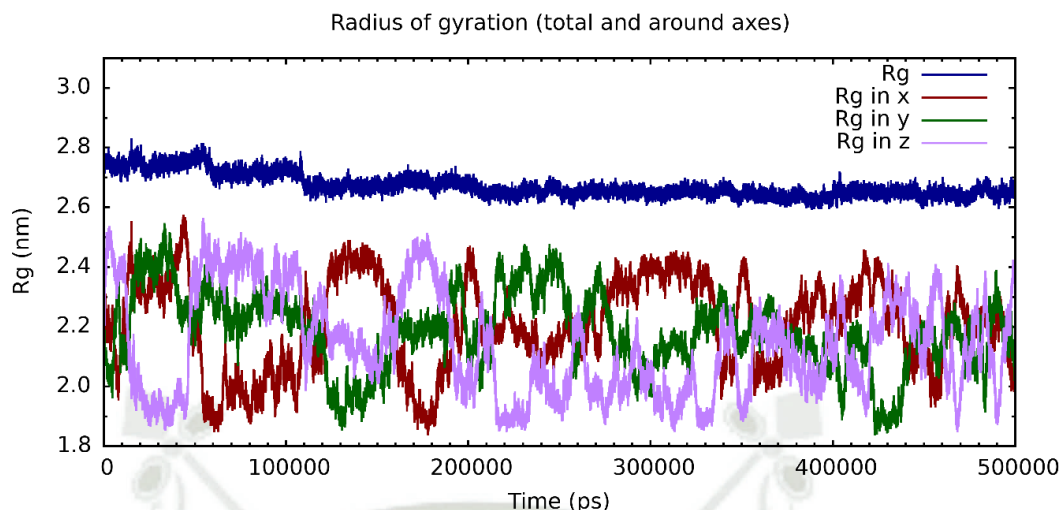


Figura 12: Radio de giro de la estructura final.

Se puede observar en el gráfico de radio de giro que la estructura se va compactando rápidamente hasta los 110 ns aproximadamente y luego en menor medida, pero de manera progresiva hasta el fin de la simulación. Podemos también observar que, respecto a las contribuciones al radio de giro en cada plano, el eje x es el que tiene una mayor contribución respecto al eje y y z.

En conclusión, la estructura derivada de PDB:1EJ9 es estable, compacta y presentó una mayor fluctuación principalmente en las zonas cercanas a GLU-322 e ILE-482.

Al realizar la búsqueda de las estructuras de los metabolitos en la base de datos PubChem se encontraron las estructuras de: ácido gumiferólico (PubChem CID: 101316950), kauran-16-ol (PubChem CID: 623309), kauran-15-ol (PubChem CID: 101629837) e isopimara-7,15-dien-3-ona (PubChem ID: 15541536). Las estructuras solo contenían dichos metabolitos.

Se utilizó el software Gaussian para la optimización cuántica de las estructuras y calcular las cargas de Hirshfeld correspondientes; luego se utilizó el servidor LigParGen para generar el campo de fuerza OPLS/AA correspondiente para cada estructura. Las estructuras finales se muestran en las figuras correspondientes.

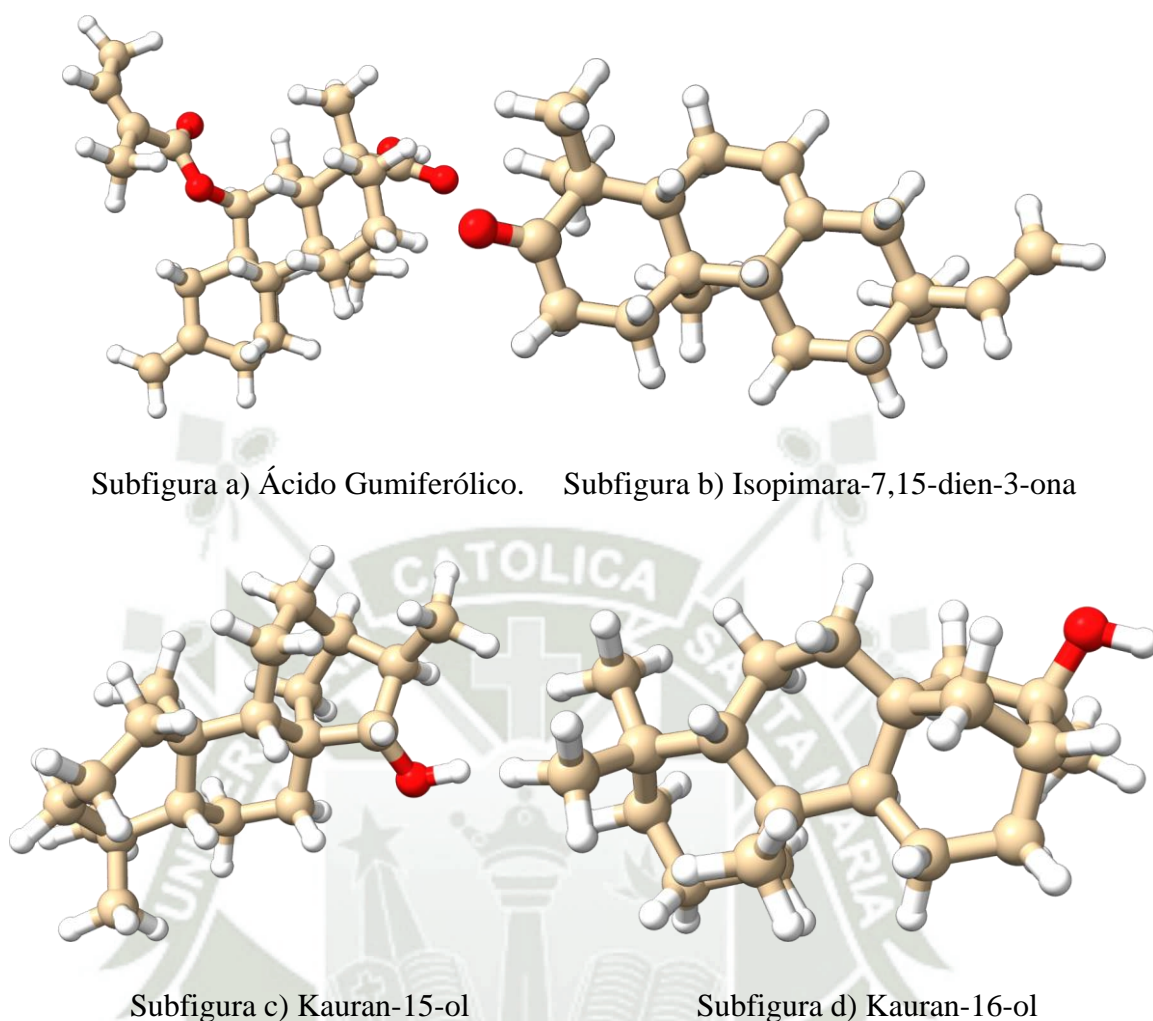


Figura 13: Estructuras finales de los ligandos: a) Ácido Gumiferólico. b) Isopimara-7,15-dien-3-ona. c) Kauran-15-ol y d) Kauran-16-ol.

### 3.2 BOLSILLOS DRUGABLES ENCONTRADOS.

La identificación de bolsillos drugables dentro la estructura busca la predicción de los sitios más probables para la unión de ligandos dentro de una estructura proteica. Estos bolsillos son encontrados con diferentes algoritmos y puede realizarse en servidores web. Los parámetros principales de estos bolsillos son el volumen accesible, el área superficial accesible. Algunos servidores web también calculan otro tipo de parámetros y pueden dar un ranking de bolsillos basado en estos factores.

Los cinco bolsillos con mejor afinidad con el ligando “drugScore” se seleccionaron mediante el servidor ProteinPlus, los resultados se muestran en las figuras 14, 15, 16, 17 y 18.

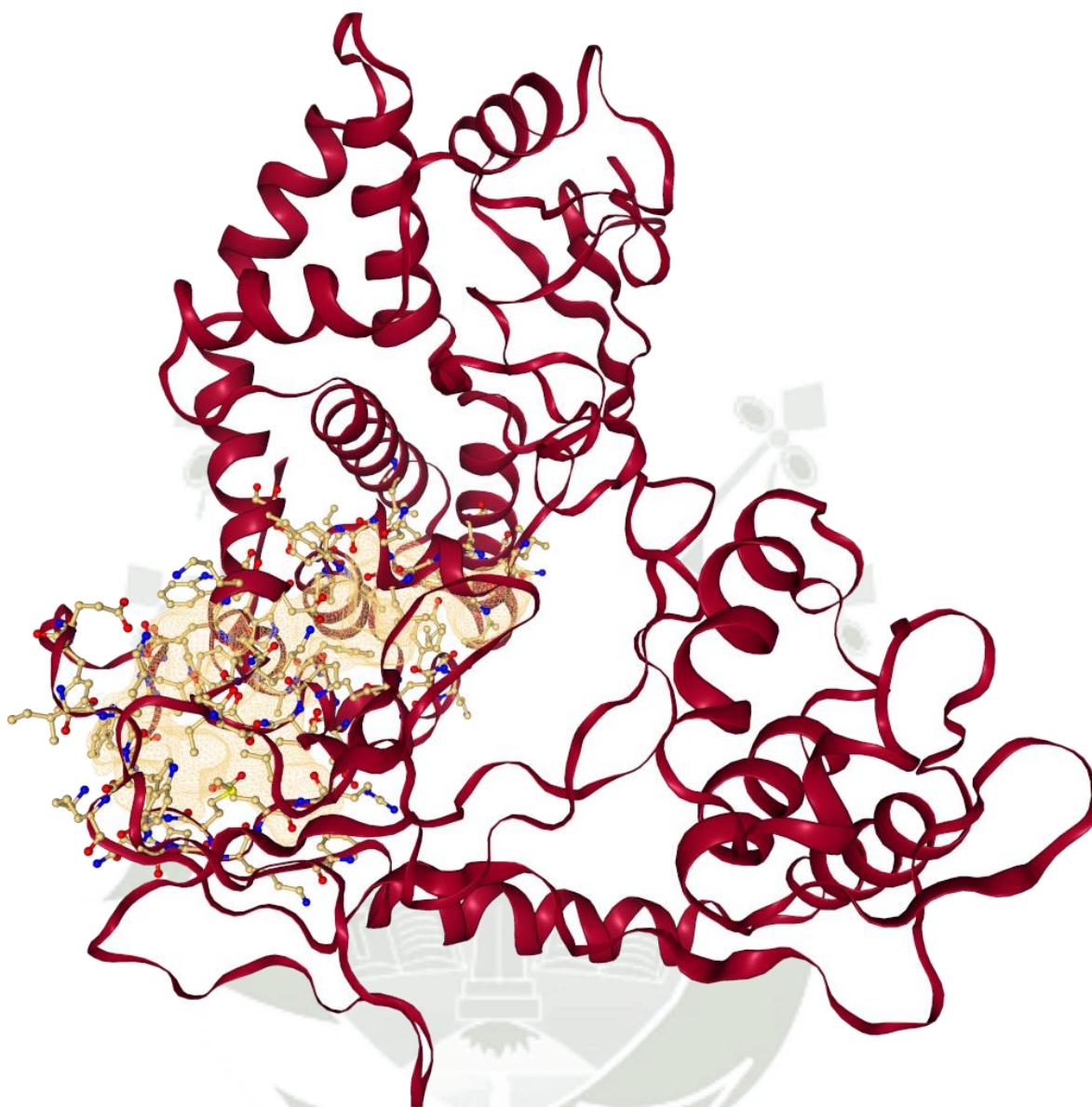


Figura 14: Bolsillo 1 (P\_0) generado por ProteinPlus.

El bolsillo P\_0 presenta un volumen de  $1212.06 \text{ \AA}^3$ , una superficie de  $1727.39 \text{ \AA}^2$  y un DrugScore de 0.81. Se ubica entre los residuos TRP-203, TRP-205, TRP-206, TYR-211, GLU-213, ILE-215, LYS-216, TRP-217, LYS-218, PHE-340, MET-343, ASP-344, ASN-345, HIS-346, LIS-347, GLU-348, ARG-349, THR-411, LEU-429, PRO-431, SER-432, SER-433, ARG-434, ILE-435, LYS-436, GLY-437, GLU-438, LYS-439, ASP-440, TRP-441, LYS-443, TYR-444, LEU-598, ILE-616, TYR-619, ASN-620, ASN-623, LEU-716, LYS-720, LEU-721, ASN-722, LEU-724, ASP-725, PRO-726, ILE-728, THR-729, LYS-742, ILE-743, TYR-744, GLN-748, GLU-750, LYS-751 y PHE-752.

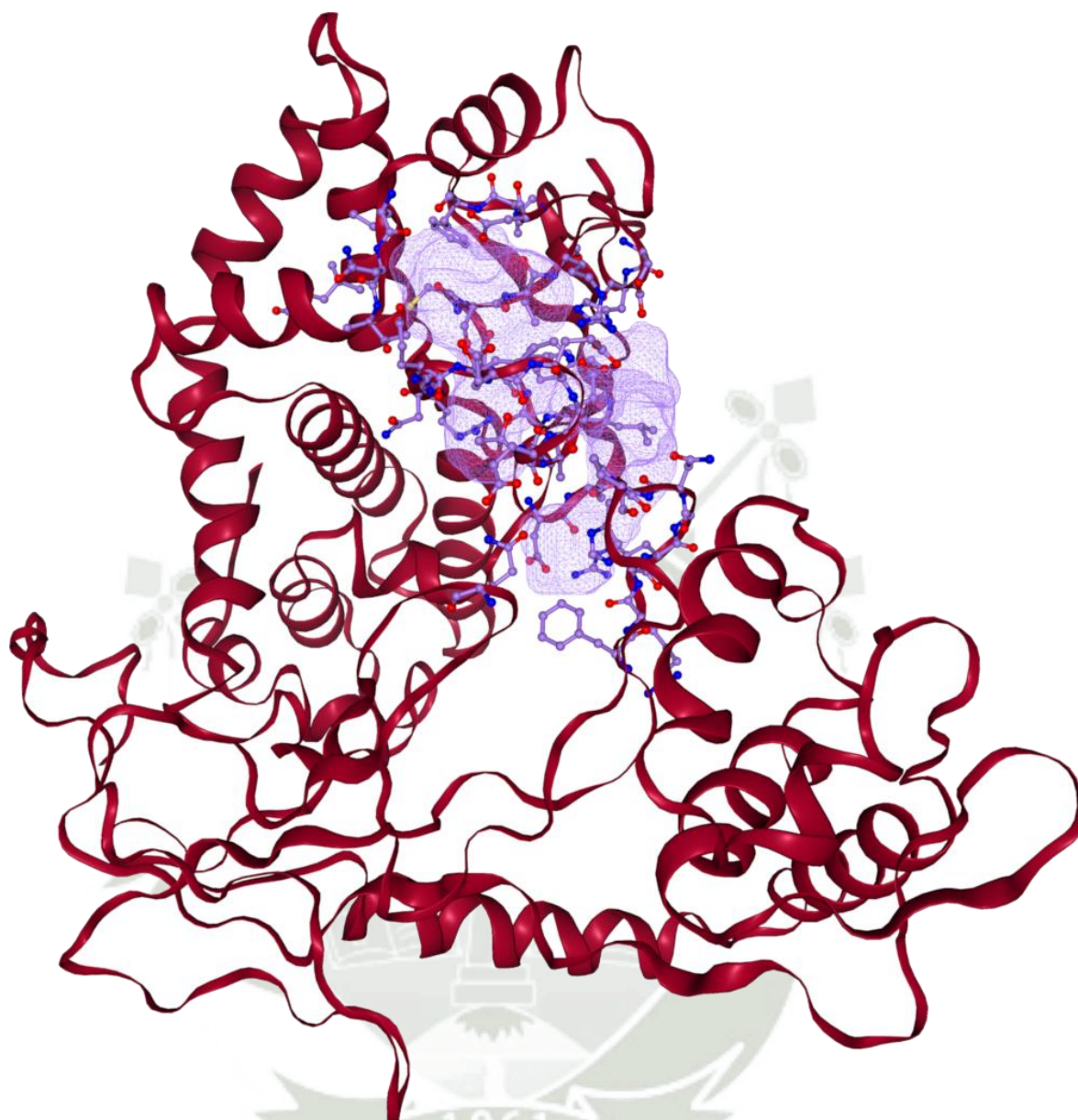


Figura 15: Bolsillo 2 (P\_1) generado por ProteinPlus.

El bolsillo P\_1 presenta un volumen de  $903.21 \text{ \AA}^3$ , una superficie de  $1400.96 \text{ \AA}^2$  y un DrugScore de 0.81. Se ubica entre los residuos PHE-361, ARG-362, GLY-363, ARG-364, GLY-365, ASN-366, HIS-367, PRO-368, GLN-421, ARG-488, GLY-490, ASN-491, GLU-492, LYS-493, GLU-494, GLU-495, GLY-496, GLU-497, THR-498, ALA-499, ASP-500, THR-501, VAL-502, GLY-503, CYS-505, SER-506, LEU-507, ARG-508, GLU-510, HIS-511, PHE-529, LEU-530, ASP-533, SER-534, ASP-563, LEU-564, PHE-565, LEU-568, ASN-569, THR-570 y LEU-573.

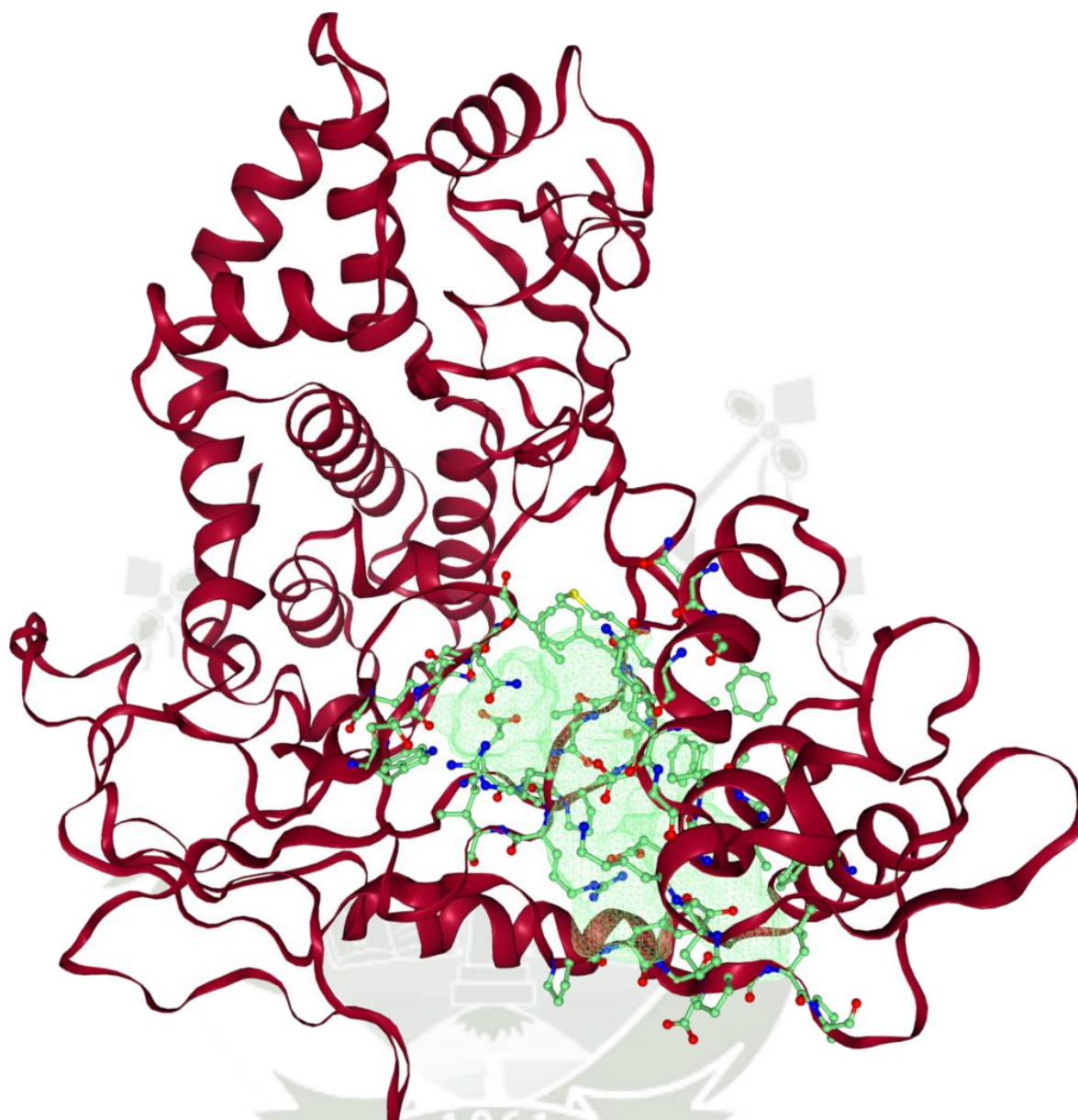


Figura 16: Bolsillo 3 (P\_2) generado por ProteinPlus.

El bolsillo P\_2 presenta un volumen de  $826.66 \text{ \AA}^3$ , una superficie de  $1207.27 \text{ \AA}^2$  y un DrugScore de 0.84. Se ubica entre los residuos: PRO-230, TYR-231, GLU-232, PRO-233, LEU-234, PRO-235, PRO-251, LYS-252, GLU-255, VAL-256, THR-258, PHE-259, LYS-262, ASN-277, PHE-278, ASP-281, LYS-284, GLU-285, PHE-309, GLU-356, PRO-357, PRO-358, GLY-359, LEU-360, PHE-361, MET-372, LEU-373, LYS-374, ARG-375, ARG-376, ILE-377, TRP-416, THR-417, GLU-418, ASN-419, ILE-420 y LYS-425.

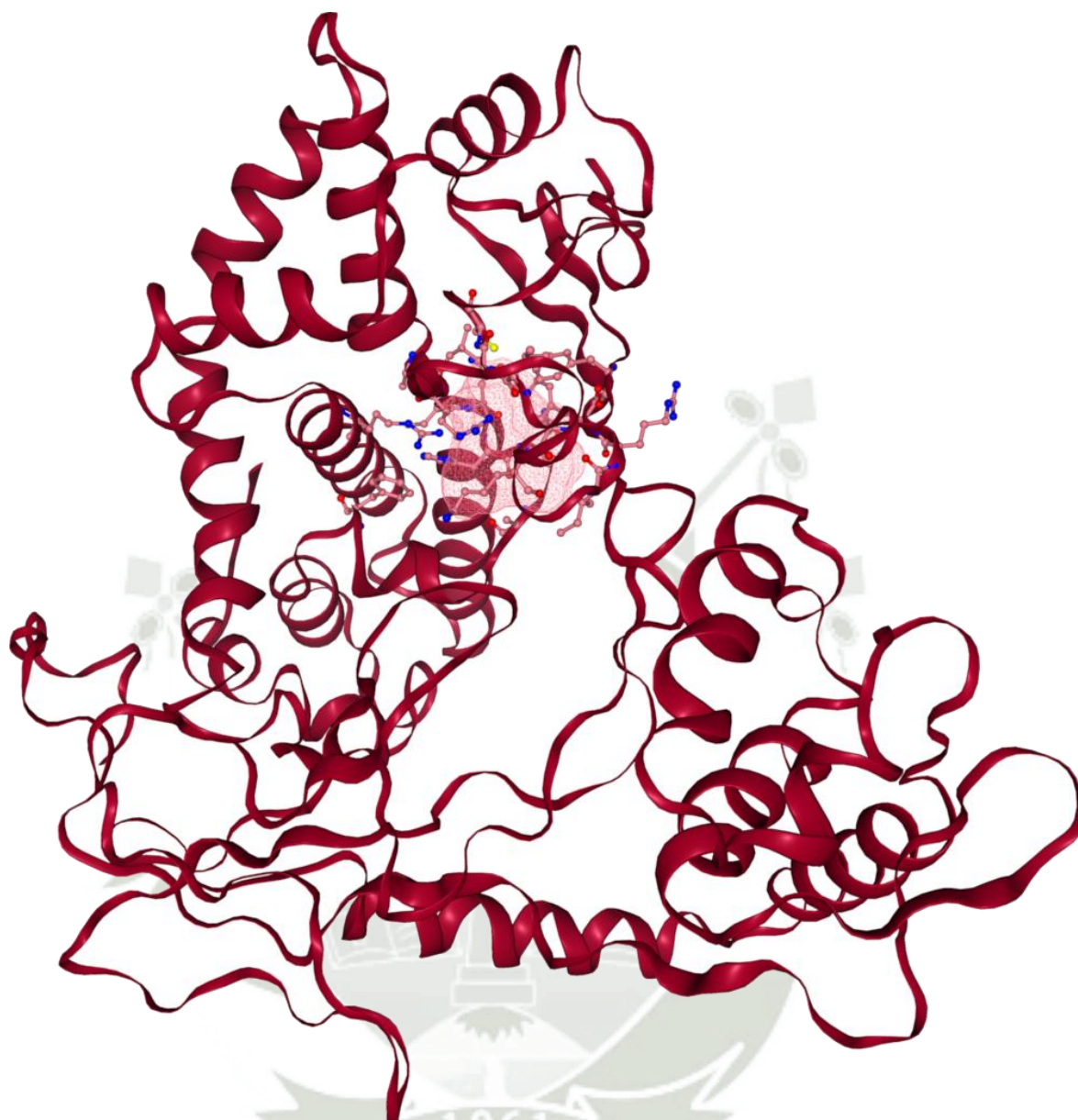


Figura 17: Bolsillo 4 (P\_3) generado por ProteinPlus.

El bolsillo P\_3 presenta un volumen de  $357.91 \text{ \AA}^3$ , una superficie de  $466.87 \text{ \AA}^2$  y un DrugScore de 0.54. Se ubica entre los residuos: ALA-486, LEU-487, ARG-488, VAL-502, GLY-503, CYS-504, PHE-529, GLY-531, LYS-532, ILE-535, ARG-536, TYR-537, ARG-590, CYS-630, ASN-631, HIS-632, GLN-633, ALA-715 y PHE-723.

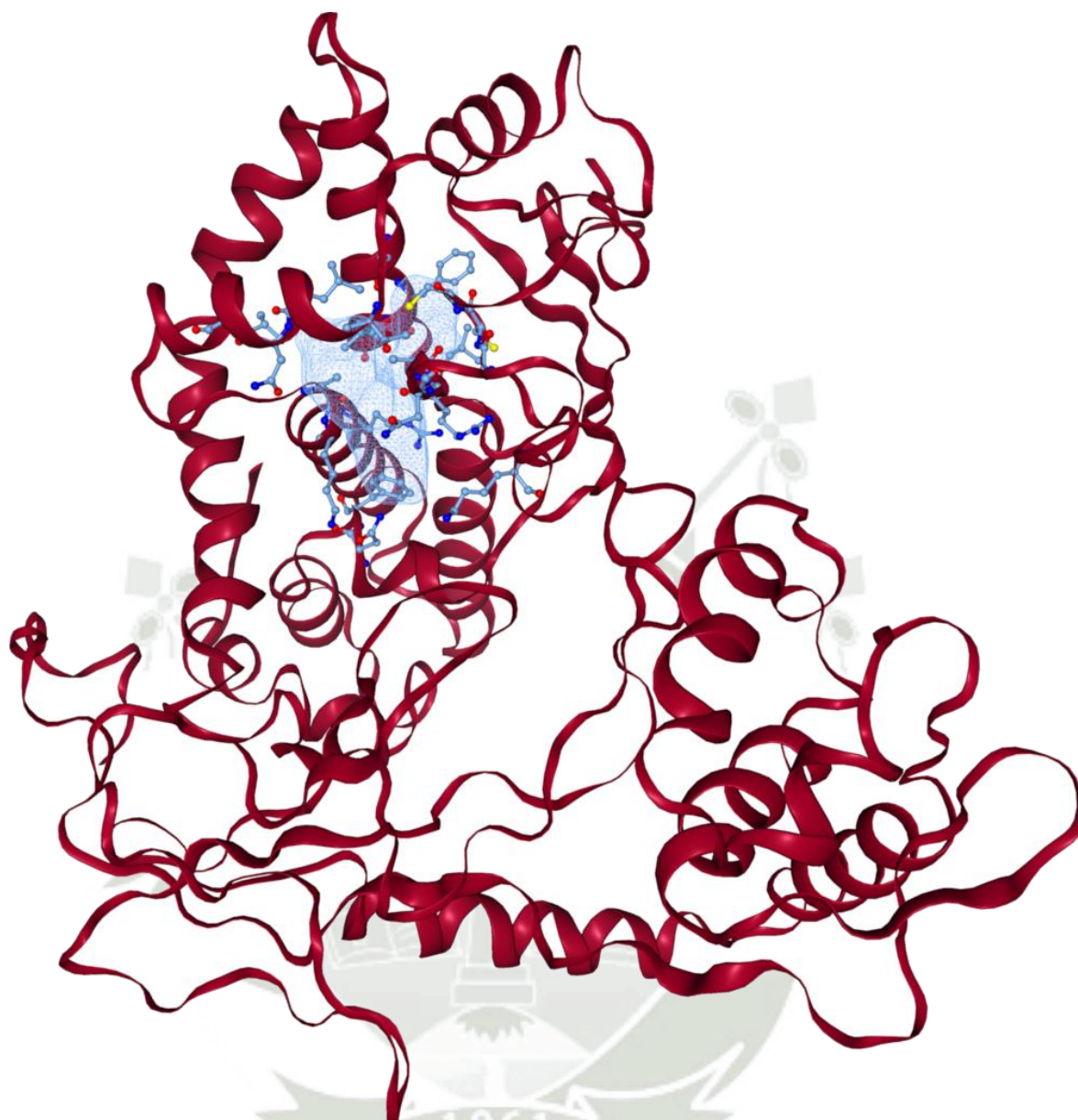


Figura 18: Bolsillo 5 (P\_4) generado por ProteinPlus.

El bolsillo P\_4 presenta un volumen de  $341.05 \text{ \AA}^3$ , una superficie de  $435.38 \text{ \AA}^2$  y un DrugScore de 0.67. Se ubica entre los residuos: ALA-478, PHE-481, ILE-482, LEU-487, ARG-488, ALA-489, GLY-490, ASN-491, GLY-503, CYS-504, CYS-505, LYS-532, THR-570, LEU-573, ASN-574, LEU-577, ALA-586, LYS-587, ARG-590, ASN-722 y PHE-723.

Los 5 bolsillos con mayor volumen y ASA (área superficial accesible) predichos por el servidor D3Pockets se muestran en las figuras 19, 20, 21, 22 y 23.

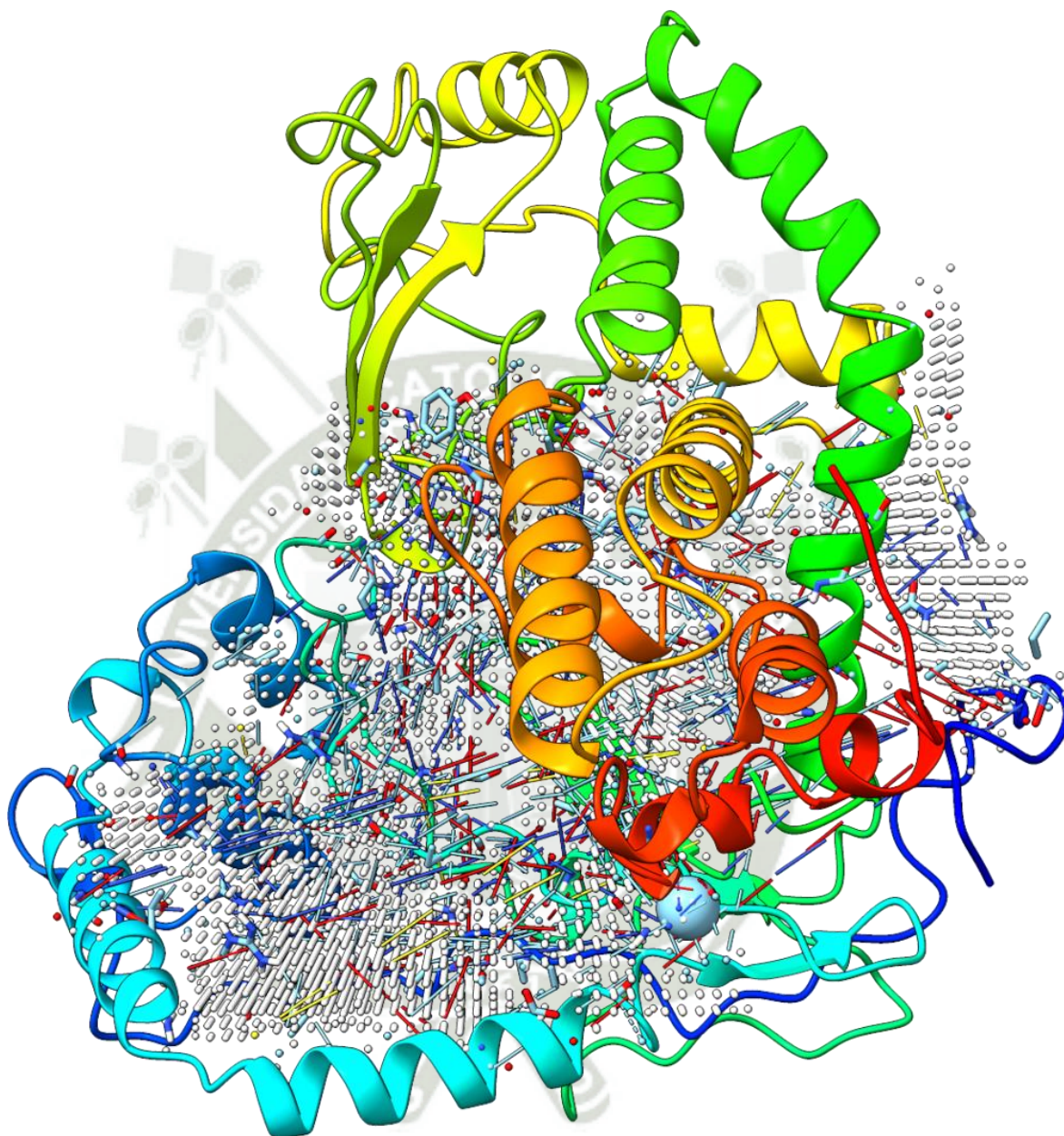


Figura 19: Bolsillo 1 (1) generado por D3Pockets.

El bolsillo 1 presenta un volumen de  $7309 \text{ \AA}^3$ , una superficie accesible de  $60.44 \text{ \AA}^2$ . Se ubica entre las zonas: GLU-207 – GLU-213, LYS-262 – ARG-364, LYS-310 – LEU-334, ILE-420 – MET-428, ARG-434-LYS-452, GLU-492 – ALA-586 y ARG-536 – LEU-721.

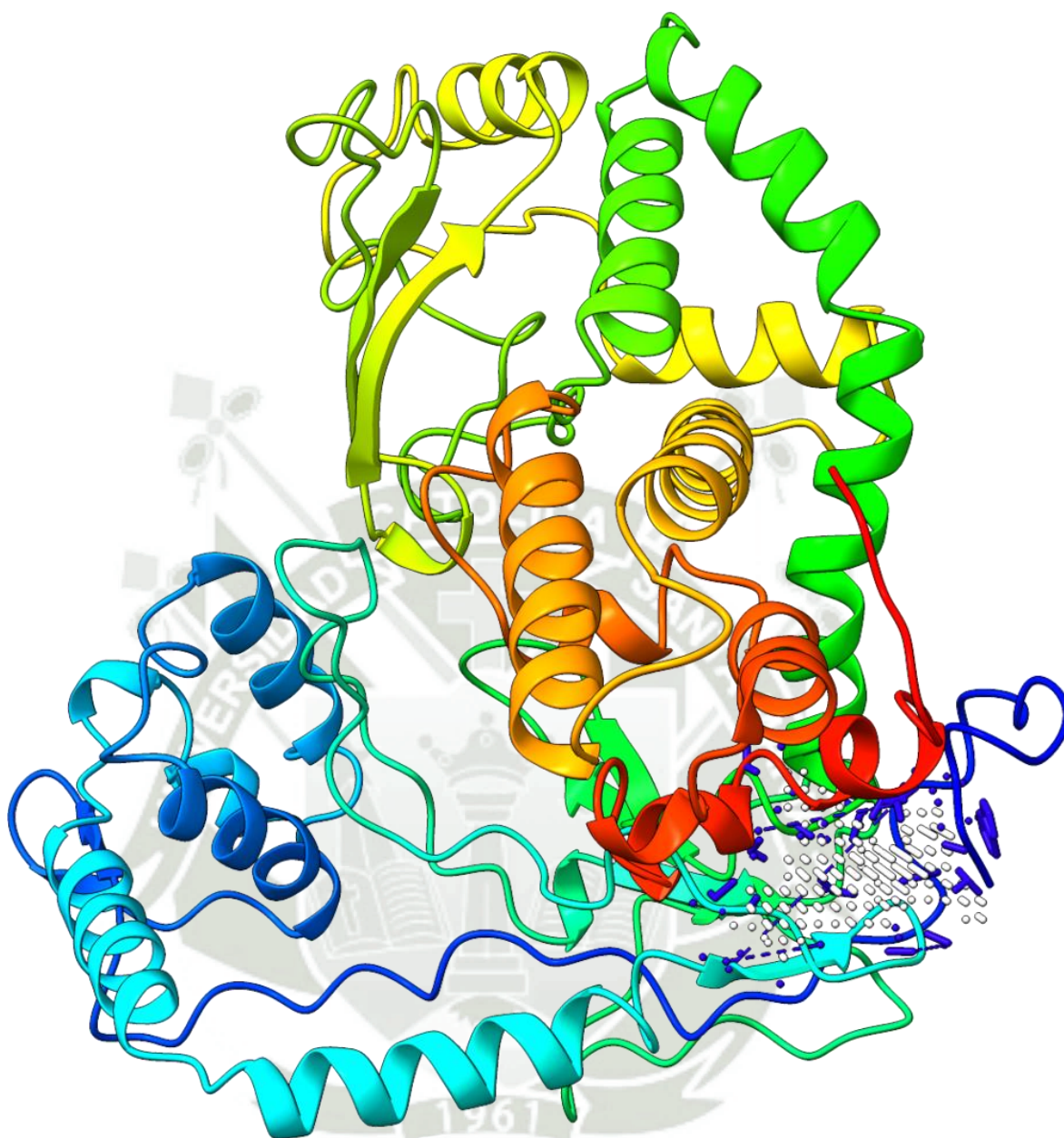


Figura 20: Bolsillo 2 (2) generado por D3Pockets.

El bolsillo 2 presenta un volumen de  $301 \text{ \AA}^3$ , una superficie accesible de  $7.27 \text{ \AA}^2$ . Se ubica entre los residuos: TRP-203, LYS-216, ASN-245, HIS-346, LYS-347, GLU-348, ARG-349, SER-432, ARG-434, ILE-435, GLU-750, LYS-751, PHE-752 y ALA-753.

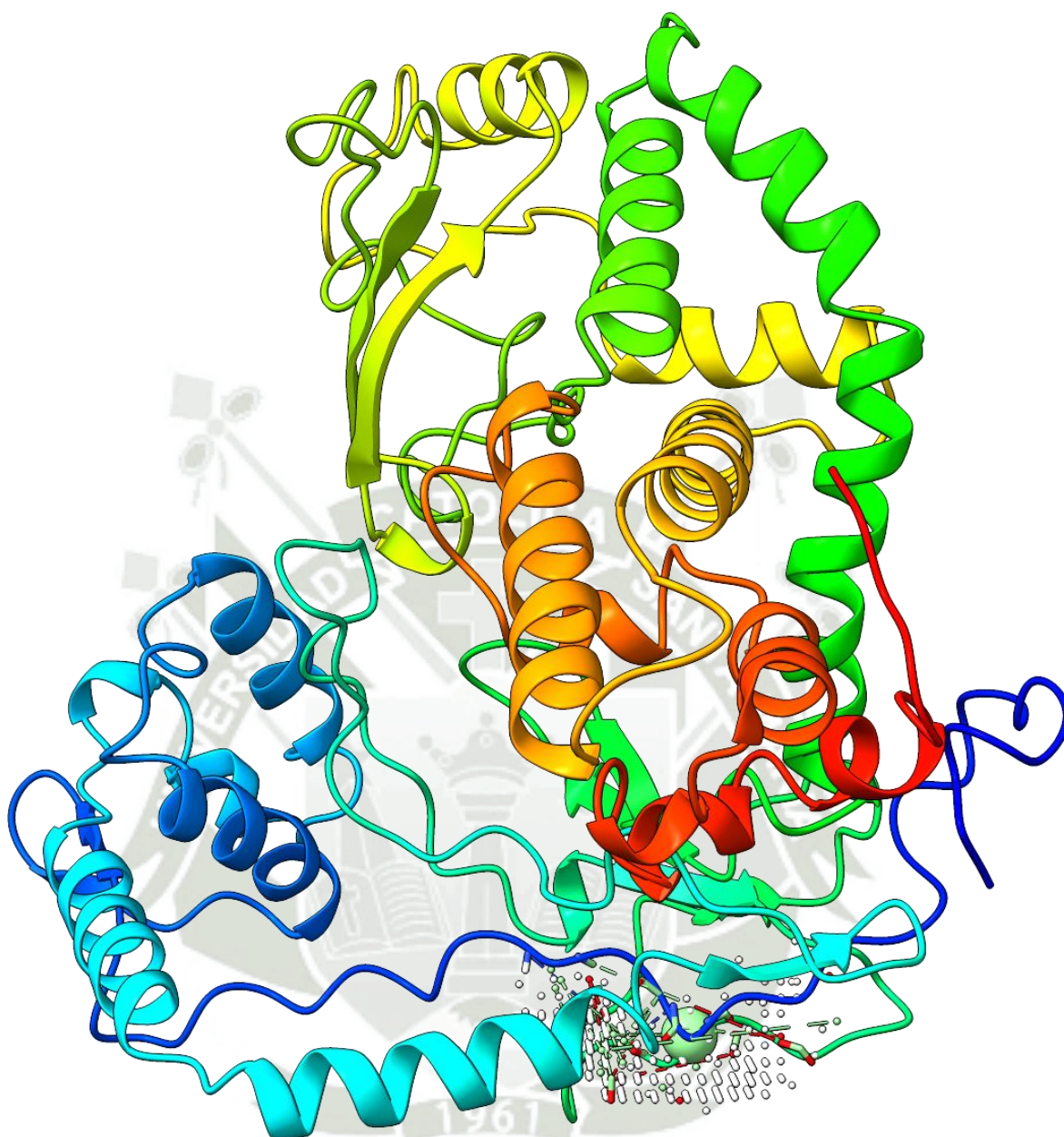


Figura 21: Bolsillo 3 (4) generado por D3Pockets.

El bolsillo 4 presenta un volumen de  $265 \text{ \AA}^3$ , una superficie accesible de  $5.92 \text{ \AA}^2$ . Se ubica entre los residuos: GLU-221, HIS-222, LYS-223, GLY-224, PRO-225, VAL-226, PHE-227, ALA-390, VAL-392, PRO-393, SER-394 y PRO-395.

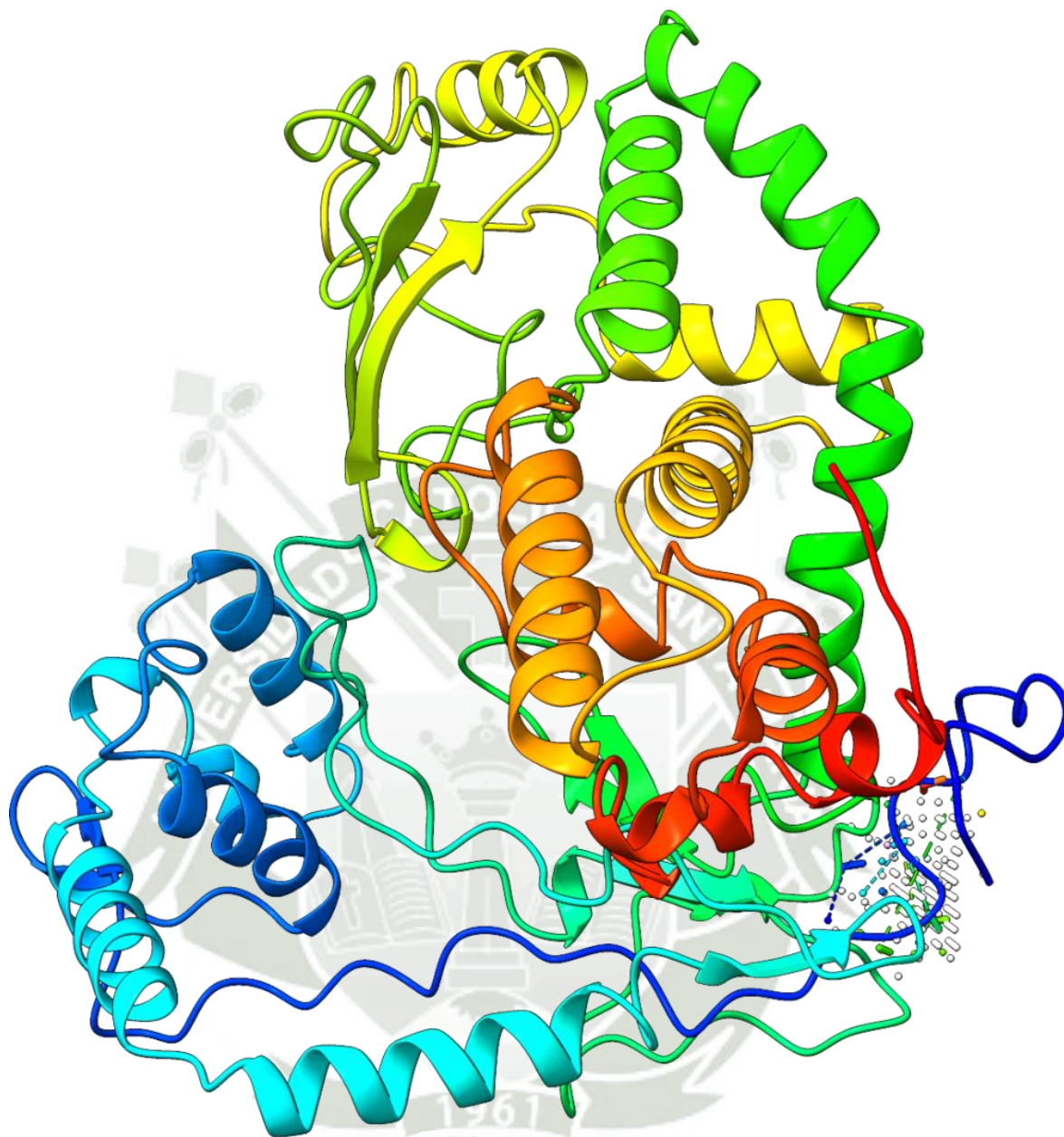


Figura 22: Bolsillo 4 (7) generado por D3Pockets.

El bolsillo 7 presenta un volumen de  $153 \text{ \AA}^3$ , una superficie accesible de  $5.48 \text{ \AA}^2$ . Se ubica entre los residuos: ILE-215, LYS-216, ILE-218, PHE-219, SER-387, LYS-388, ASP-389, HIS-406, ASP-407, ASN-408, LYS-409, VAL-410.

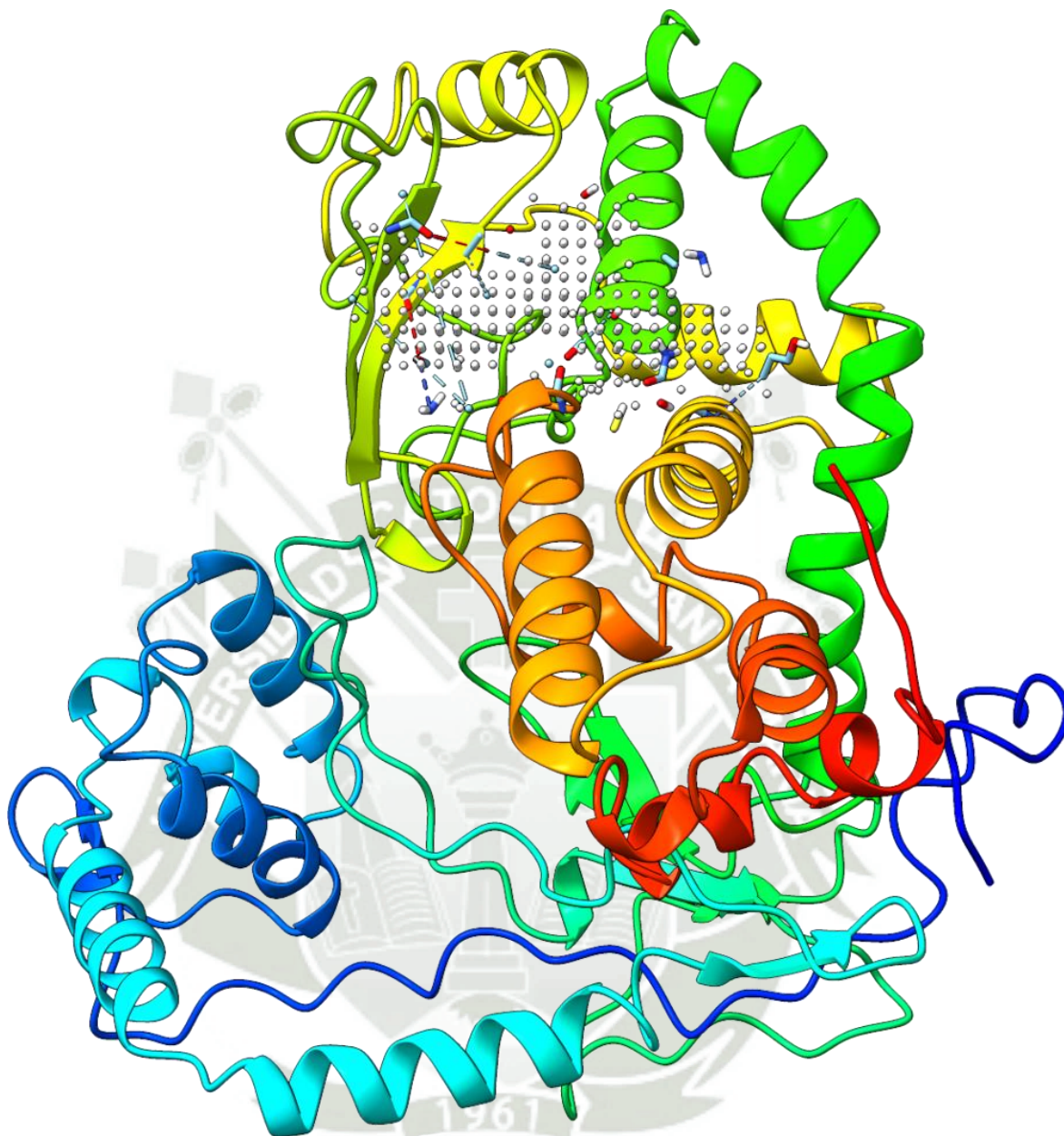


Figura 23: Bolsillo 5 (3) generado por D3Pockets.

El bolsillo 3 presenta un volumen de  $343 \text{ \AA}^3$ , una superficie accesible de  $5.23 \text{ \AA}^2$ . Se ubica entre los residuos: LYS-484, LEU-485, LYS-540, VAL-541, PRO-542, VAL-543, ASN-593, THR-597, LEU-629 y CYS-630,

El servidor POCASA predijo de manera automática los 5 mejores bolsillos para TOP1, basado en el valor Volume-Depth. Se muestra la estructura junto a los 5 bolsillos que el servidor devolvió (Figura 24) y seguidamente cada bolsillo de manera individual en las figuras 25, 26, 27, 28 y 29.

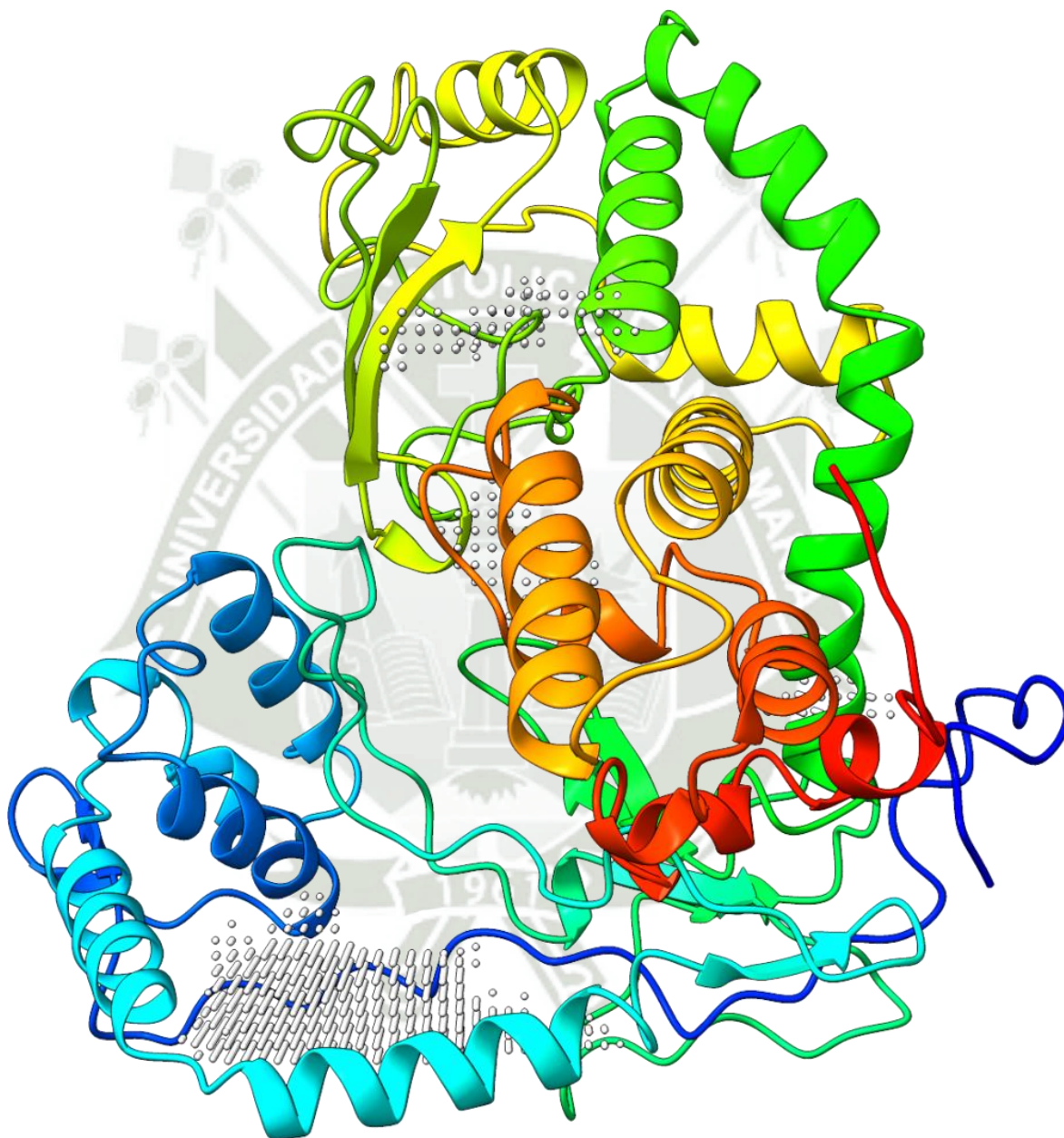


Figura 24: Bolsillos generados por el servidor POCASA.

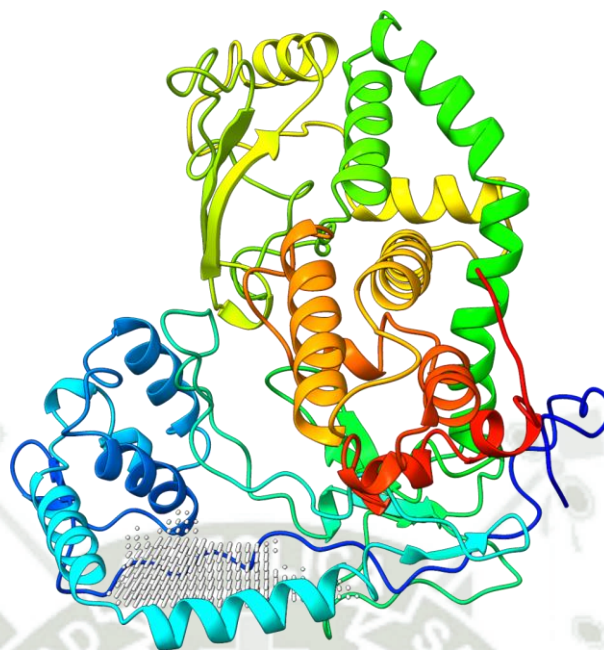


Figura 25: Bolsillo 1 (54) generado por el servidor POCASA.

Pocket 1 (54) con un volumen de 1210 Å<sup>3</sup> y un valor Volume-Depth de 3206 ubicado entre los residuos: PRO-225 – LEU-234 y TYR-308 - GLU-330.

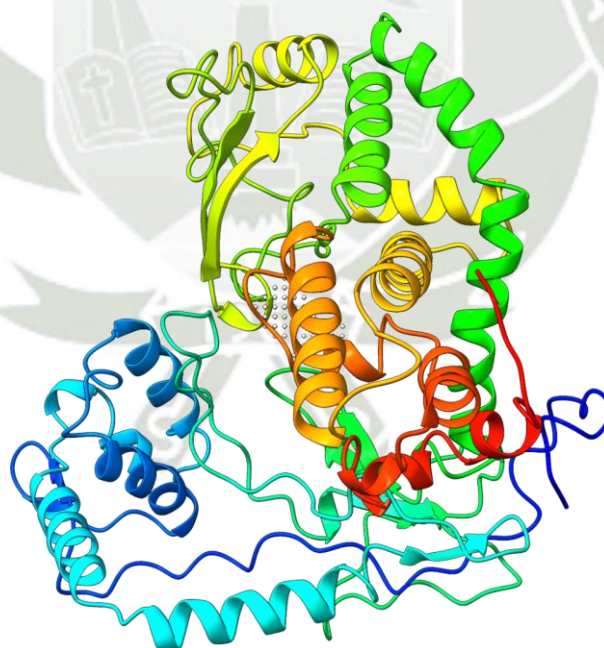


Figura 26: Bolsillo 2 (217) generado por el servidor POCASA.

Pocket 217 con un volumen de 97 Å<sup>3</sup> y un valor Volume-Depth de 326 ubicado entre los residuos LYS-532, ASP-533, HIS-632, GLN-633, ILE-714, ALA-715, LEU-716, GLY-717, THR-718 y SER-719,

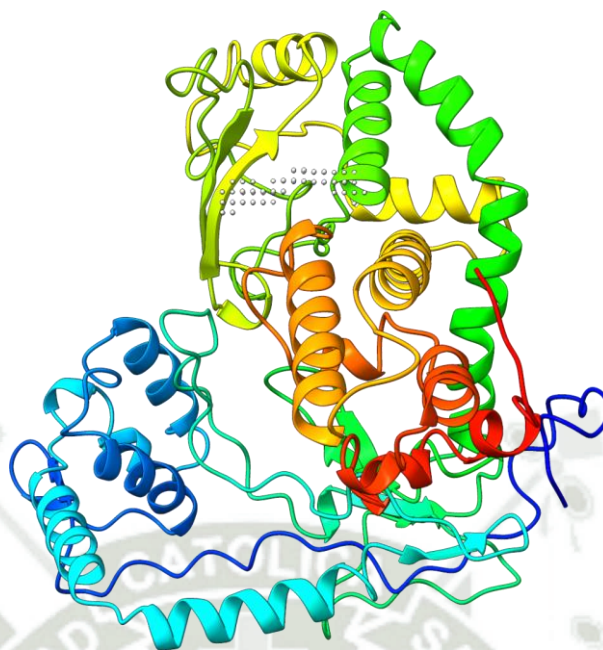


Figura 27: Bolsillo 3 (183) generado por el servidor POCASA.

Pocket 183 con un volumen de  $68 \text{ \AA}^3$  y un valor Volume-Depth de 174 ubicado entre los residuos LYS-484, LEU-485, LYS-540, VAL-541, ILE-628 y LEU-629.

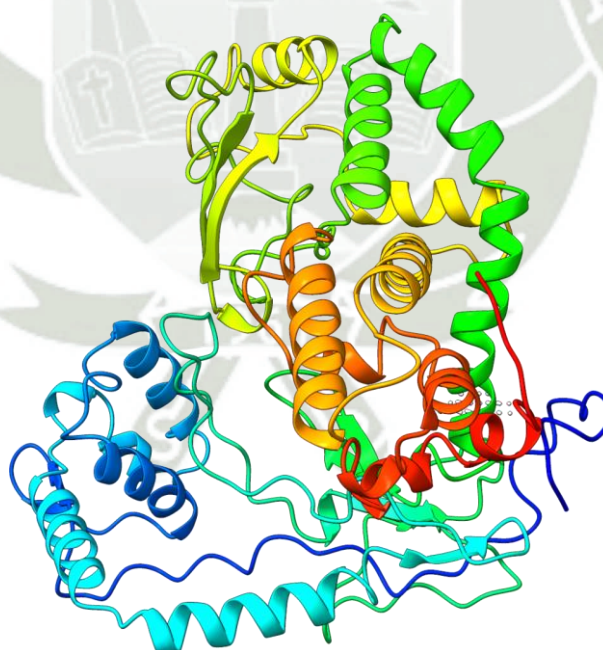


Figura 28: Bolsillo 4 (515) generado por el servidor POCASA.

Pocket 515 con un volumen de  $52 \text{ \AA}^3$  y un valor Volume-Depth de 140 ubicado entre los residuos PRO-212, GLU-213, THR-411, ILE-435, LYS-436, GLY-437 y GLU-438.

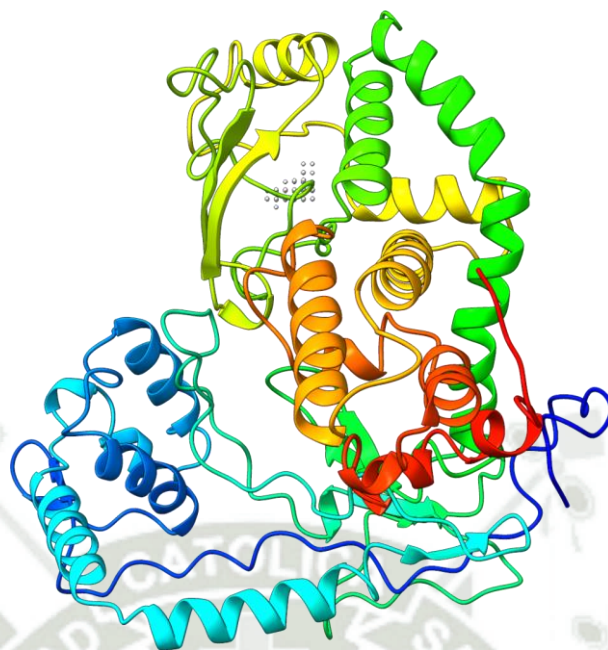


Figura 29: Bolsillo 5 (237) generado por el servidor POCASA.

Pocket 237 con un volumen de  $50 \text{ \AA}^3$  y un valor Volume-Depth de 138 ubicado entre los residuos GLU-492, LYS-493, ARG-567, LEU-568, SER-506, LEU-507 y ASP-563.

Los resultados de los diferentes análisis realizados para los bolsillos de interacción o zonas de mayor drugabilidad los presentamos en las siguientes tablas. Para el caso del servidor ProteinPlus, los criterios utilizados para seleccionar las propiedades globales de comparación entre las zonas de accesibilidad o región de mayor probabilidad de drugabilidad, son el volumen accesible del bolsillo, la superficie de interacción del bolsillo y la puntuación de drugabilidad “DrugScore”.

ProteinPlus, ordena entre todos los potenciales bolsillos, los que tienen un mayor valor de DrugScore y esto se ve reflejado en los otros dos parámetros.

Tabla 7: Mejores bolsillos encontrados por el servidor ProteinPlus.

ProteinPlus				
Rank	Nombre	Volumen ( $\text{A}^3$ )	Superficie ( $\text{A}^2$ )	DrugScore
1	P_0	1212.06	1727.39	0.8089
2	P_1	903.21	1400.96	0.8152
3	P_2	826.66	1207.27	0.8421
4	P_3	357.91	466.87	0.5436
5	P_4	341.05	435.38	0.6673

En el caso del servidor D3Pockets, los parámetros que utiliza para su análisis de los bolsillos son el volumen de accesibilidad y el área superficial accesible, en este caso no presenta una puntuación y solo ordena los potenciales bolsillos en función de ambos parámetros, es de esperar que para volúmenes mayores debería corresponder una mayor área superficial accesible.

Tabla 8: Mejores bolsillos encontrados por el servidor D3Pockets.

D3Pockets			
Rank	Nombre	Volumen (A <sup>3</sup> )	A.S.A (A <sup>2</sup> )
1	1	7309	60.4413
2	2	301	7.2740
3	4	265	5.9271
4	7	153	5.4872
5	3	343	5.2277

El servidor POCASA utiliza un algoritmo llamado *Roll* para el análisis de los bolsillos, este servidor devuelve de manera automática los 5 mejores resultados basado en el valor VD (Volume-Depth); además del volumen del bolsillo encontrado.

Tabla 9: Mejores bolsillos encontrados por el servidor POCASA.

POCASA			
Rank	Nombre	Volumen (A <sup>3</sup> )	VD Value
1	54	1210	3206
2	217	97	326
3	183	68	174
4	515	52	140
5	237	50	138

Las tablas 7, 8 y 9 nos resumen los bolsillos encontrados por los 3 servidores, se puede observar que ProteinPlus y D3Pockets favorecen bolsillos con volúmenes similares como P\_3 (Proteinplus) y 3 (D3Pockets). El bolsillo P\_0 (ProteinPlus) y el bolsillo 54 (POCASA) tienen un volumen similar a pesar de no compartir la misma localización en la cadena aminoacídica.

La región de la secuencia aminoacídica de TOP1 comprendida entre los residuos 427 y 635 fue la más repetida en la localización de los distintos bolsillos, 11 de ellos conteniendo esta región o una parte de ella. Esto es significativo debido a la presencia del dominio CAT en esta región, es decir, de uno de los dominios catalíticos de la enzima.

En menor medida también se ubicaron algunos bolsillos en regiones cercanas a los residuos 214-427, que corresponderían al dominio catalítico CAP y también en los residuos mayores a 712 que corresponden al dominio C-terminal, de importancia por la presencia de Tyr-765 que es fosforilable.

El sitio activo propuesto para esta enzima este compuesto por los aminoácidos Tyr-723, Arg-590, Arg-488, His 632 y Lys-532; se ven comprometidos en los bolsillos 2,4 y 5 de ProteinPlus y el bolsillo 2 de POCASA. Asimismo, regiones cercanas fueron propuestas por el servidor D3Pockets. Por lo que se puede esperar interacciones significativas tras el docking.

### 3.3 DOCKING MOLECULAR

Las estructuras finales de la enzima y los metabolitos fueron utilizadas para el docking molecular utilizando AutoDock Vina, en un docking ciego simulando 32000 eventos.

Se seleccionaron los eventos con menor energía y son mostrados en las figuras 30, 31, 32 y 33.

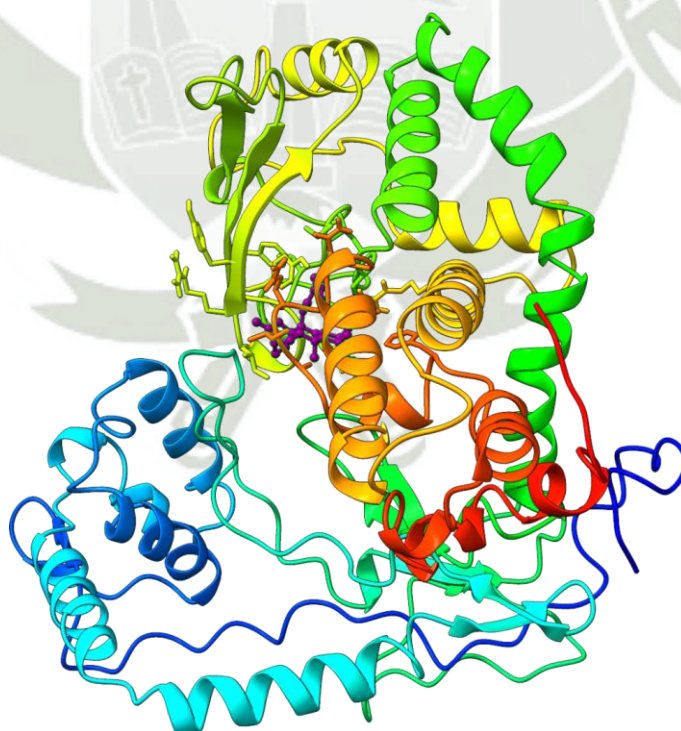


Figura 30: Complejo 1EJ9-Ácido Gumiferólico (morado) generado por AutoDock Vina.

De la corrida con el Autodock Vina, se ha obtenido la estructura de mayor probabilidad de interacción con el ácido Gumíferólico, localizándose en el segundo bolsillo de acuerdo al servidor ProteinPlus, y en el segundo bolsillo de acuerdo al servidor POCASA; en el caso del servidor D3 Pockets el primer bolsillo correspondía a la zona de unión, cabe resaltar que estas estructuras propuestas por el servidor, son iniciales, ya que para poder hablar de una verdadera interacción se tiene que realizar una evaluación determinística de la interacción, para lo cual requerimos realizar una simulación de dinámica molecular adicional

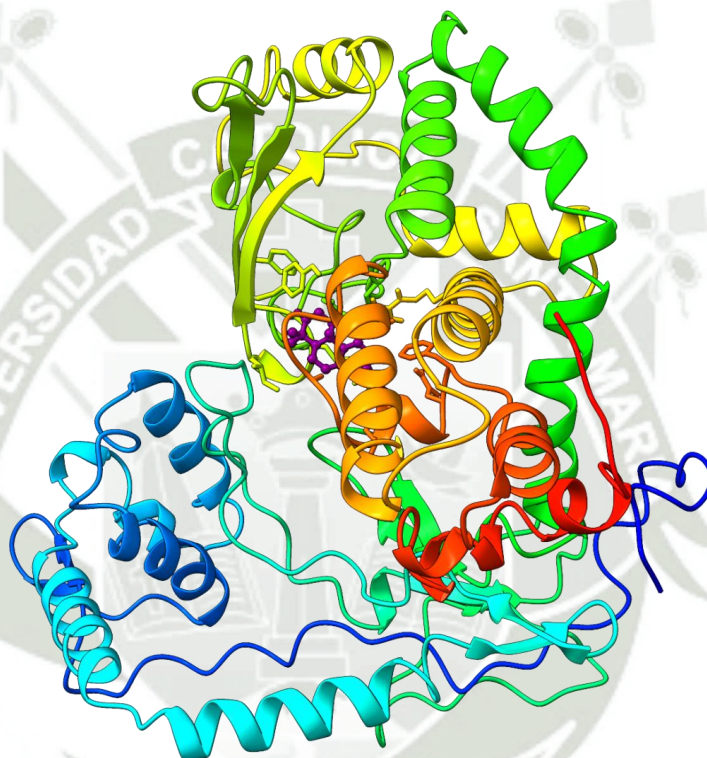


Figura 31: Complejo 1EJ9-Isopimara-7,15-dien-3-ona (morado) generado por AutoDock Vina.

De la corrida con el Autodock Vina, se ha obtenido la estructura de mayor probabilidad de interacción con isopimara-7,15-dien-3-ona, localizándose en el segundo bolsillo de acuerdo con el servidor ProteinPlus, y en el segundo bolsillo de acuerdo al servidor POCASA; en el caso del servidor D3 Pockets el primer bolsillo correspondía a la zona de unión.

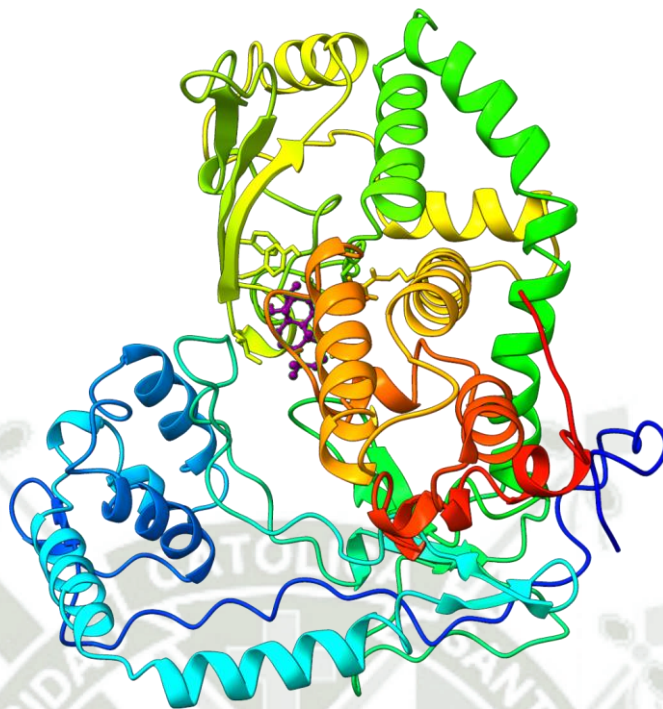


Figura 32: Complejo 1EJ9-Kauran-15-ol (morado) generado por AutoDock Vina.

De la corrida con el Autodock Vina, se ha obtenido la estructura de mayor probabilidad de interacción con el kauran-15-ol, localizándose en el segundo bolsillo de acuerdo con el servidor ProteinPlus, y en el segundo bolsillo de acuerdo al servidor POCASA; en el caso del servidor D3 Pockets el primer bolsillo correspondía a la zona de unión.

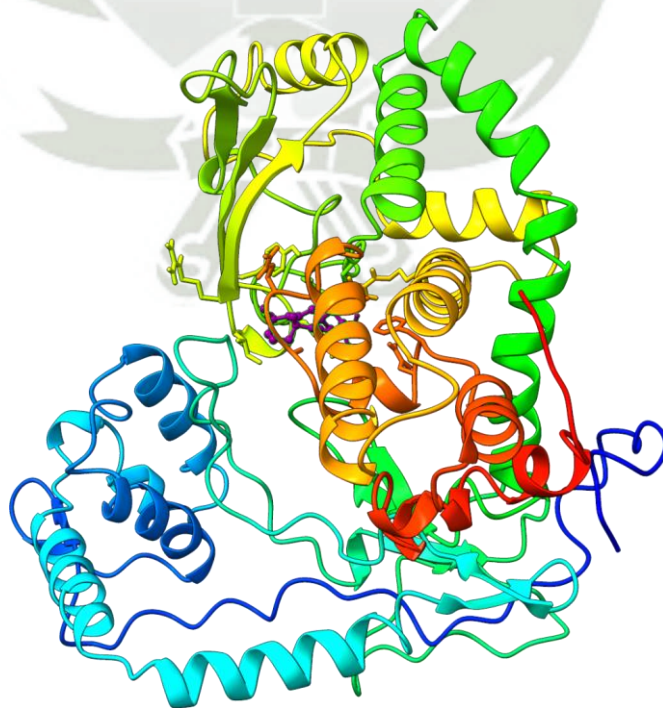


Figura 33: Complejo 1EJ9-Kauran-16-ol (morado) generado por AutoDock Vina.

De la corrida con el Autodock Vina, se ha obtenido la estructura de mayor probabilidad de interacción con kauran-16-ol, localizándose en el segundo bolsillo de acuerdo al servidor ProteinPlus, y en el segundo bolsillo de acuerdo al servidor POCASA; en el caso del servidor D3 Pockets el primer bolsillo correspondía a la zona de unión.

### 3.4 DINÁMICA MOLECULAR DE LOS COMPLEJOS

#### ÁCIDO GUMIFERÓLICO

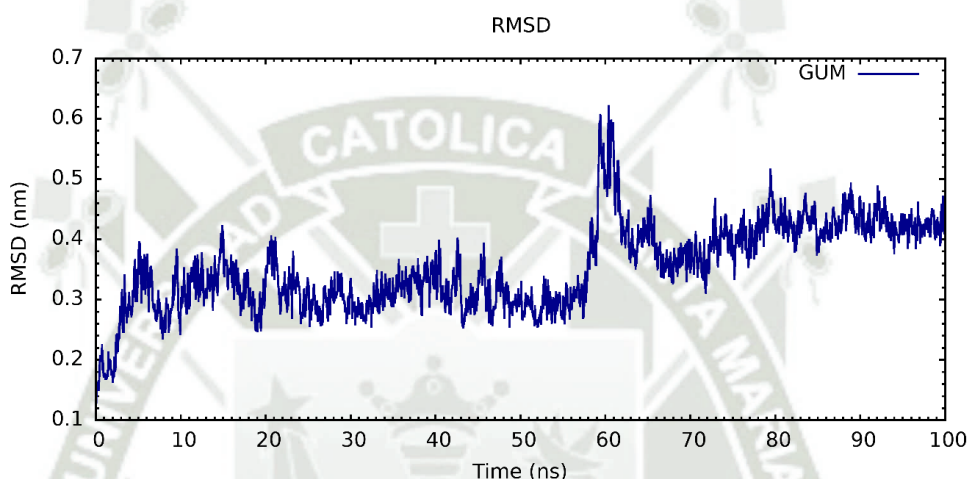


Figura 34: RMSD del complejo 1EJ9-GUM.

Se puede observar en el gráfico de RMSD que el complejo adopta una conformación estable aproximadamente a partir de los 72 ns. Quedando el valor de RMSD dentro de un rango de 0.2 nm por el resto de la simulación. Esto nos indica que se ha llegado a un estado de equilibrio y que el movimiento dentro de la estructura es mínimo.

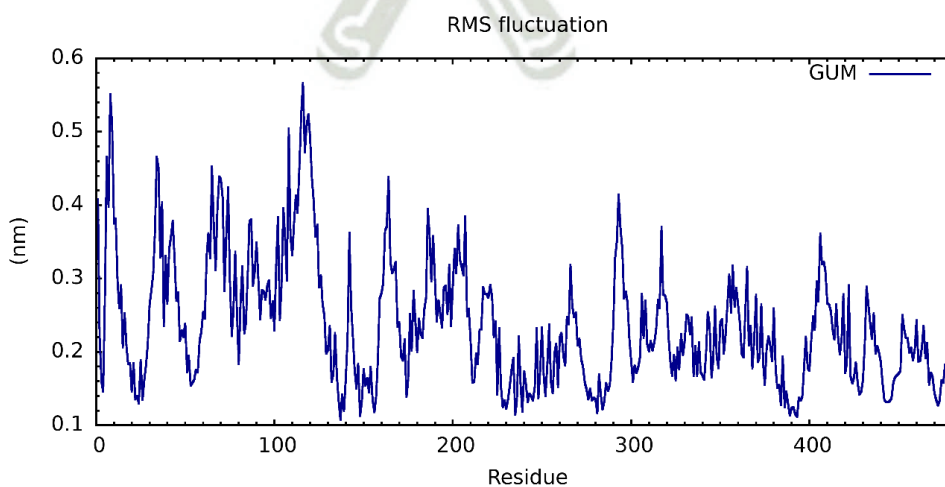


Figura 35: RMS del complejo 1EJ9-GUM.

Se puede observar en el gráfico de RMSF que el complejo presenta las mayores fluctuaciones en los primeros residuos aminoacídicos, lo cual es esperado, también se presentan fluctuaciones en la zona del residuo GLU-322. Se destacan fluctuaciones al principio de cadena, es decir entre los dominios N-terminal y CAP.

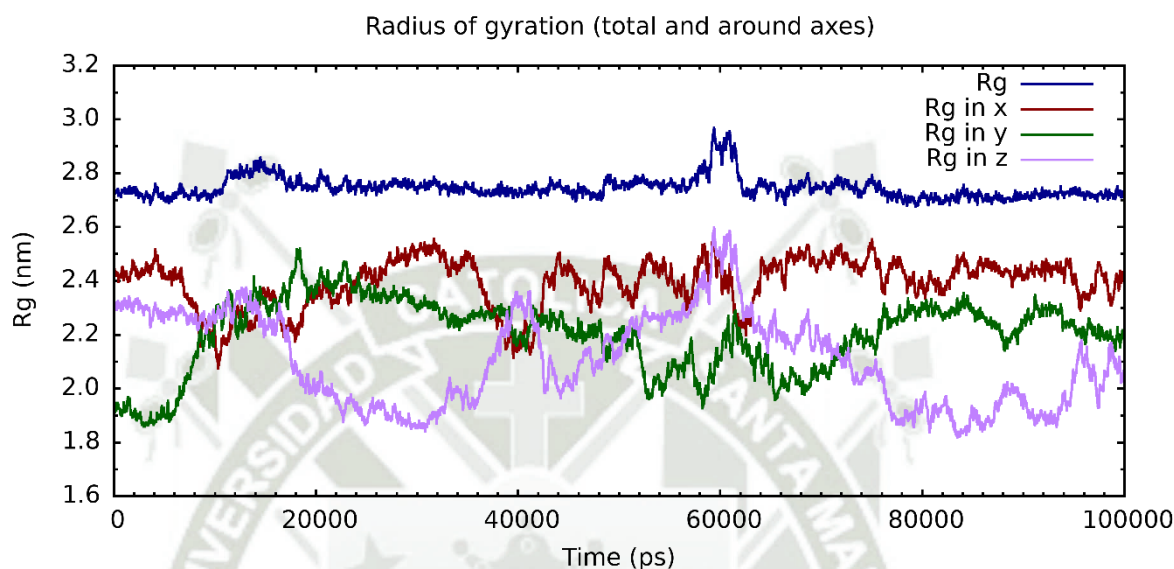


Figura 36: Radio de giro 1EJ9-GUM.

Se puede observar en el gráfico de radio de giro que el complejo sufre una expansión aproximadamente a los 10 ns y luego se va compactando progresivamente hasta los 58 ns en donde vuelve a ocurrir una expansión y luego a los 61 ns la estructura se compacta rápidamente y continúa compactándose de manera progresiva hasta el fin de la simulación. Podemos también observar que, respecto a las contribuciones al radio de giro en cada plano, el eje x es el que tiene una mayor contribución respecto al eje y y z. Y que el eje z es mayormente responsable de los eventos de expansión durante la simulación.

Las estadísticas del ploteo de Ramachandran para el complejo 1EJ9-GUM muestran que 381 residuos correspondiente al 87% se encuentran en regiones muy favorecidas, 51 residuos correspondiente al 11.6% se encuentran en regiones adicionales permitidas, 3 residuos correspondiente al 0.7% se encuentran en regiones generosamente permitidas y 3 residuos correspondiente al 0.7% se encuentran en regiones no permitidas. Estos porcentajes corresponden a todos los residuos aminoacídicos que no son glicina o prolina para un total de 438 aminoácidos. 20 residuos de glicina y 23 residuos de prolina completan los 484 aminoácidos totales de la estructura del complejo.

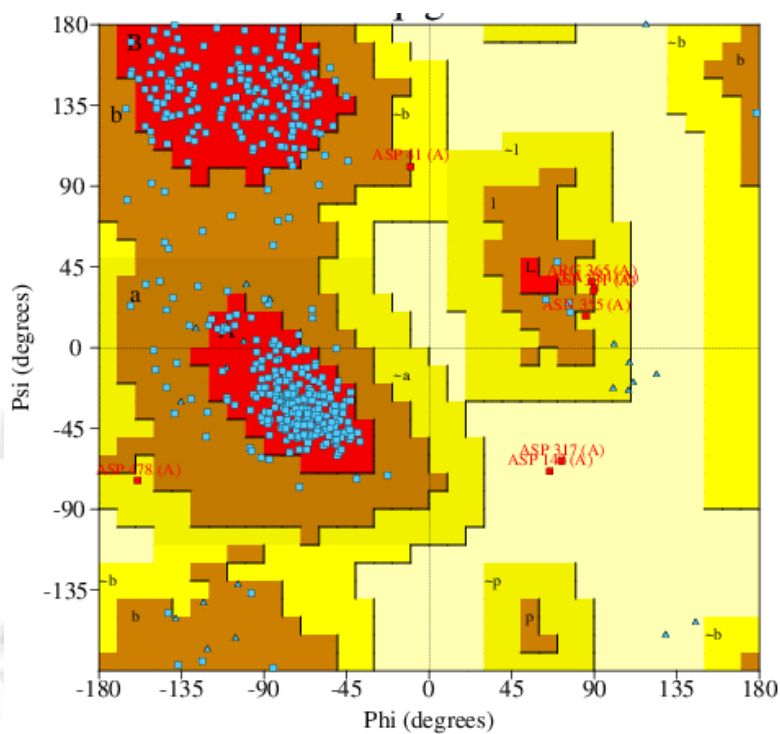


Figura 37: Ploteo de Ramachandran del complejo 1EJ9-GUM.

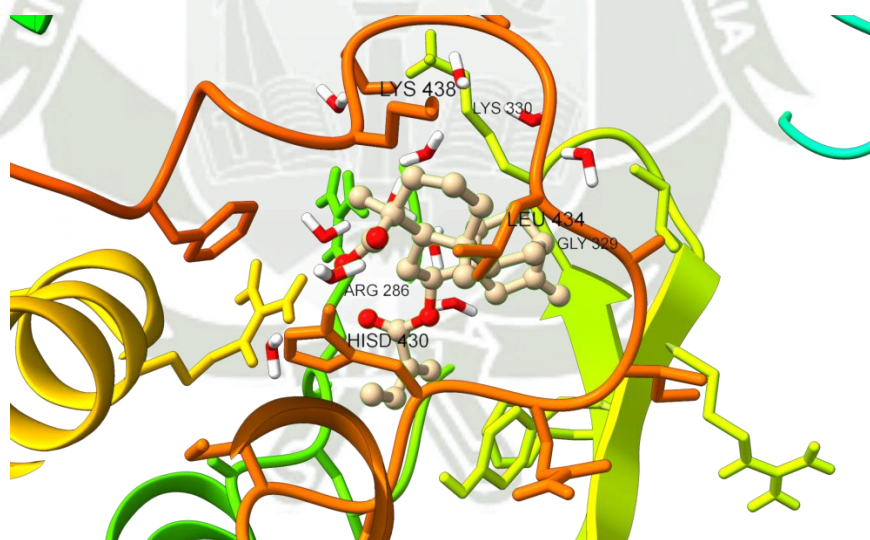


Figura 38: Complejo 1EJ9-GUM después de la simulación de MD.

Realizada la simulación de dinámica molecular el ácido gumíferólico se ubicó cerca de los aminoácidos HIS-632, ARG-488, LEU-716, LYS-720, LYS-532, LEU-716, GLY-531. Las etiquetas de la figura han sido corregidas para la secuencia real de TOP1 según Uniprot.

*ISOPIMARA-7,15-DIEN-3-ONA*

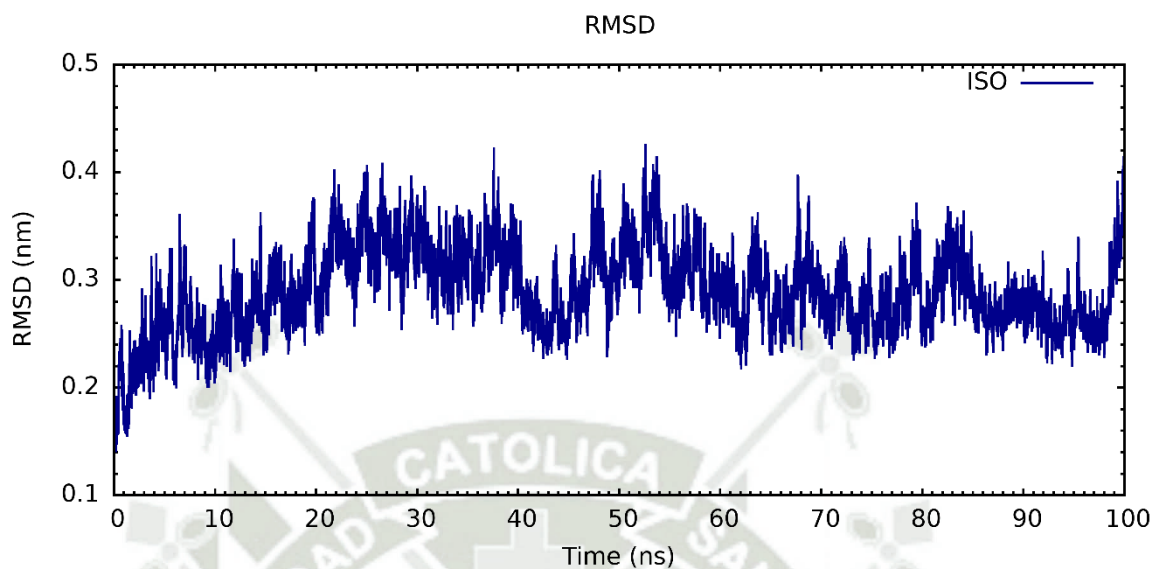


Figura 39: RMSD del complejo 1EJ9-ISO.

Se puede observar en el gráfico de RMSD que el complejo adopta una conformación estable durante toda la simulación. Estando el valor de RMSD dentro de un rango de 0.2 nm durante los 100ns. Esto nos indica que la estructura se ha equilibrado y que el movimiento dentro de la estructura es mínimo.

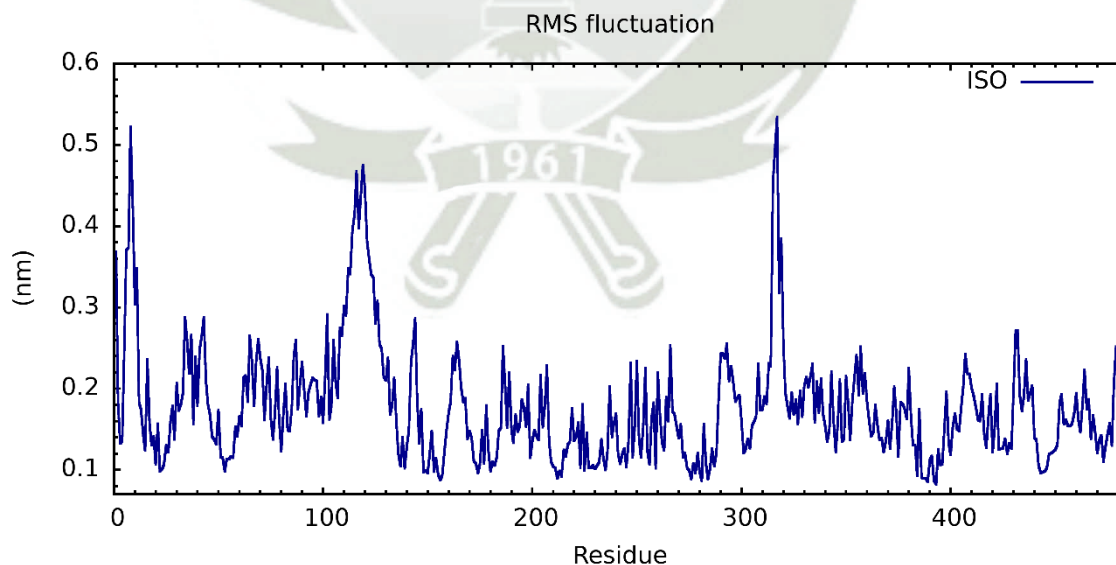


Figura 40: RMS del complejo 1EJ9-ISO.

Se puede observar en el gráfico de RMSF que el complejo presenta las mayores fluctuaciones en los primeros residuos aminoacídicos, lo cual es esperado, también se presentan fluctuaciones en las zonas de los residuos GLU-322 y GLU-522.

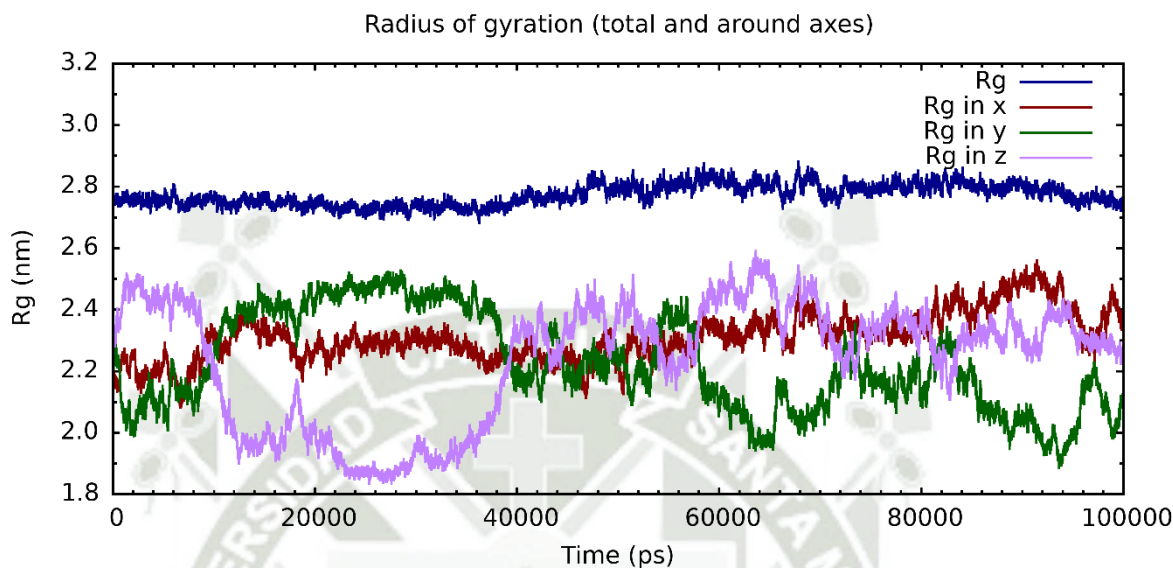


Figura 41: Radio de giro del complejo 1EJ9-ISO.

Se puede observar en el gráfico de radio de giro que el complejo fluctúa su volumen durante la simulación hasta los 72 ns en donde la estructura continúa compactándose de manera progresiva hasta el fin de la simulación. Podemos también observar que, respecto a las contribuciones al radio de giro en cada plano, el eje y y el eje z son lo que tienen una mayor contribución respecto al eje x.

Las estadísticas del ploteo de Ramachandran para el complejo 1EJ9-ISO muestran que 373 residuos correspondiente al 85.2% se encuentran en regiones muy favorecidas, 57 residuos correspondiente al 13.0% se encuentran en regiones adicionales permitidas, 6 residuos correspondiente al 1.4% se encuentran en regiones generosamente permitidas y 2 residuos correspondiente al 0.5% se encuentran en regiones no permitidas. Estos porcentajes corresponden a todos los residuos aminoacídicos que no son glicina o prolina para un total de 438 aminoácidos. 20 residuos de glicina y 23 residuos de prolina completan los 484 aminoácidos totales de la estructura del complejo.

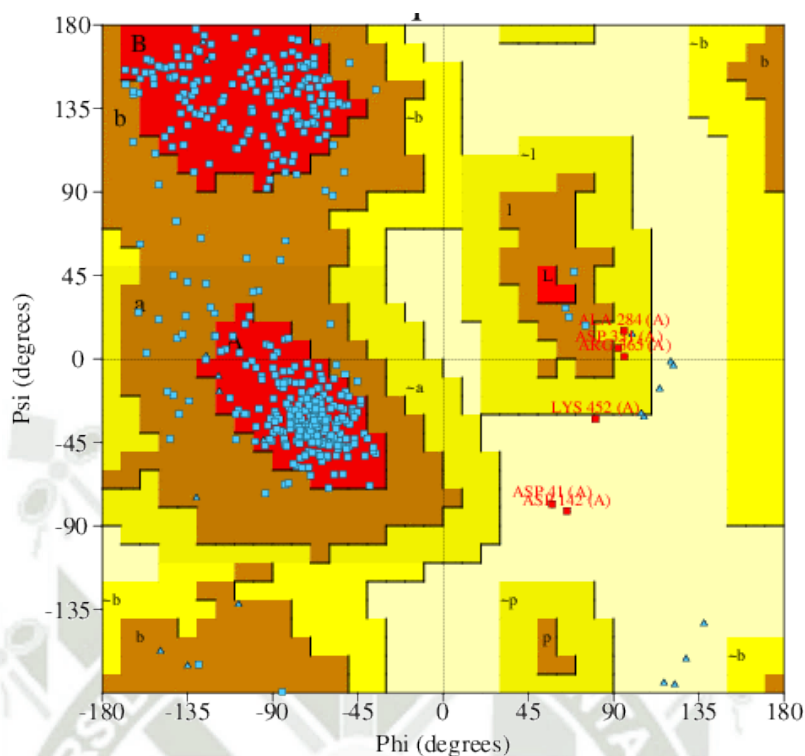


Figura 42: Ploteo de Ramachandran del complejo 1EJ9-ISO.

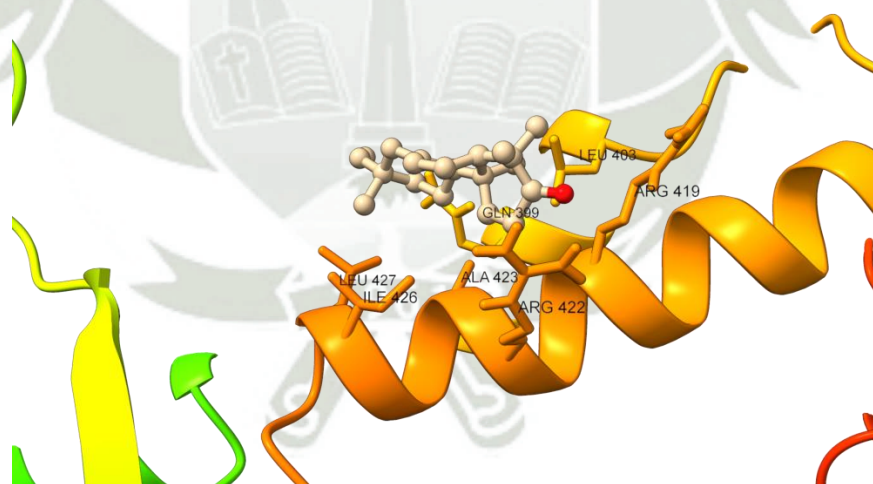


Figura 43: Complejo 1EJ9-ISO después de la simulación de MD.

Realizada la simulación de dinámica molecular el isopimara-7,15-dien-3-ona se ubicó cerca de los aminoácidos GLN-601, LEU-605, ARG-621, ARG-624, ALA-625, ILE-628, LEU-629. Las etiquetas de la figura han sido corregidas para la secuencia real de TOP1 según Uniprot.

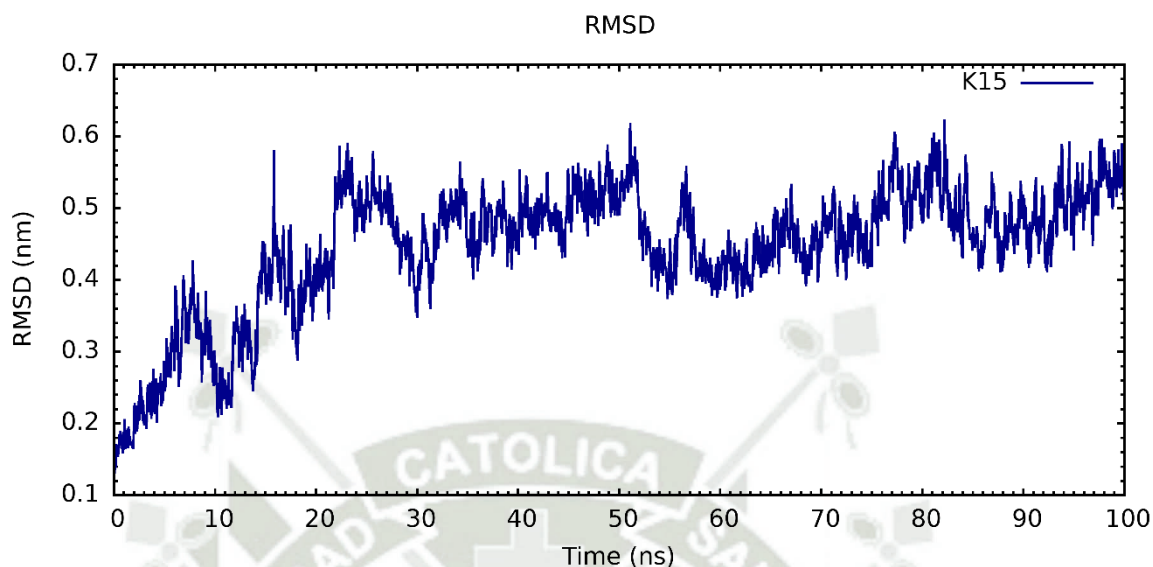
*KAURAN-15-OL*

Figura 44: RMSD del complejo 1EJ9-K15.

Se puede observar en el gráfico de RMSD que el complejo adopta una conformación estable aproximadamente a partir de los 75 ns. Quedando el valor de RSMD dentro de un rango de 0.2 nm por el resto de la simulación. Esto nos indica que se ha llegado a un estado de equilibrio y que el movimiento dentro de la estructura es mínimo.

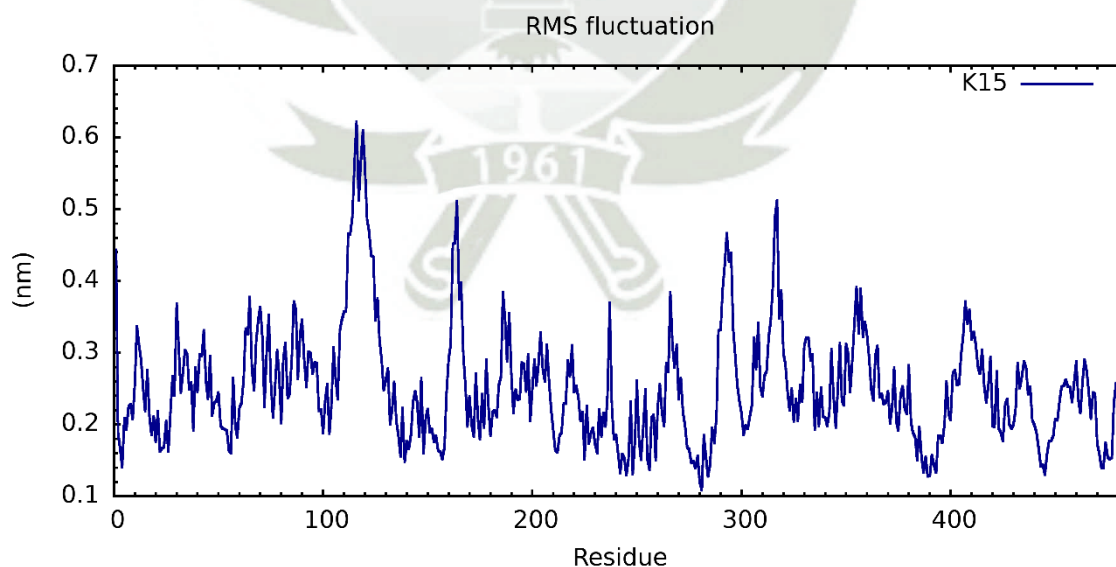


Figura 45: RMS del complejo 1EJ9-K15.

Se puede observar en el gráfico de RMSF que el complejo presenta las mayores fluctuaciones en los primeros residuos aminoacídicos, lo cual es esperado, también se

presentan fluctuaciones en la zona del residuo GLU-322 y fluctuaciones menores en las zonas cercanas a HIS-367 y GLU-522.

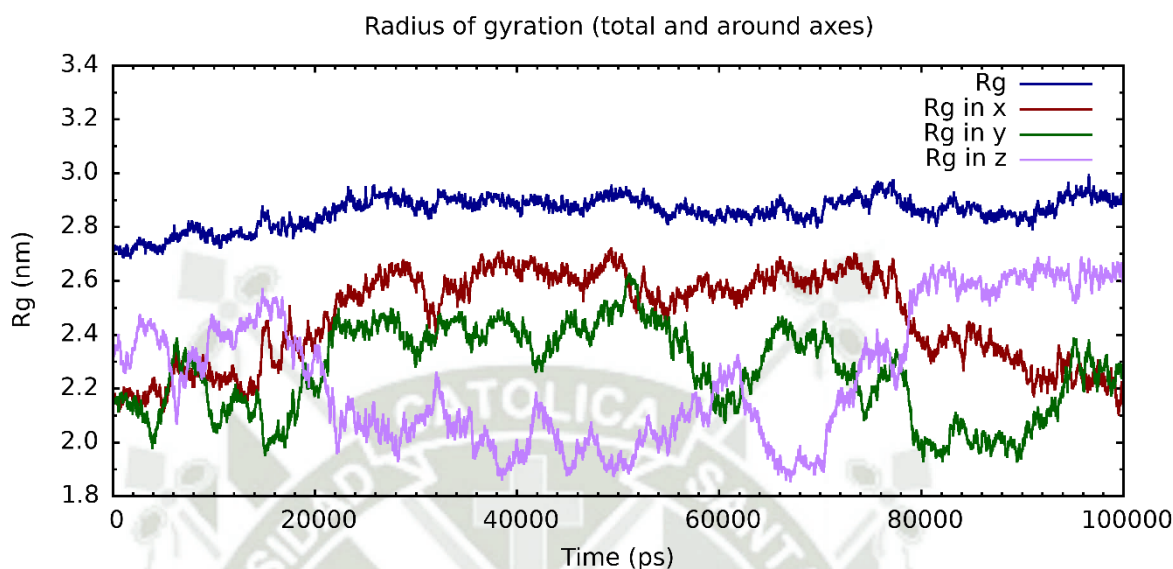


Figura 46: Radio de giro del complejo 1EJ9-K15.

Se puede observar en el gráfico de radio de giro que el complejo fluctúa su volumen durante toda la simulación, la estructura continúa compactándose y expandiéndose de manera progresiva hasta el fin de la simulación. Dando a entender que se generan y se rompen puentes de hidrógeno durante la simulación. Podemos también observar que, respecto a las contribuciones al radio de giro en cada plano, el eje x es el que tiene una mayor contribución seguido del eje z.

Las estadísticas del ploteo de Ramachandran para el complejo 1EJ9-K15 muestran que 356 residuos correspondiente al 81.3% se encuentran en regiones muy favorecidas, 76 residuos correspondiente al 17.4% se encuentran en regiones adicionales permitidas, 4 residuos correspondiente al 0.9% se encuentran en regiones generosamente permitidas y 2 residuos correspondiente al 0.5% se encuentran en regiones no permitidas. Estos porcentajes corresponden a todos los residuos aminoacídicos que no son glicina o prolina para un total de 438 aminoácidos. 20 residuos de glicina y 23 residuos de prolina completan los 484 aminoácidos totales de la estructura del complejo.

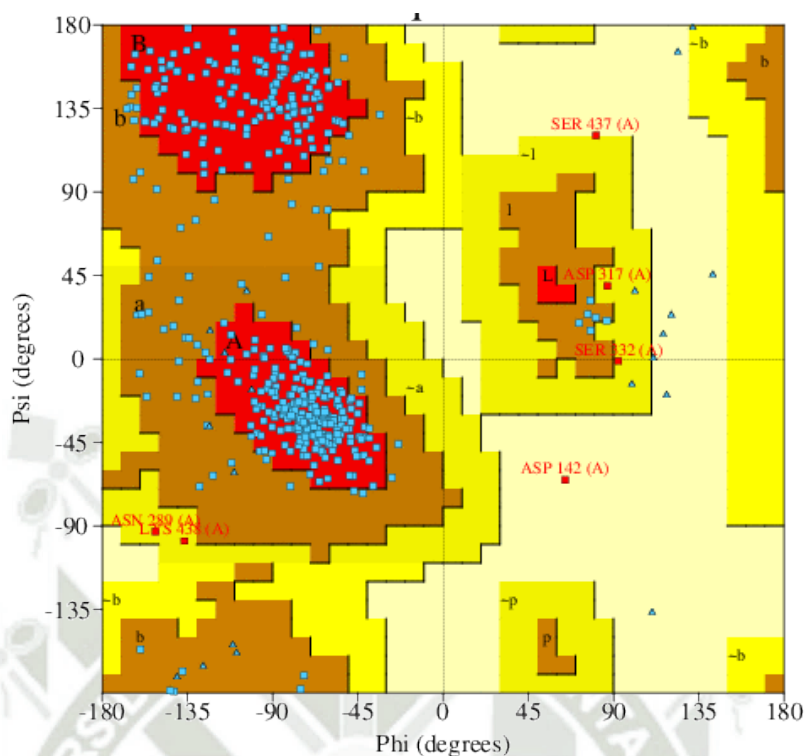


Figura 47: Ploteo de Ramachandran del complejo 1EJ9-K15.

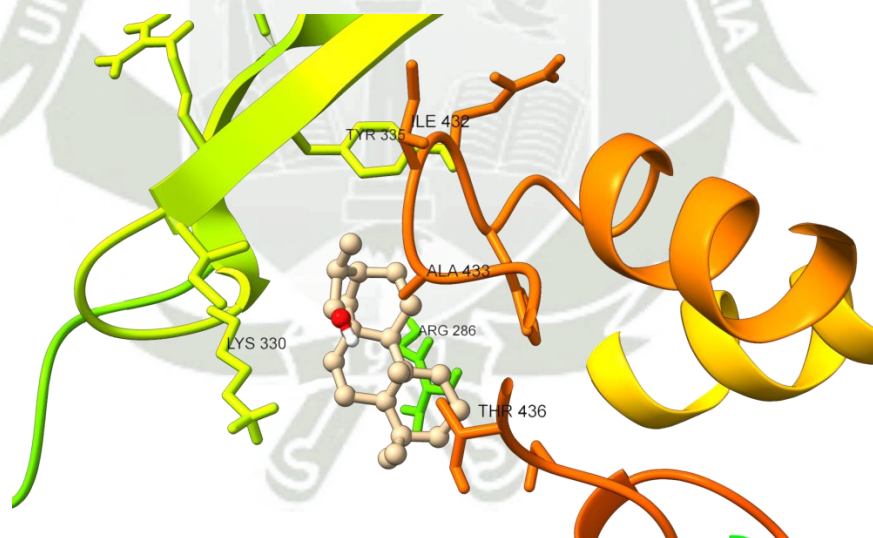


Figura 48: Complejo 1EJ9-K15 después de la simulación de MD.

Realizada la simulación de dinámica molecular el kauran-15-ol se ubicó cerca de los aminoácidos ARG-488, LYS-532, TYR-537, ILE-714, ALA-715, THR-718. Las etiquetas de la figura han sido corregidas para la secuencia real de TOP1 según Uniprot.

*KAURAN-16-OL*

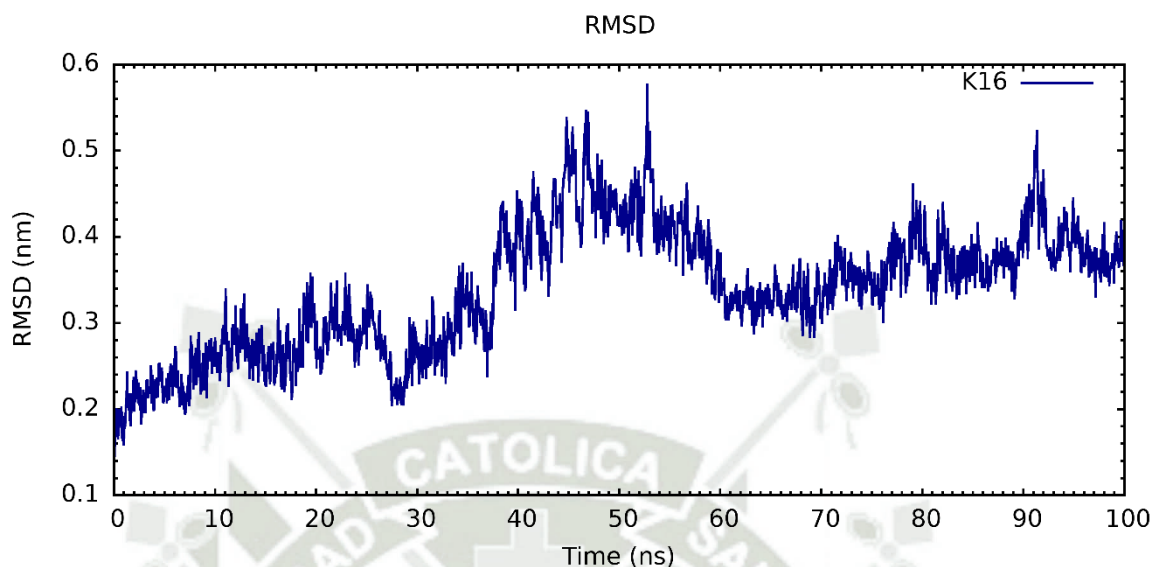


Figura 49: RMSD del complejo 1EJ9-K16.

Se puede observar en el gráfico de RMSD que el complejo adopta una conformación estable aproximadamente a partir de los 90 ns. Quedando el valor de RSMD dentro de un rango de 0.2 nm por el resto de la simulación. Esto nos indica que se ha llegado a un estado de equilibrio y que el movimiento dentro de la estructura es mínimo.

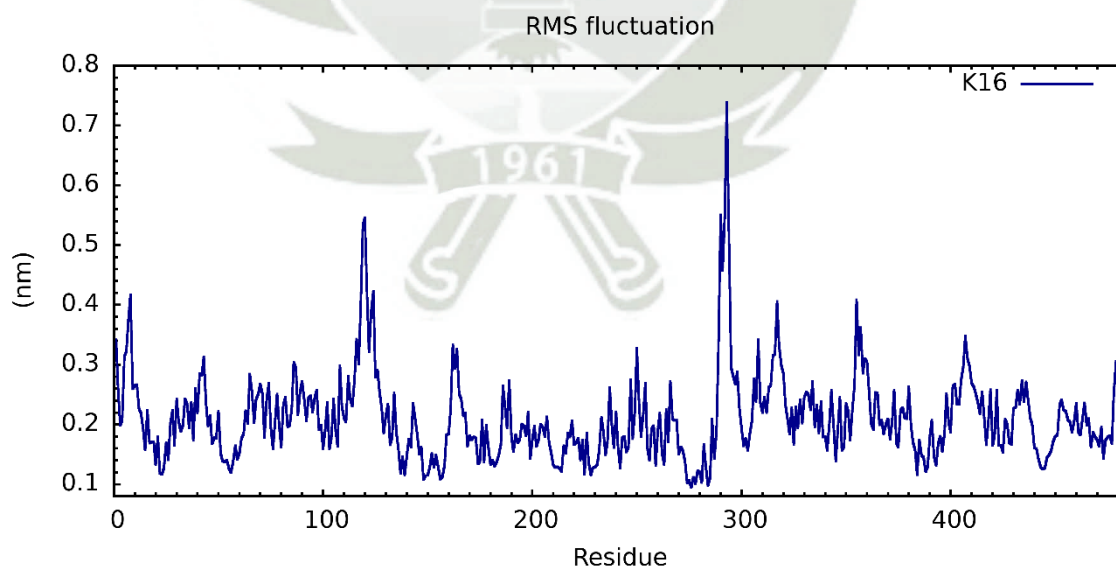


Figura 50: RMS del complejo 1EJ9-K16.

Se puede observar en el gráfico de RMSF que el complejo presenta las mayores fluctuaciones en los primeros residuos aminoacídicos, lo cual es esperado, también se

presentan fluctuaciones menores en la zona del residuo GLU-322 y una fluctuación mayor en la zona cercana a GLU-492.

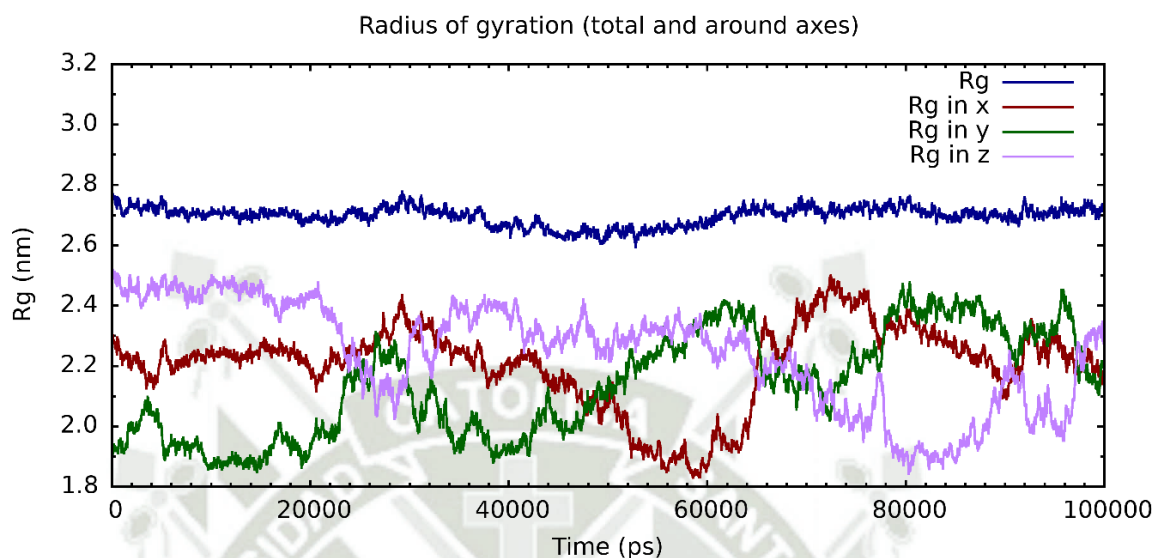


Figura 51: Radio de giro del complejo 1EJ9-K16.

Se puede observar en el gráfico de radio de giro que el complejo fluctúa su volumen durante toda la simulación, la estructura continúa compactándose y expandiéndose de manera progresiva hasta los 80 ns y a partir de ahí la compactación se estabiliza hasta el fin de la simulación. Podemos también observar que, respecto a las contribuciones al radio de giro en cada plano, el eje z es el que tiene una mayor contribución seguido del eje y.

Las estadísticas del ploteo de Ramachandran para el complejo 1EJ9-K16 muestran que 374 residuos correspondiente al 85.4% se encuentran en regiones muy favorecidas, 58 residuos correspondiente al 13.2% se encuentran en regiones adicionales permitidas, 5 residuos correspondiente al 1.1% se encuentran en regiones generosamente permitidas y 1 residuos correspondiente al 0.2% se encuentran en regiones no permitidas. Estos porcentajes corresponden a todos los residuos aminoacídicos que no son glicina o prolina para un total de 438 aminoácidos. 20 residuos de glicina y 23 residuos de prolina completan los 484 aminoácidos totales de la estructura del complejo.

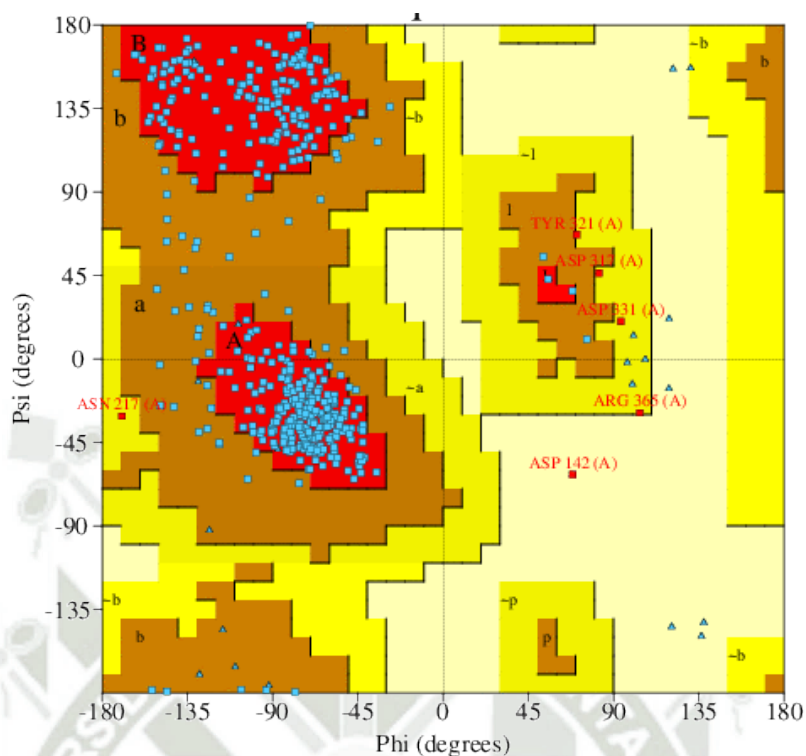


Figura 52: Ploteo de Ramachandran del complejo 1EJ9-K16.

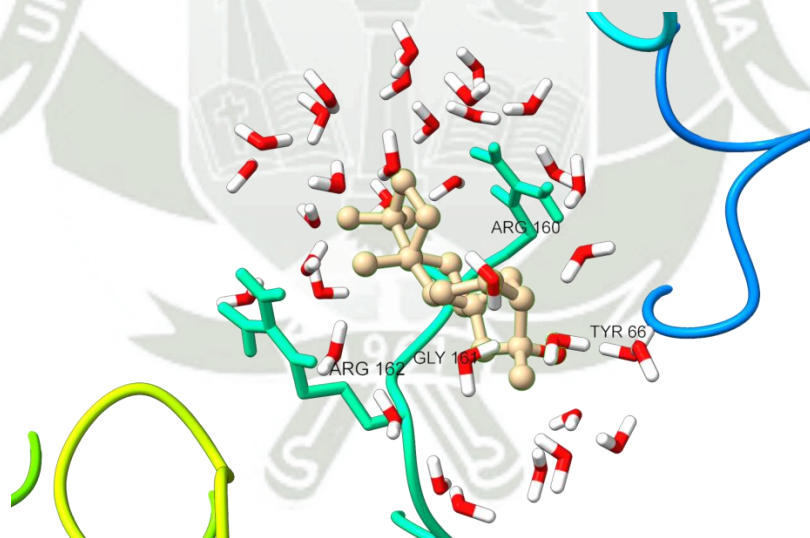


Figura 53: Complejo 1EJ9-K16 después de la simulación de MD.

Realizada la simulación de dinámica molecular el kauran-16-ol se ubicó cerca de los aminoácidos TYR-268, ARG-362, GLY-363, ARG-364. Las etiquetas de la figura han sido corregidas para la secuencia real de TOP1 según Uniprot.

### 3.5 INTERACCIONES PROTEÍNA-LIGANDO

#### ÁCIDO GUMIFERÓLICO

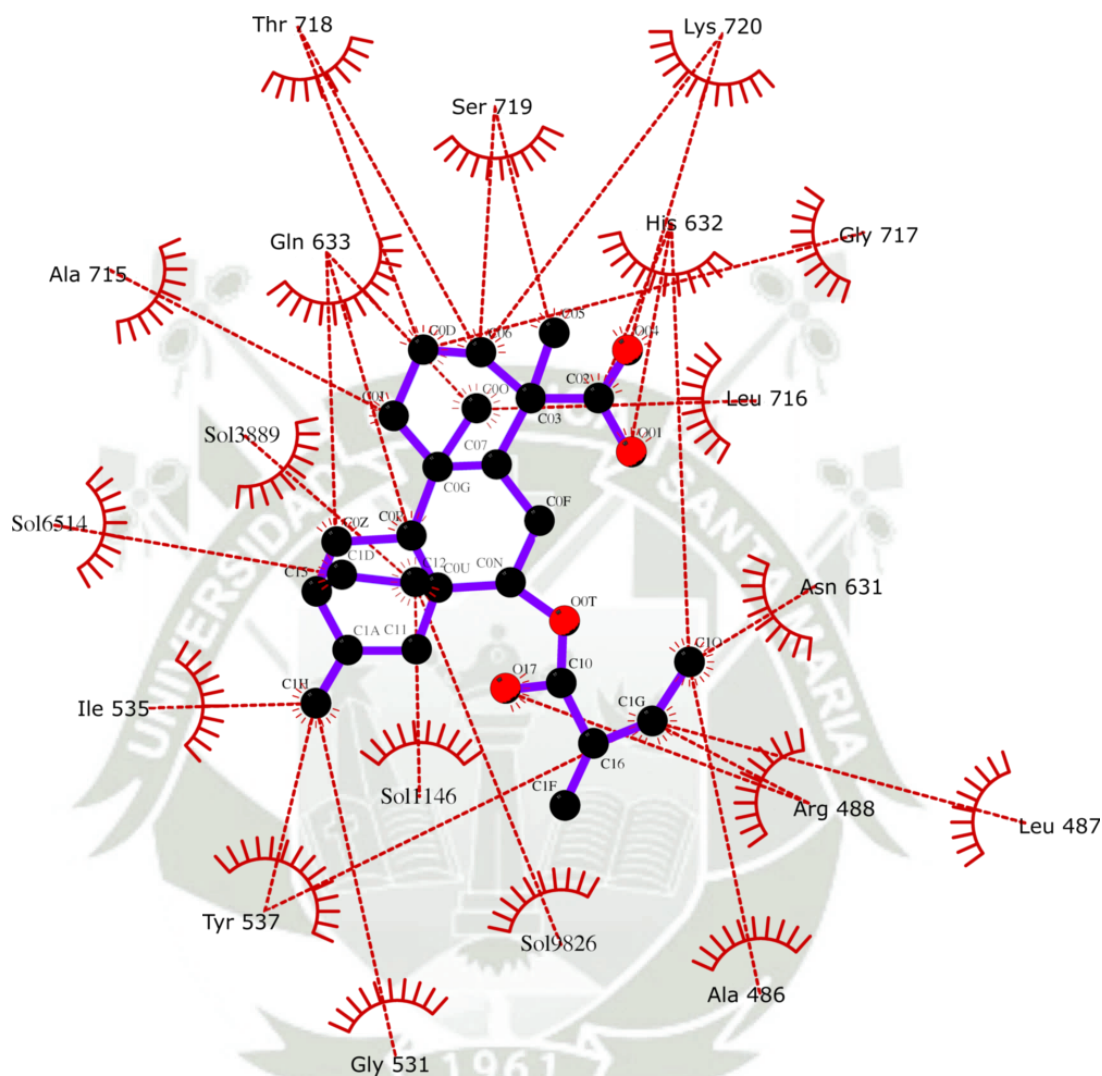


Figura 54: Mapa de interacciones del complejo 1EJ9-GUM.

El ligando ácido Gumíferólico presenta interacciones hidrofóbicas con residuos pertenecientes al sitio activo (Arg 488, His 632) y/o cercanos a uno de estos residuos (Gly 531 adyacente al residuo activo Lys 532). Se puede destacar la interacción entre el átomo de oxígeno del grupo carboxilo y el aminoácido His 632 y la interacción de otro átomo de oxígeno del ligando con Arg 488. Estas interacciones pueden significar que el ligando compita por el sitio de unión a la enzima o interfiera con la interacción enzima-ADN. Generando así inhibición enzimática competitiva.

Este ligando se unió en los bolsillos generados por los servidores ProteinPlus (2,3 y 5), D3Pockets y POCASA (2).

*ISOPIMARA-7,15-DIEN-3-ONA*

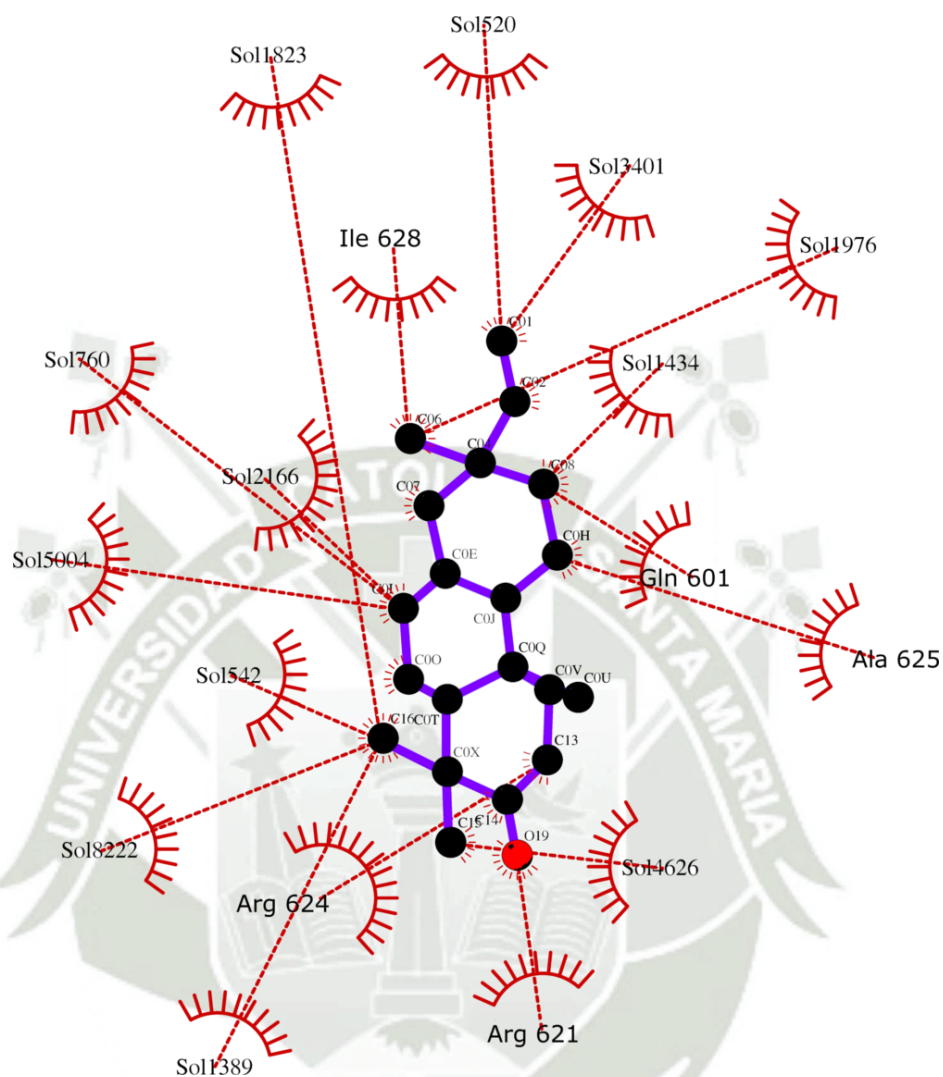


Figura 55: Mapa de interacciones del complejo 1EJ9-ISO.

El ligando isopimara-7,15-dien-3-ona presenta interacciones hidrofóbicas con residuos en la región CAT y la región C terminal. Ninguno de estos residuos forma parte del centro catalítico, sin embargo, podrían generar un cambio conformacional que dé lugar a una inhibición alostérica.

*KAURAN-15-OL*

El ligando kauran-15-ol presenta interacciones hidrofóbicas con residuos en la región CAT y la región C terminal. Ninguno de estos residuos forma parte del centro catalítico, sin embargo, podrían generar un cambio conformacional que dé lugar a una inhibición alostérica. Se debe notar que se generan interacciones con los aminoácidos Gly 531 y Gln

632, los cuales son adyacentes a residuos del centro catalítico, por lo que también podría darse una inhibición competitiva.

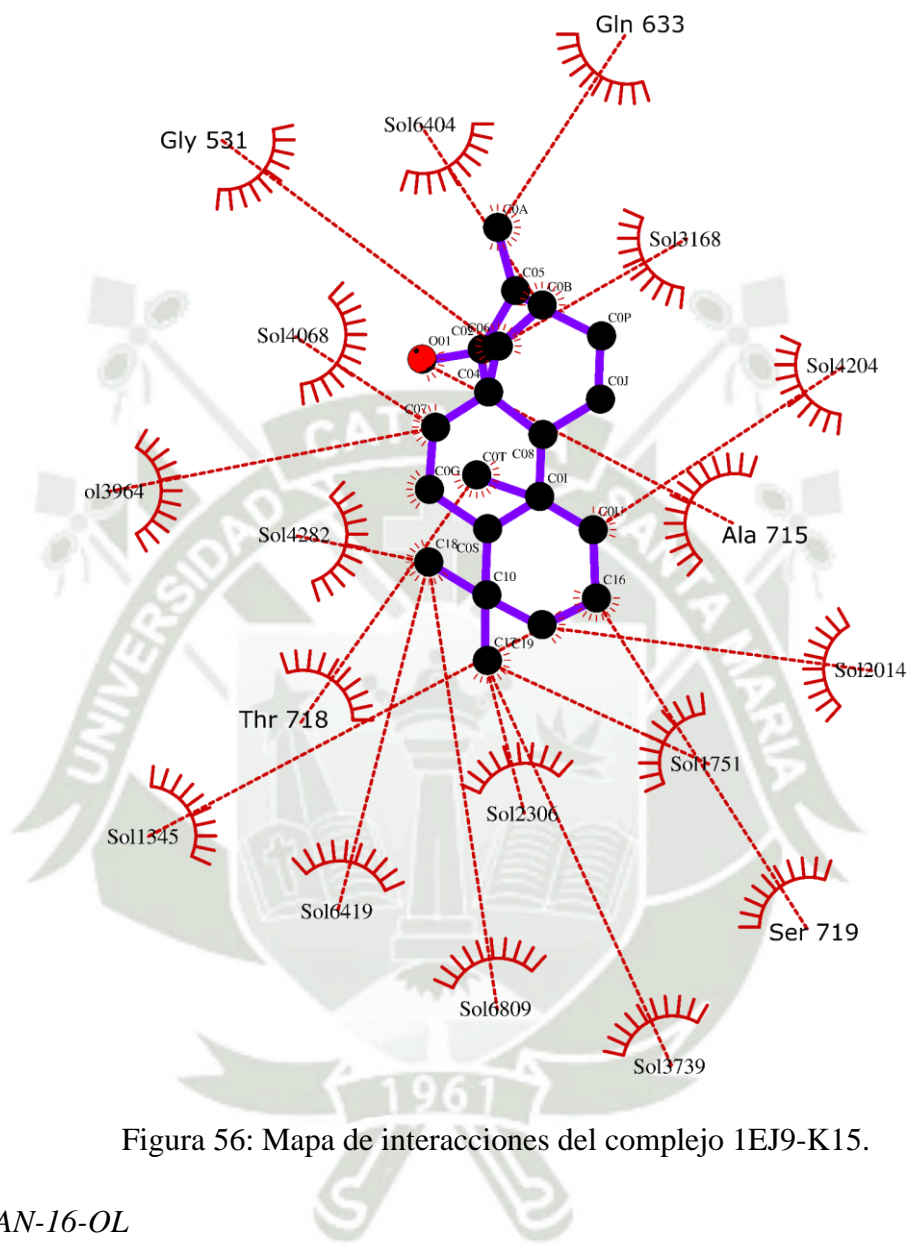


Figura 56: Mapa de interacciones del complejo 1EJ9-K15.

#### *KAURAN-16-OL*

El ligando kauran-16-ol presenta interacciones hidrofóbicas con residuos en la región CAP. Ninguno de estos residuos forma parte del centro catalítico, sin embargo, podrían generar un cambio conformacional que dé lugar a una inhibición alostérica.

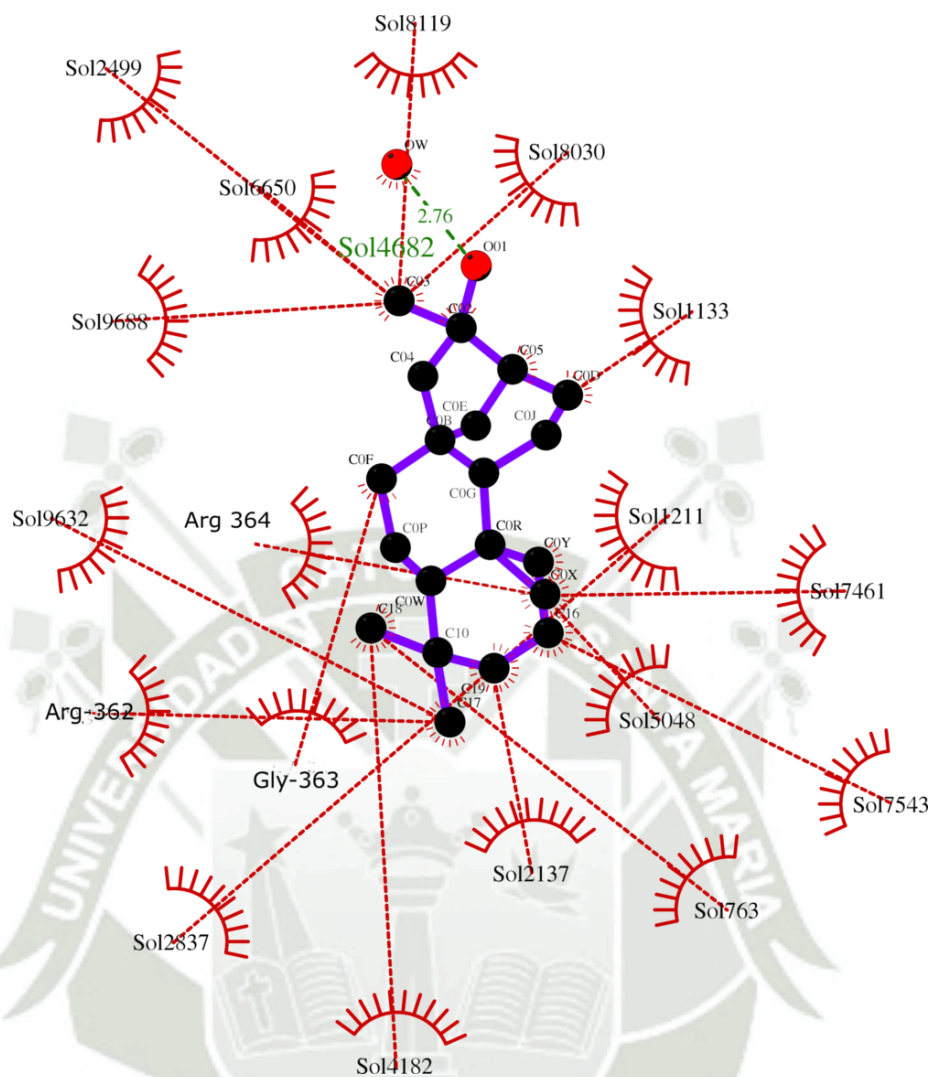


Figura 57: Mapa de interacción del complejo 1EJ9-K16.

### 3.6 ANALISIS MM-BPSA

Tabla 10: Energía de unión de los complejos.

Ligando	Energía de unión
GUM	-91.3851 ± 5.0839 Kcal/mol
ISO	-47.4095 ± 8.5241 Kcal/mol
K15	-59.0608 ± 5.9689 Kcal/mol
K16	-43.7085 ± 7.8160 Kcal/mol

Tabla 11: Constantes de inhibición de los complejos.

Constante de Inhibición (K)	
GUM	3.44443E+64
ISO	3.02727E+33
K15	5.12059E+41
K16	7.36819E+30

Las tablas nos muestran que el ácido Gumiferólico es el ligando con más energía de unión de los cuatro ligandos propuestos, de la misma manera es el ácido Gumiferólico presenta la constante de inhibición más alta de los cuatro ligandos.

Considerando todos los datos obtenidos podemos ver que el ácido Gumiferólico presentaría las condiciones más favorables de los cuatro ligandos propuestos para ser un inhibidor de la topoisomerasa I humana. El ácido Gumiferólico (GUM) forma un complejo con la enzima dentro de algunos de los bolsillos propuestos por los tres servidores utilizados; además de acuerdo con sus gráficos de RSMD, RMSF y radio de giro, dicho complejo se mantiene estable en el tiempo. Tras la simulación de dinámica molecular el ácido Gumiferólico permaneció dentro de los bolsillos predichos y presentó interacciones hidrofóbicas con varios aminoácidos de TOP1 incluyendo Arg-488 e His-632; aminoácidos del centro catalítico de la enzima, además de Gly-531, residuo adyacente a Lys-532 que forma parte del centro catalítico. Asimismo, el análisis por MM-PBSA devolvió una energía de unión y una constante de inhibición elevadas para este ligando. Por lo que podría decirse que el ácido Gumiferólico inhibe de manera competitiva a la enzima topoisomerasa I por interacciones con aminoácidos del centro catalítico.

Respecto a los otros ligandos, si bien las estructuras formadas son estables y también permanecieron dentro de los bolsillos predichos durante la simulación de dinámica molecular no se encontraron interacciones con aminoácidos del sitio catalítico, aunque es posible que las interacciones encontradas puedan generar algún tipo de inhibición alostérica; aunque sus energías de unión y constantes de inhibición son menores a las mostradas por el ácido Gumiferólico.

## CONCLUSIONES

- Se consiguió generar modelos moleculares de TOP1, y los ligandos kauran-15-ol, kauran-16-ol, ácido Gumiferólico e isopimara-7,15-dien-3-ona, los cuales fueron satisfactoriamente encontrados en las bases de datos PDB y Pubchem.
- Se consiguió determinar las estructuras equilibradas de la enzima TOP1 y los ligandos propuestos utilizando los softwares GROMACS y Gaussian16; estas estructuras son aptas para la búsqueda de bolsillos drugables, el docking molecular y posterior dinámica molecular de los complejos formados.
- Utilizando tres servidores web, se localizaron quince sitios drugables en TOP1, estos bolsillos fueron los mejores rankeados en cada servidor y pudieron predecir efectivamente el sitio de unión de los ligandos después del docking molecular.
- Realizada la simulación de dinámica molecular, se pudo encontrar que el ácido Gumiferólico es el ligando con mayor constante de inhibición y generaba interacciones con aminoácidos del sitio catalítico de la enzima TOP1; por lo que se puede proponer un mecanismo de inhibición competitiva para este ligando. Las menores constantes de inhibición de los demás ligandos e interacciones con residuos que no son del centro catalítico sugerirían una posible inhibición alostérica.
- El uso de herramientas bioinformáticas nos permitió analizar la interacción entre cuatro ligandos y la enzima TOP1 humana; consiguiendo encontrar un posible inhibidor competitivo de dicha enzima en el ligando ácido gumiferólico.

## RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos se recomienda:

- Realizar una investigación complementaria utilizando los ligandos y una estructura complejo TOP1-ADN; para determinar una posible inhibición por envenenamiento.
- Realizar un *virtual screening* con el objetivo de encontrar sustancias similares al ácido gumiferólico y que puedan ser probadas para actividad anti-topoisomerasa.
- Realizar una investigación cristalográfica para generar un modelo del complejo TOP1-GUM.
- Realizar una investigación *in vitro* para estudiar a mayor profundidad la inhibición de TOP1 por parte de los ligandos.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Encina CL, Martin EC, Lopez AA, Padilla IMG. Biotechnology applied to Annona species: a review. *Rev Bras Frutic.* 2014;36:17-21.
2. Ministerio de Agricultura y Riego - Perú. Boletín Mensual El Agro en Cifras Mes: Diciembre 2022. [Internet]. 2022. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/portal/>.
3. Rodríguez-Núñez JR, Campos-Rojas E, Andrés-Agustín J, Alía-Tejacal I, Ortega-Acosta SA, Peña-Caballero V, et al. Distribution, eco-climatic characterisation, and potential growing regions of *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae) in Mexico. *Ethnobiology and Conservation* [Internet]. 1 de enero de 2021;10.
4. Limas JC, Cook JG. Preparation for DNA replication: the key to a successful S phase. *FEBS Letters.* 2019;593(20):2853-67.
5. Hajizadeh M, Moosavi-Movahedi Z, Sheibani N, Moosavi-Movahedi AA. An outlook on suicide enzyme inhibition and drug design. *J IRAN CHEM SOC.* 1 de mayo de 2022;19(5):1575-92.
6. Ying Xia, Chun-Qiu Xia, Xiaoyong Pan, Hong-Bin Shen, BindWeb: a web server for ligand binding residue and bolsillo prediction from protein structures. *Protein Science.* 2022;31(12):e4462.
7. Páll, et al. (2020) *J. Chem. Phys.* 153, 134110 (DOI:10.1063/5.0018516)
8. Abraham, et al. (2015) *SoftwareX* 1-2 19-25 (DOI:10.1016/j.softx.2015.06.001)
9. Páll, et al. (2015) *Proc. of EASC 2015 LNCS*, 8759 3-27. (DOI:10.1007/978-3-319-15976-8\_1)
10. Pronk, et al. (2013) *Bioinformatics* 29 845-854. (DOI:10.1093/bioinformatics/btt055)
11. Hess, et al. (2008) *J. Chem. Theory Comput.* 4: 435-447. (DOI:10.1021/ct700301q)
12. van der Spoel, et al. (2005) *J. Comput. Chem.* 26: 1701-1718. (DOI:10.1002/jcc.20291 )
13. Lindahl, et al. (2001) *J. Mol. Model.* 7: 306-317. (DOI:10.1007/s008940100045)
14. Berendsen, et al. (1995) *Comp. Phys. Comm.* 91: 43-56. (DOI:10.1016/0010-4655(95)00042-E)
15. Zhaoqiang Chen, Xinben Zhang, Cheng Peng, Jinan Wang, Zhijian Xu, Kaixian Chen, Jiye Shi, Weiliang Zhu, D3Pockets: A Method and Web Server for Systematic Analysis of Protein bolsillo Dynamics. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, 59, 8, 3353–3358. DOI:<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00332>
16. Schöning-Stierand, K.; Diedrich, K.; Ehrt, C.; Flachsenberg, F.; Graef, J.; Sieg, J.; Penner, P.; Poppinga, M.; Ungethüm, A.; Rarey, M. (2022). *ProteinsPlus: a comprehensive*

- collection of web-based molecular modeling tools. *Nucleic Acids Research*, 50:W611-W615.
17. Schöning-Stierand, K.; Diedrich, K.; Fährrolfes, R.; Flachsenberg, F.; Meyder, A.; Nittinger, E.; Steinegger, R.; Rarey, M. (2020). ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Research*, 48:W48-W53.
  18. Fährrolfes, R.; Bietz, S.; Flachsenberg, F.; Meyder, A.; Nittinger, E.; Otto, T.; Volkamer, A.; Rarey, M. (2017). ProteinsPlus: a web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 45:W337-W343.
  19. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J. Chem. Inf. Model.* 2012,52,360-372. Bietz, S.; Rarey, M. (2016).
  20. Binding Site Detection Remastered: Enabling Fast, Robust, and Reliable Binding Site Detection and Descriptor Calculation with DoGSite3. *J. Chem. Inf. Model.*, doi: 10.1021/acs.jcim.3c00336
  21. Gaussian 16, Revision C.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
  22. <https://gaussian.com/g16main/>
  23. J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, and S. Forli. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*
  24. O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461

25. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 15541536, Isopimara-7,15-dien-3-one" *PubChem*, [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isopimara-7\\_15-dien-3-one](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isopimara-7_15-dien-3-one).
26. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 623309, Kauran-16-ol" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kauran-16-ol>.
27. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 101629837, Kauran-15alpha-ol" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kauran-15alpha-ol>.
28. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 101316950, Gummiferolic acid" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gummiferolic-acid>.
29. Campbell, Mary K. *Bioquímica*. Cengage Learning, 2016.
30. Solomon E, Martin D. *Biología*. México, D.F.: Cengage Learning; 2013
31. Leite DOD, Nonato C de FA, Camilo CJ, Carvalho NKG de, Nobrega MGLA da, Pereira RC, et al. Annona Genus: Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities. *Current Pharmaceutical Design*. 2020 26(33):4056-91.
32. Monica R. Loizzo, Rosa Tundis, Marco Bonesi, Federica Menichini, Vincenzo Mastellone, Luigi Avallone, Francesco Menichini. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis* Volume 25, Issue 2, March 2012, Pages 179-184
33. Gaytri Gupta-Elera, Andrew R. Garrett, Andres Martinez, Richard A. Robison, Kim L. O'Neill. The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. *Food Research International*. 1 de agosto de 2011;44(7):2205-9.
34. Boudjedir A, Kraim K, Saihi Y, Attoui-Yahia O, Ferkous F, Khorief Nacereddine A. A computational molecular docking study of camptothecin similars as inhibitors for topoisomerase 1. *Struct Chem*. 1 de abril de 2021;32(2):689-97.
35. Jadaun A, Subbarao N, Dixit A. Allosteric inhibition of topoisomerase I by pinostrobin: Molecular docking, spectroscopic and topoisomerase I activity studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. febrero de 2017;167:299-308.
36. Durán AG, Gutiérrez MT, Mejías FJR, Molinillo JMG, Macías FA. An Overview of the Chemical Characteristics, Bioactivity and Achievements Regarding the Therapeutic Usage of Acetogenins from *Annona cherimola* Mill. *Molecules*. enero de 2021;26(10):2926.

37. Haykal T, Nasr P, Hodroj MH, Taleb RI, Sarkis R, Moujabber MNE, et al. Annona cherimola Seed Extract Activates Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways in Leukemic Cells. *Toxins*. septiembre de 2019;11(9):506.
38. Calzadax F, Calzada F, Solares-Pascasio J, Ordoñez-Razox RM, Ordoñez-Razo RM, Velazquez C, et al. Antihyperglycemic Activity of the Leaves from Annona cherimola Miller and Rutin on Alloxan-induced Diabetic Rats. *Pharmacognosy Research*. 2017;9(1):1-6.
39. Fuel M, Mesas C, Martínez R, Ortiz R, Quiñonero F, Prados J, et al. Antioxidant and antiproliferative potential of ethanolic extracts from Moringa oleifera, Tropaeolum tuberosum and Annona cherimola in colorrectal cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. noviembre de 2021;143:112248.
40. Razura-Carmona FF, Montalvo-González E, Ramírez-Mares MV, Bueno-Durán AY, Sáyago-Ayerdi SG, Gasga VMZ, et al. Antioxidant capacity, antitopoisomerase activity and secondary metabolites identification in extracts of Cherimoya pulp (Annona cherimola Mill). *Revista Bio Ciencias*. 17 de septiembre de 2021;8:14 pág-14 pág.
41. Baechler SA, Dalla Rosa I, Spinazzola A, Pommier Y. Beyond the unwinding: role of TOP1MT in mitochondrial translation. *Cell Cycle*. 9 de agosto de 2019;18(19):2377-84.
42. Perrone A, Yousefi S, Salami A, Papini A, Martinelli F. Botanical, genetic, phytochemical and pharmaceutical aspects of Annona cherimola Mill. *Scientia Horticulturae*. abril de 2022;296:110896.
43. Rojas-García A, Rodríguez L, Cádiz-Gurrea M de la L, García-Villegas A, Fuentes E, Villegas-Aguilar M del C, et al. Determination of the Bioactive Effect of Custard Apple By-Products by In Vitro Assays. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2022;23(16):9238.
44. Miyashita H, Nishida M, Okawa M, Nohara T, Yoshimitsu H. Four New ent-Kaurane Diterpenoids from the Fruits of Annona cherimola. *Chem Pharm Bull*. 2010;58(5):765-8.
45. García-Salas P, Gómez-Caravaca AM, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of Annona cherimola and its by-products by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Research International*. diciembre de 2015;78:246-57.
46. Al Kazman BSM, Harnett JE, Hanrahan JR. Identification of Annonaceous Acetogenins and Alkaloids from the Leaves, Pulp, and Seeds of Annona atemoya. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2023;24(3):2294.

47. Periferakis A, Periferakis K, Badarau IA, Petran EM, Popa DC, Caruntu A, et al. Kaempferol: Antimicrobial Properties, Sources, Clinical, and Traditional Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2022;23(23):15054.
48. Albuquerque TG, Santos F, Sanches-Silva A, Beatriz Oliveira M, Bento AC, Costa HS. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. *Food Chemistry*. febrero de 2016;193:187-95.
49. Al-Shaya HM, Li H, Beg OU, Hamama AA, Witiak SM, Kaseloo P, et al. Phytochemical profile and antioxidation activity of annona fruit and its effect on lymphoma cell proliferation. *Food Science & Nutrition*. 2020;8(1):58-68.
50. Gentile C, Mannino G, Palazzolo E, Gianguzzi G, Perrone A, Serio G, et al. Pomological, Sensorial, Nutritional and Nutraceutical Profile of Seven Cultivars of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill). *Foods*. enero de 2021;10(1):35.
51. Santos SAO, Vilela C, Camacho JF, Cordeiro N, Gouveia M, Freire CSR, et al. Profiling of lipophilic and phenolic phytochemicals of four cultivars from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Food Chemistry*. noviembre de 2016;211:845-52.
52. Chowdhury SS, Tareq AM, Tareq SM, Farhad S, Sayeed MA. Screening of antidiabetic and antioxidant potential along with phytochemicals of *Annona* genus: a review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 19 de julio de 2021;7(1):144.
53. Kazman BSMA, Harnett JE, Hanrahan JR. The Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Annona atemoya*: A Systematic Review. *Pharmaceuticals*. octubre de 2020;13(10):269.
54. Younes M, Ammouy C, Haykal T, Nasr L, Sarkis R, Rizk S. The selective anti-proliferative and pro-apoptotic effect of *A. cherimola* on MDA-MB-231 breast cancer cell line. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 13 de noviembre de 2020;20(1):343.
55. Takahashi DT, Gadelle D, Agama K, Kiselev E, Zhang H, Yab E, et al. Topoisomerase I (TOP1) dynamics: conformational transition from open to closed states. *Nat Commun*. 10 de enero de 2022;13(1):59.
56. Al Kazman BSM, Harnett JE, Hanrahan JR. Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities of *Annonaceae*. *Molecules*. enero de 2022;27(11):3462.
57. Puccio S, Perrone A, Sortino G, Gianguzzi G, Gentile C, Farina V, et al. Yield, pomological characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of *Annona cherimola* Mill. grown in mediterranean climate. *AIMSAGRI*. 2019;4(3):592-603.

58. Kalyaanamoorthy S, Chen YPP. Modelling and enhanced molecular dynamics to steer structure-based drug discovery. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. mayo de 2014;114(3):123-36.
59. Cerutti DS, Case DA. Molecular dynamics simulations of macromolecular crystals. *WIREs Comput Mol Sci* [Internet]. julio de 2019 ;9(4). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wcms.1402>
60. Reuswig KU, Pfander B. Control of Eukaryotic DNA Replication Initiation—Mechanisms to Ensure Smooth Transitions. *Genes*. febrero de 2019;10(2):99.
61. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank (2000) *Nucleic Acids Research* 28: 235-242 <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>. RCSB.org
62. Redinbo MR, Champoux JJ, Hol WGJ. Novel Insights into Catalytic Mechanism from a Crystal Structure of Human Topoisomerase I in Complex with DNA. *Biochemistry*. 1 de junio de 2000;39(23):6832-40.
63. Yu, Y. Zhou, I. Tanaka, M. Yao, Roll: A new algorithm for the detection of protein bolsillos and cavities with a rolling probe sphere. *Bioinformatics*, (2010) **26**(1), 46-52,
64. Kumari *et al* . g\_mmpbsa - A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* (2014) 54:1951-1962.
65. Baker *et al*. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001) 98:10037-10041.
66. Pronk *et al*. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* (2013) 29:845-854.
67. Eisenhaber *et al*. The double cubic lattice method: Efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. *J. Comput. Chem.* (1995). 16:273-284.
68. Wagoner *et al*. Assessing implicit models for nonpolar mean solvation forces: The importance of dispersion and volume terms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103:8331-8336.
69. R. Salomon-Ferrer, D.A. Case, R.C. Walker. "An overview of the Amber biomolecular simulation package." *WIREs Comput. Mol. Sci.* **3**, (2013), 198-210
70. <https://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial3/index.php>.
71. Interthal H, Quigley PM, Hol WG, Champoux JJ. The role of lysine 532 in the catalytic mechanism of human topoisomerase I. *J Biol Chem.* 2004;279(4):2984-2992. doi:10.1074/jbc.M309959200

72. Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*. 1998;279(5356):1534-1541. doi:10.1126/science.279.5356.1534.
73. <https://doi.org/10.5281/zenodo.11148638>
74. <https://www.gromacs.org/about.html>
75. UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. Meng EC, Goddard TD, Pettersen EF, Couch GS, Pearson ZJ, Morris JH, Ferrin TE. *Protein Sci*. 2023 Nov;32(11):e4792.
76. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. *Protein Sci*. 2021 Jan;30(1):70-82.
77. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, Ferrin TE. *Protein Sci*. 2018 Jan;27(1):14-25.
78. <https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax>
79. Laskowski R A, Swindells M B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* (2011), 51, 2778-2786. [PubMed id: 21919503]
80. Laskowski R A, Thornton J M (2021). PDBsum extras: SARS-CoV-2 and AlphaFold models. *Prot. Sci.*, **31**, 283-289.
81. Laskowski R A, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková R S, Thornton J M (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Prot. Sci.*, **27**, 129-134.
82. de Beer T A P, Berka K, Thornton J M, Laskowski R A (2014). PDBsum additions. *Nucleic Acids Res.*, **42**, D292-D296. [PubMed id: **24153109**]
83. Laskowski R A (2009). PDBsum new things. *Nucleic Acids Res.*, **37**, D355-D359. [PubMed id: **18996896**]
84. Laskowski R A, Chistyakov V V, Thornton J M (2005). PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*, **33**, D266-D268. [PubMed id: **15608193**]
85. Laskowski R A (2001). PDBsum: summaries and analyses of PDB structures. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 221-222. [PubMed id: **11125097**]
86. Laskowski R A, Hutchinson E G, Michie A D, Wallace A C, Jones M L, Thornton J M (1997). PDBsum: A Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 488-490. [PubMed id: **9433130**]

87. Thomas L. P. Couvreur, Paul J. M. Maas, Svenja Meinke, David M. Johnson, Paul J. A. Keßler. Keys to the genera of *Annonaceae*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 169, Issue 1, May 2012, Pages 74–83, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2012.01230.x>

