

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Estudio de la dinámica molecular del complejo clozapina-
receptor D2 para el diseño de un fármaco antipsicótico sin
efectos cardiometabólicos adversos**

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios y así obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Alma Celeste Castañeda Leautaud

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por

Alma Celeste Castañeda Leautaud

Y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes
Codirector de tesis

Dr. Abraham Marcelino Vidal Limón
Codirector de tesis

Miembros del comité

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dr. María Guadalupe Moreno Armenta



Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Alma Celeste Castañeda Leautaud** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias con orientación en biotecnología.

Estudio de la dinámica molecular del complejo Clozapina-Receptor D2 para el diseño de un fármaco antipsicótico sin efectos cardiometabólicos adversos

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes
Codirector de tesis

Dr. Abraham Marcelino Vidal Limón
Codirector de tesis

Los tratamientos por fármacos para tratar la esquizofrenia son frecuentemente abandonados debido a los efectos cardiometabólicos adversos que la mayoría de estos presentan. Se sugiere que los efectos cardiometabólicos se pueden asociar a que los antipsicóticos bloquean la actividad del receptor D2 y H1. El objetivo de este trabajo es proponer un nuevo candidato a fármaco mediante métodos *in silico*, capaz de reducir los efectos cardiometabólicos adversos, en comparación a los presentados por la mayoría de los antipsicóticos de segunda generación. Un método útil para modificar fármacos preexistentes y medir el cambio en energía libre de afinidad por receptores determinados es el de perturbación de energía libre (FEP), el cual permite analizar el efecto de cambios químicos en grupos funcionales específicos en diversas moléculas. El fármaco que se seleccionó como modelo inicial para ser modificado fue la clozapina, por lo que se produjeron dinámicas moleculares de este ligante con el receptor D2, porque su antagonismo genera la actividad terapéutica y el receptor H1, ambos embebidos en bicapas lipídicas ricas en colesterol. Estas dinámicas se hicieron con el fin de obtener la pose más representativa y realista posible. A partir de esta pose se modificó al fármaco y se midieron las energías libres de los derivados con FEP. Los resultados muestran que el mejor candidato es el cambio del átomo de cloro en la clozapina por el yodo. Esto se puede deber principalmente al aumento en el radio de VdW en conjunto con la orientación del halógeno en ambos sitios activos receptores juega un rol determinante.

Palabras clave: clozapina, diseño de fármacos, efectos cardiometabólicos, FEP, GPCRs.

Abstract of the thesis presented by Alma Celeste Castañeda Leautaud as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience with orientation in biotechnology

Study by molecular dynamics of the D2-clozapine receptor for the drug design of an antipsychotic absent of cardiometabolic side effects.

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes
Codirector de tesis

Dr. Abraham Marcelino Vidal Limón
Codirector de tesis

The high dropout of drug treatments to treat schizophrenia is due to the adverse cardiometabolic effects. This project proposes a new antipsychotic drug without the adverse cardiometabolic effects that most drugs of this type induce. The H1 receptor blockade causes cardiometabolic side effects. We sought in this work for ligands with a decreased affinity for H1 receptor, while maintaining their therapeutic activity at D2 receptor. A useful method for modifying pre-existing medications and measuring their free energy for receptors with high precision is the free energy perturbation method (FEP). The starting structure to work with FEP was clozapine. To guarantee a realistic and precise ligand pose we performed molecular dynamics of this ligand with the D2 and H1 receptors embedded in cholesterol-rich lipid bilayers. Once gotten the pose, we proceed to alter the structure of clozapine and get the affinity free energies for each derivative using FEP method. The results show that the best candidate is the exchange of the chlorine atom in clozapine for iodine and suggest that this phenomenon was mainly due to a change in the VdW radii, in addition to the halogen orientation in both active sites.

Keywords: cardiometabolic side effects, clozapine, drug design, FEP, GPCR family.

Dedicatoria

A mi madre

Agradecimientos

Agradezco a mis asesores, el Dr. Sergio Águila Puentes, Dr. Abraham Marcelino Vidal Limón, Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez y a la Dra. María Guadalupe Moreno Armenta, por estar siempre dispuestos a ayudarme en el ámbito académico.

Agradezco el apoyo del posgrado de Nanociencias (CICESE-UNAM), CNyN-UNAM y Beca CONACyT No. CVU 756788 De igual manera se agradece el apoyo técnico de M. en C. Aldo Rodríguez (CNyN-UNAM), Héctor Manuel Oliver Hernández (CINVESTAV) y de Ing. Jesús Alaniz Hernández (CNS-IPICyT A.C.). Los autores agradecen a los proyectos LANCAD-UNAM-DGTIC-286yLANCAD-CINVESTAV-Xiuhcoatl Hybrid Cluster. De manera particular, los autores agradecen el acceso a los recursos de la supercomputadora Thubak Kaal 2.0 en el Centro Nacional de Supercómputo (CNS-IPICyT A.C.), 201901025N LNS BUAP y DGAPA-PAPIIT IG200320.

Agradezco al Dr. Rubén Darío Cadena Nava, por su guía y apoyo moral a lo largo de mi trayectoria como estudiante.

Agradezco a mi madre, por ser ella y estar siempre a mi lado.

Le agradezco a Oscar por su confianza, sinceridad, paciencia y amor.

Agradezco a mis amigos Rebeca, Pedro, Ángel y Mariana por acompañarme en esta etapa.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	ix
Lista de tablas	xx
Glosario	xxi
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	5
2.1 Causas de la esquizofrenia	5
2.2 Fármacos contra la esquizofrenia	6
2.3. Receptores asociados a riesgos cardiometabólicos	11
2.4 Definición, estructura y función de la familia de los receptores D2 y H1	12
2.5 Estructuras cristalográficas de las GPCRs	19
2.6 Motivos estructurales conservados que regulan la activación de la clase A de las GPCRs	19
2.7 Diseño <i>in silico</i> de fármacos	22
2.8 Métodos de simulación químico computacional.	23
2.9 Integración de las ecuaciones de movimiento	25
2.10 Condiciones periódicas de contorno	26
2.11 Campo de fuerzas	28
2.12 Interacciones de Van der Waals	30
2.13 Interacciones electrostáticas	31
2.14 Minimización de energía	32
2.15 Calentamiento, equilibrado y producción	34

2.16 Cálculos de energía libre: Métodos de electrostática en continuo	35
2.17 Cálculos de perturbación de la energía libre (FEP)	40
2.18 Estructuras tridimensionales disponibles de los neurorreceptores asociados a la esquizofrenia.....	44
Capítulo 3. Justificación, hipótesis y objetivos	45
3.1 Justificación	45
3.2 Hipótesis	45
3.3 Objetivo general	45
3.4 Objetivos específicos	46
Capítulo 4. Metodología	47
4. 1. Obtención de las estructuras	47
4.2. Reconstrucción de los receptores	47
4.3. Preparación de la clozapina	47
4.4. Determinación de modo de unión del ligante	48
4.5. Ensamble de los receptores en bicapa lipídica y solvente	49
4.6. Minimización, equilibrado y producción	50
4.7 Análisis de la dinámica	52
4.8 Cálculos de energía libre con métodos de electrostática en continuo	54
4.9 Cálculos de energía libre para los derivados de la clozapina	54
Capítulo 5. Resultados.....	57
5.1 Validación de la fase de equilibrado y producción	57
5.2 Caracterización de la bicapa lipídica	63
5.3 Determinación de los estados conformacionales predominantes en los complejos de simulación. ...	64
5.4 Determinación de las poses más representativas.....	77
5.5 Modo de unión y cálculos de energía libre de interacción ligante-receptor	78
Capítulo 6. Discusión	89
6.1 Validación de la fase de equilibrado	89
6.2 Caracterización de la bicapa lipídica	94

6.3 Determinación de los estados conformacionales en las dinámicas.....	95
6.4 Cálculos de energía libre por: MM/GBSA, MM/PBSA, ADT4 y FEP	99
Capítulo 7. Conclusiones	114
Literatura citada	116
Anexo A. Minimizado en Amber.....	123
Anexo B. Calentamiento en Amber	124
Anexo C. Equilibrado en Amber	126
Anexo D. Producción en Amber	128
Anexo E. Análisis de las dinámicas en CPPTRAJ	129
Script para el sistema D2R.....	129
Scripts para el Sistema D2R-E.....	129
Script para el Sistema D2R-A.....	130
Script para el sistema H1-CLO	130
Script para el Sistema H1R	131
Anexo F. Protocolo para MM/PBSA y MM/GBSA en Amber.....	132
Script para el sistema D2R-E y D2R-A.....	132
Script para el sistema H1-CLO	132
Anexo G. Protocolo para FEP en NAMD	134
Anexo H. Mapas de superficie del grosor de membrana y posición de moléculas de colesterol.....	137

Lista de Figuras

- Figura 1.** Perfiles simplificados de afinidad de unión de APD sobre neuroreceptores. Las barras en azul indican afinidades sobre receptores potencialmente terapéuticos (pKi), las barras en rojo indican afinidades sobre receptores que desencadenan efectos secundarios. La línea amarilla indica el nivel de afinidad D2 para cada medicamento. Imagen modificada de (Mauri et al., 2014)..... 7
- Figura 2.** Teoría de liberación rápida. La clozapina se une al receptor D2 de forma débil, de modo que la dopamina desplaza al fármaco por competencia y se une al receptor..... 8
- Figura 3.** Efectos sobre la ocupación D2 en un disparo abrupto de dopamina después de la estabilización de niveles iguales de ocupación por haloperidol y por clozapina. Simulación realizada por medio del software de simulación de modelos STELLA (High Performance Systems, Hanover, N.H.). La ocupación del haloperidol no se modifica por la transmisión fisiológica de dopamina, mientras que la ocupación de la clozapina si disminuye con la transmisión. Imagen modificada de: (Seeman & Kapur, 2000)..... 8
- Figura 4.** En la figura de la izquierda se muestra cómo funciona un antipsicótico clásico, bloquea únicamente a los receptores D2, lo que impide que la dopamina se una a la neurona postsináptica, lo que genera los síntomas extrapiramidales. En la figura de la derecha se puede observar cómo actúa un antipsicótico atípico. Este tipo de fármacos bloquean al receptor 5-HT_{2A}, por lo que las neuronas presinápticas de dopamina liberan al ligante endógeno de forma continua. La dopamina liberada desplaza al fármaco por competencia del sitio activo del receptor D2, de esta manera la dopamina es capaz de mandar señalizaciones a las neuronas postsinápticas de dopamina, impidiendo la formación de efectos secundarios extrapiramidales (EPS). Imagen modificada de: (Morrisette & Stahl, 2014). 9
- Figura 5.** Diagrama de bosque de los efectos secundarios de APD. Se usó como referencia placebo. Los síntomas que se enlistan son motivos para la interrupción de los tratamientos con APDs. A) Por todas las causas, B) Por el aumento de peso, (C) Por los efectos secundarios extrapiramidales, D) Por el aumento de prolactina, E) Por el incremento del ritmo cardiaco y F) Por la sedación, Imagen modificada de (Leucht et al., 2013)..... 10
- Figura 6.** El bloqueo del receptor H1 activa a la proteína quinasa AMP (AMPK) la cual inhibe directamente la actividad de la acetil CoA carboxilasa que convierte el acetil CoA en malonil CoA. Niveles bajos de malonil-CoA desinhiben la actividad de la carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1) que regula la ingesta de comida y la termogénesis de tejidos grasos. Imagen modificada de (He et al., 2013). 12
- Figura 7.** Representación de la estructura general de las proteínas G acopladas. La región morada constituye la cadena de aminoácidos, mientras que en verde se muestra el ligante, en azul las proteínas G y en gris la membrana lipídica; (EL es *ntracelular loop*; IL por *ntracelular loop*, por sus siglas en ingles)..... 13
- Figura 8.** Ciclo de activación de las proteínas G mediadas por sus receptores acoplados. En ausencia de estímulo, la subunidad G α unida a GDP y el dímero G $\beta\gamma$ están asociados con al receptor. Al unirse un ligante "L" en el GPCR se induce un cambio conformacional que promueve el

intercambio de GDP por GTP desde la subunidad α , lo que resulta en la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$ del receptor. Imagen modificada de: (Weis & Kobilka, 2018)..... 14

Figura 9. La vía de señalización de la adenilato ciclasa. La adenilato ciclasa (AC) fue la primera enzima caracterizada capaz de ser activada por proteínas G. La AC cataliza el ciclamiento del ATP (substrato) para originar AMP cíclico (AMPc), que es la molécula con actividad de segundo mensajero. El incremento en los niveles de AMPc pone en marcha el siguiente paso en la transducción de señal, que consiste en la activación de la proteína-quinasa A (PKA), la cual puede modificar la expresión génica de determinados genes. Imagen tomada de (González Morán, 2018). 15

Figura 10. Muestra los tipos de ligantes según la respuesta que pueden inducir en un receptor. Los agonistas inducen una activación del receptor y pueden ser parciales o totales. Los agonistas inversos generan una desactivación del receptor con la misma magnitud del agonista, mientras que los antagonistas bloquean al receptor. 16

Figura 11. Esquema de regiones en las GPCRs. Zonas extracelulares, intracelulares, modificaciones postraduccionales y regiones helicoidales. Las GPCR tienen siete dominios transmembrana (TM) con un amino terminal extracelular y un terminal carboxilo intracelular y bucles intracelulares y extracelulares alternos. Estas se someten a una variedad de modificaciones postraduccionales e interactúan con varios componentes de la membrana. (1) El extremo amino terminal y los bucles extracelulares de los receptores a menudo están glicosilados, lo que puede ser vital para la correcta localización de la superficie celular. (2) La cola carboxi-terminal sufre una fosforilación reversible, que es importante en la desensibilización de la señal y la internalización del receptor. (3) La palmitoilación reversible de los residuos de cisteína dentro de los bucles intracelulares y la cola carboxiterminal dan como resultado diferentes conformaciones del bucle a medida que los grupos palmitato penetran en la bicapa lipídica. (4) El colesterol puede interactuar en sitios específicos dentro de las hélices TM de GPCR, en este caso con las TM2 y TM4. (5) Los GPCR también pueden interactuar con componentes lipídicos específicos de la membrana. Estas interacciones y modificaciones actúan en concreto para modular la actividad de los GPCR. Imagen modificada de: (Goddard A.D. , 2012) 17

Figura 12. Cambios conformacionales una GPCR revelados a través de simulaciones de dinámica molecular. Cuadros representativos de simulaciones del receptor β 2AR unido a agonista a medida que pasa de un estado activo a un estado inactivo, con (A) todos los átomos que no son de hidrógeno representados como líneas y (B) el esqueleto de la proteína representado como cintas. La hélice transmembrana 6 (TM6) está coloreada en rojo para resaltar su alto grado de movilidad durante la transición entre los estados activo e inactivo. Imagen tomada de (Latorraca et al., 2017)..... 20

Figura 13. Dominios estructurales y sus movimientos en la activación de las GPCRs. Los aminoácidos que comprenden cada motivo estructural se muestran en representación de barras y se marcan mediante la nomenclatura de Ballesteros-Weinstein. Las posiciones de los motivos conservados en las estructuras globales se indican mediante cuadros en la superposición central de las tres estructuras. La ubicación del residuo D52^{2.5}N se indica en la vista global de la estructura. Además, los sitios de unión del ligando ortostérico (UK432097, barras de cian) y proteína G se muestran en el centro del compuesto, donde se muestra una representación superficial de la subunidad $G\alpha_s$ y sus contactos con el receptor $A_{2A}AR$. Imagen obtenida de: (White et al., 2018). 21

- Figura 14.** Reordenamientos estructurales durante la activación de GPCR. Las conformaciones inactivas (rosa claro) y activas (púrpura oscuro) del $\beta 2AR$ muestran diferencias en la posición de la hélice y la orientación de la cadena lateral en tres regiones distintas del GPCR: el sitio ortostérico (arriba, izquierda) y el sitio de acoplamiento intracelular de la proteína G (abajo). Imagen modificada de: (Latorraca et al., 2017)..... 22
- Figura 15.** Ejemplo de condiciones de contorno periódicas (se ha considerado por simplicidad un caso bidimensional). La caja central se ha representado en trazo grueso, mientras que las partículas que se encuentran dentro de la caja de líneas discontinuas son las que interactúan con la partícula que se encuentra en su centro según la convención de mínima imagen. Las interacciones se representan por las flechas de trazo rojo..... 27
- Figura 16.** Esquema de las interacciones enlazantes y no enlazantes que se tienen en cuenta en un campo de fuerzas de DM. Imagen obtenida de: (Sebastián Yagüe et al., 2015)..... 29
- Figura 17.** Potencial de Lennard-Jones. Imagen obtenida de: (Martinez Tellez, 2009)..... 31
- Figura 18.** Puente salino formado entre los aminoácidos glutamato y lisina. En el diagrama se muestran los dos tipos de interacciones que conforman al puente salino, los enlaces de hidrógenos que se forman entre el oxígeno no enlazado del carboxilo y cualquiera de los hidrógenos del grupo amino y las interacciones electrostáticas de los átomos cargados entre los grupos amino y carboxilo. 32
- Figura 19.** Esquema de las zonas en un potencial energético. El punto energético más elevado en el camino entre dos mínimos se le conoce como punto de silla y corresponde al estado de transición entre dos mínimos, ya sean locales o globales..... 33
- Figura 20.** Ciclo termodinámico propuesto para el cálculo de la diferencia en energía libre de una biomolécula en interacción con un ligante en presencia de disolvente. La energía libre de unión se calcula obteniendo la diferencia en la energía de formación del complejo en el vacío y la energía libre de formación del complejo en presencia de disolvente. Así mismo, la energía de formación del complejo es la energía libre del complejo menos las energías libres asociadas a la biomolécula y el ligante no unidos. 37
- Figura 21.** Diagrama donde se indican las constantes internas para el sustrato (proteínas o ácidos nucleicos) y del medio o solvente. ϵ corresponde a las constantes dieléctricas, q la cargas y r el radio de Born en un medio continuo de solvatación y sustrato (interna)..... 38
- Figura 22.** Descripción de topología dual para una simulación alquímica. Ejemplo de caso de la mutación de alanina en serina. Ejemplo de caso de la mutación de alanina en serina. El color más claro denota el estado alternativo que no interactúa con la parte señalada en línea discontinua negra. Imagen obtenida de: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.9/ug/node58.html>. 43
- Figura 23.** Estructura de la Clozapina. A) Estructura de la clozapina. Los números y letras corresponden a la nomenclatura acordada por IUPAC para numerar los carbonos y anillos en la molécula. El anillo D corresponde al anillo de la piperazina, los anillos C y A son bencenos unidos a B, un anillo heptacíclico denominado diazepina. B) y C) muestran las conformaciones tridimensionales de la clozapina usadas en este trabajo. B) representa la estructura de la

clozapina con la piperazina en posición axial. C) es la conformación de la clozapina con la piperazina en posición ecuatorial..... 48

Figura 24. Sistema construido para los sistemas biomoleculares simulados. Las proteínas con/sin ligante fueron embebidas en una bicapa lipídica compuesta por 68% 1-palmitoil-2-oleoil-sn-fosfatidilcolina (POPC), 17 % 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (POPE), 15% colesterol. La cual fue solvatada con una capa de 20 Å de agua con 0.15 M de cloruro de sodio (NaCl)..... 50

Figura 25. Distancia medida entre el ácido glutámico y la arginina, esta distancia fue la que se utilizó como descriptor molecular del candado iónico GLU6.30-ARG3.50. A la izquierda la posición del carbono delta del glutamato y a la derecha el carbono zeta de la arginina. Para todas las simulaciones se midió la distancia entre estos carbonos con el fin de caracterizar una posible formación de puente salino, en el que distancias menores a 4.2 Å dan cuenta de una formación de dicha interacción. 52

Figura 26. Motivos conservados en la clase A de las GPCRs cuyas posiciones son determinantes para la caracterización del estado activo/inactivo. La formación de un puente salino entre la ARG3.50 y GLU6.30 es característica de un estado inactivo, mientras que el motivo NPxxY presenta el mayor movimiento en la transición de estados. 53

Figura 27. Esquema general del desacoplamiento de interacciones electrostáticas y de VdW dentro de la implementación de NAMD. Las líneas continuas representan átomos salientes y las líneas discontinuas representan átomos entrantes. Dos variables definen cómo el sistema perturbado se acopla o desacopla de su entorno, a saber. λ_{elec} (alchElecLambdaStart) y λ_{vdW} (alchVdwLambdaEnd). En el escenario actual, $\lambda_{vdW} = 0.6$, lo que significa que las interacciones de VDM para partículas salientes y entrantes se reducirán, respectivamente, comenzando de $\lambda = 1.0 - \lambda_{vdW} = 0.4$ a $\lambda = 1.0$, y ampliado a partir de $\lambda = 0.0$ a $\lambda = \lambda_{vdW}$. Si $\lambda_{elec} = 0.5$, Las interacciones electrostáticas para partículas salientes y entrantes se reducen, respectivamente, de 0.0 a $1.0 - \lambda_{elec} = 0.5$, y se amplió de λ_{elec} a 1.0. 55

Figura 28. Energías potenciales en Kcal/mol de la fase de equilibrado y producción de los sistemas integrados con el receptor D2. Estas dos fases se produjeron en ensamble NPT con un paso de integración de 2 fs utilizando el campo de fuerza CHARMM36m. 58

Figura 29. RMSD de los carbonos alfa de la cadena única del receptor D2 integrado sin ligante (D2R), y con la clozapina con la piperazina en estado ecuatorial (D2R-E) y axial (D2R-A). Las unidades del RMSD son Å. 59

Figura 30. RMSF de los sistemas con el receptor D2 integrado. En la gráfica se observa en rojo el RMSF del receptor sin ligante, en azul el RMSF del D2R-E y en negro el RMSF del complejo D2R-A. Sombreados en amarillo y rojo se resaltan las hélices intermembranales del receptor, en azul la región intracelular y los residuos sin sombreado corresponden a los bucles de unión entre las hélices. 60

Figura 31. Complejo H1R: Energías potenciales de la fase de equilibrado y producción de los sistemas integrados con el receptor H1. Estas dos fases se produjeron en ensamble NPT con un paso de integración de 2 fs utilizando el campo de fuerza CHARMM36m. 61

- Figura 32.** RMSD de las primeras trayectorias de simulación de los sistemas del receptor H1 (H1R) en azul y H1 con la clozapina (H1-CLO) en rojo. 62
- Figura 33.** RMSF de los sistemas con el receptor H1 integrado. En la gráfica se observa en rojo el RMSF del receptor ligado a la clozapina y en negro el receptor sin ligante. Sombreados en amarillo y rojo se resaltan las hélices intermembranales del receptor, la zona que va de los residuos 225 a 400 residuos corresponde a la zona intracelular del receptor y los residuos sin sombreado corresponden a los bucles de unión entre las hélices. 62
- Figura 34.** Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2 basados en la distancia entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto rojo representa las mismas mediciones para el receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en amarillo se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en morado el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en verde el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo). 65
- Figura 35.** Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2 basados en la energía no enlazante (VdW + electrostáticas) entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto morado representa las mismas mediciones para el receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en verde se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en rojo el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en rosa el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo). 65
- Figura 36.** La interacción no enlazante entre la TYR7.48 y la ASN7.52 es indicativo de una conformación inactiva. La tirosina 7.48 se orienta hacia la parte media del TM7 como se puede observar mediante la distancia a la ASN7.52 en la simulación para el receptor D2 sin ligante. Ambos residuos pertenecen al motivo conservado NPxxY. 66
- Figura 37.** La energía de interacción no enlazante entre la TYR7.48 y la ASN7.52 es indicativo de una conformación inactiva. La tirosina 7.53 está en interacción no enlazante con la ASN7.49 a lo largo de la simulación del sistema D2R. Ambos residuos pertenecen al motivo conservado NPxxY. La energía de interacción es la suma de los enlaces de hidrogeno que se forman entre el oxígeno del grupo funcional de la tirosina y el hidrogeno del carbono beta de la asparagina mas otro enlace de hidrogeno entre los grupos amino y carboxilo de las cadenas principales de ambos residuos. 67
- Figura 38.** Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2R-A basados en la distancia entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto rojo representa al receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en amarillo se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en morado el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en verde el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo). 67
- Figura 39.** Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2R-A basados en la energía no enlazante (VdW + electrostáticas) entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria

de simulación. El punto morado representa al receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en verde se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en rojo el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en rosa el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo). 68

Figura 40. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2R-E basados en la distancia entre la GLU6.30 y la ARG3.50 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto rojo representa las mismas mediciones para el receptor 5-HT2C en fase activa (PDB: 6cbqg), en amarillo se muestra el receptor B2AR (PDB: 4LDO) y en verde el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m). 69

Figura 41. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2R-E basados en la energía no enlazante (VdW + electrostáticas) entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto morado representa las mismas mediciones para el receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en verde se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en rojo el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en rosa el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo). 69

Figura 42. Distancia entre el hidrogeno del hidroxilo de la TYR7.48 y el carboxilo del grupo R de la ASP2.50 en el sistema D2R-E. La distancia inferior a 3.5 Å es indicio de la formación de un puente de hidrogeno entre la TYR7.48 y la ASP2.50 del TM2 en la simulación del complejo D2R-E. 70

Figura 43. Energía de interacción electrostática entre los grupos R de la TYR7.48 y la ASP2.50 en el sistema D2R-E. Aproximadamente a los 5 ns de la fase de simulación hay un descenso abrupto en la energía electrostática, esto es otro indicio de la formación de un puente de hidrogeno entre la TYR7.48 y la ASP2.50 del TM2 en la simulación del complejo D2R-E. Este enlace está presente en un 45.97% de la fase de producción. 71

Figura 44. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor H1R basado en la distancia entre la GLU6.30 y la ARG3.50 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto rojo representa las mismas mediciones para el receptor 5-HT2C en fase activa (PDB: 6cbqg), en amarillo se muestra el receptor B2AR (PDB: 4LDO) y en verde el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m). 72

Figura 45. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor H1R basados en la energía no enlazante (VdW + electrostáticas) entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto morado representa las mismas mediciones para el receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en verde se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en rojo el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en rosa el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo). 72

Figura 46. Distancia entre el oxígeno del grupo R de la TYR468 del motivo conservado NPxxY y el carbón Z de la ARG125 en la simulación del sistema H1R. Se observa la formación de un enlace de hidrogeno en un 70.55% de la fase de simulación. 73

- Figura 47.** Energía no enlazante, VdW y electrostáticas, entre el oxígeno del grupo R de la TYR468 del motivo conservado NPxxY y el carbón Z de la ARG125 en la simulación del sistema H1R. Se observa interacción en un 83% de la fase de simulación. 74
- Figura 48.** Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor H1R-CLO basado en la distancia entre la GLU6.30 y la ARG3.50 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto rojo representa las mismas mediciones para el receptor 5-HT2C en fase activa (PDB: 6cbqg), en amarillo se muestra el receptor B2AR (PDB: 4LDO) y en verde el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m). 74
- Figura 49.** Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor H1R-CLO basados en la energía no enlazante (VdW + electrostáticas) entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto morado representa las mismas mediciones para el receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en verde se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en rojo el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en rosa el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4llo). 75
- Figura 50.** Distancia entre la ASP72 y la TYR468, del motivo D2.50 y NPxxY respectivamente. Se tomaron las distancias entre uno de los oxígenos del grupo funcional de la ASP3.50 y el hidrógeno del hidroxilo en la TYR7.48 Este enlace se forma el 100% de la fase de producción de la simulación H1-CLO. 76
- Figura 51.** Energía de interacción entre la ASP72 y la TYR468, del motivo D2.50 y NPxxY respectivamente. Este enlace se forma el 100% de la fase de producción de la simulación H1-CLO. 77
- Figura 52.** Histogramas de frecuencia de las energías potenciales de los cuadros de las tres réplicas de simulación de los sistemas H1 y D2 con clozapina, con la piperazina en estado ecuatorial. Las frecuencias se midieron para intervalos de 20 Kcal/mol. 77
- Figura 53.** Diagramas de interacción entre la clozapina y los receptores estudiados. Modos de unión de la clozapina con la piperazina ecuatorial en los receptores D2 (A)) y H1 (B)) al tiempo 0 de la fase de producción en DM. 78
- Figura 54.** Resultados de las energías no enlazantes para el sistema H1-CLO, de acuerdo al método de MM/PBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar. 79
- Figura 55.** Resultados de las energías no enlazantes para el sistema H1-CLO, de acuerdo al método de MM/GBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar. 80
- Figura 56.** Resultados de las energías no enlazantes para el sistema D2R-E, de acuerdo al método de MM/PBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía

de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar. 81

Figura 57. Resultados de las energías no enlazantes para el sistema D2R-E, de acuerdo al método de MM/GBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar. 81

Figura 58. Resultados de las energías no enlazantes para el sistema D2R-A, de acuerdo al método de MM/PBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar. 82

Figura 59. Resultados de las energías no enlazantes para el sistema D2R-A, de acuerdo al método de MM/GBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar. 83

Figura 60. Diagramas de interacción entre la clozapina con la piperazina ecuatorial y los receptores D2 y H1. Estas poses son las más representativas a lo largo de la fase de producción. Circuladas en rojo se señalan los residuos que presentaron valores $\geq \pm 1$ Kcal/mol con el método de MM/PBSA. Circulado en azul se indica una zona en la que la interacción con el receptor H1 es fuerte, pero no lo es para el receptor D2. 84

Figura 61. Diagrama en el que se señalan las modificaciones de la clozapina para calcular la energía libre asociada a la interacción con el receptor D2 y H1 con acoplamiento molecular. Las posiciones para cada derivado son las mismas que la clozapina. Las variaciones que se indican son los halógenos flúor, bromo e iodo y las metilaciones en la posición 8. 85

Figura 62. Modificaciones a la clozapina probadas con FEP en el programa NAMD. Se probaron los cambios del cloro por los halógenos flúor, bromo e iodo. También se probó con metilaciones en las posiciones de los carbonos 8, 9 y 10 y la adición de un cloro en la posición del carbono 10. 87

Figura 63. Resumen del cambio en la energía libre para la mutación del cloro en la clozapina por flúor, para el receptor H1. La línea en negro indica la energía libre para la simulación de ida, y en rojo la simulación de regreso, una convergencia al principio y final de las simulaciones asegura un error mínimo. Para este cálculo se utilizó una λ de 0.0625, con 100 pasos de equilibrado para cada paso y 400 pasos de muestreo con un tiempo de integración de 2 fs. Además se usaron potenciales de núcleo suave para las interacciones electrostáticas, a una lambda de 0.5 y de VDW, con una lambda de 0.6. 87

Figura 64. RMSD de los carbonos α del sistema D2R de los residuos 1-102 y 330 a 415 que corresponden a la parte intermembranal y extracelular del receptor. 89

Figura 65. Moléculas de Dopamina, histamina y clozapina para comparar el tamaño de la clozapina con los ligantes endógenos de los receptores D2 y H1 que son la dopamina e histamina respectivamente.	91
Figura 66. Residuos conservados en el receptor D2 que su interacción electrostática es un descriptor molecular del estado inactivo. La formación del puente salino entre los residuos ARG3.50 y GLU6.40 es un indicativo del estado inactivo en las GPCRs.	92
Figura 67. Estructuras proteicas alineadas con la herramienta MatchMaker de UCSF CHIMERA para la trayectoria de simulación del receptor H1 y el sistema H1-CLO. Se tomaron las estructuras cada 100 cuadros. Se indican las zonas donde se encuentran los residuos 275 al 300 y 360 al 400.	93
Figura 68. Estructuras proteicas alineadas con la herramienta MatchMaker de UCSF CHIMERA para la trayectoria de simulación de las tres réplicas del sistema H1-CLO. Se tomaron las estructuras cada 100 cuadros de simulación.	93
Figura 69. Estructuras de colesterol y POPC tomadas de la conformación más representativa de la dinámica de simulación del complejo D2R-E. Como se muestra en la imagen de la izquierda la distancia entre los fosfatos de los lípidos dispuestos cara a cara en la bicapa lipídica corresponde a los valores promedio medidos del grosor de membrana a lo largo de la simulación. A la derecha se puede observar a uno de los colesteroles en interacción con una molécula de fosfatidicolina, como muestra de la forma en la que estas moléculas pueden estar en interacción.	95
Figura 70. Correspondencia entre la energía no enlazante de los residuos ARG3.50 y GLU6.30 y la distancia entre los átomos CZ y CD de los residuos respectivos en la trayectoria de producción del sistema H1-CLO.	96
Figura 71. Distancias entre las especies atómicas involucradas en la formación de una interacción no enlazante entre los residuos ARG3.50 y TYR7.48 en cinco cristales de GPCRS de la clase A: El receptor D2, H1, Rodopsina, B2-ADR y 5-HT2C.	98
Figura 72. Apilamiento tipo paralelo desplazado entre unos de los anillos aromáticos de la clozapina y la cadena lateral de la fenilalanina 362, en el sistema D2E.	101
Figura 73. Residuos principales de interacción con la clozapina según los métodos de solvatación en continuo. Vista enfocada en el halógeno de la clozapina. En amarillo se indican los señalados según MM/PBSA, en azul cian por MM/GBSA y en verde por ambos métodos. La clozapina se indica en naranja. Las distancias son útiles como referencia.	103
Figura 74. Interacción del residuo de aspartato con la clozapina, para los sistemas D2R-E a la izquierda y H1-CLO a la derecha. Además se pueden observar algunas moléculas de agua muy cercanas a los átomos que figuran en la interacción, las cuales pueden causar interferencia en la misma.	104
Figura 75. Residuos principales de interacción con la clozapina según los métodos de solvatación en continuo, vista enfocada en la piperazina de la clozapina. En amarillo se indican los señalados	

según MM/PBSA, en azul cian por MM/GBSA y en verde por ambos métodos. La clozapina se indica en naranja. 105

Figura 76. Residuos principales de interacción con la clozapina según los métodos de solvatación en continuo, vista enfocada en la diazepina de la clozapina. En amarillo se indican los señalados según MM/PBSA, en azul cian por MM/GBSA y en verde por ambos métodos. La clozapina se indica en naranja. 105

Figura 77. Vistas de profundidad de la posición de la clozapina en los receptores D2. A la izquierda, y al receptor H1, a la derecha, en verde se observa el átomo del cloro que está orientado hacia la membrana en el receptor D2, entre las hélices 5 y 6. Mientras que el halógeno se encuentra entre las hélices 3 al 5 en el receptor H1. 106

Figura 78. Residuos del receptor H1 más cercanos al átomo modificado en la clozapina. Al cambiar el cloro por el yodo, se aumenta el radio de VdW, esto causa que los átomos más cercanos sean repelidos, este es el caso de los hidrógenos en las cadenas laterales de la ILE162 y la VAL187, mientras que para átomos más alejados como los de la PHE190 el termino atractivo del potencial que rige las interacciones no-polares es mayor. 109

Figura 79. Distribución de probabilidades en función de la diferencia en energía potencial en Kcal/mol de los cálculos de FEP del cambio del cloro por yodo en la clozapina en unión con el receptor D2. En rojo se muestra la distribución para la simulación de regreso y en negro para la simulación de ida. Entre mayor es la sobreposición entre las distribuciones para cada cuadro, mayor precisión tendrá FEP. 112

Figura 80. Distribución de probabilidades en función de la diferencia en energía potencial en Kcal/mol de los cálculos de FEP del cambio del cloro por yodo en la clozapina en unión con el receptor H1. En rojo se muestra la distribución para la simulación de regreso y en negro para la simulación de ida. Entre mayor es la sobreposición entre las distribuciones para cada cuadro, mayor precisión tendrá FEP. 113

Figura 81. Mapas de superficie del grosor membranal y la posición de los colesteroles en el sistema D2R.A la izquierda, mapa de superficie del grosor de la membrana promedio a lo largo de la simulación del receptor D2R, los valores azules indican valores de grosor menores, mientras que los rojos valores mayores. La imagen de la derecha, por su parte indica las posiciones de las moléculas de colesterol en la estructura más representativa durante la fase de producción. 137

Figura 82. Mapas de superficie del grosor membranal y la posición de los colesteroles en el sistema D2R-E. A la izquierda, mapa de superficie del grosor de la membrana promedio a lo largo de la simulación del complejo D2R-E, los valores azules indican valores de grosor menores, mientras que los rojos valores mayores. La imagen de la derecha, por su parte indica las posiciones de las moléculas de colesterol en la estructura más representativa durante la fase de producción. 137

Figura 83. Mapas de superficie del grosor membranal y la posición de los colesteroles en el sistema D2R-A. A la izquierda, mapa de superficie del grosor de la membrana promedio a lo largo de la simulación del complejo D2R-A, los valores azules indican valores de grosor menores, mientras que los rojos valores mayores. La imagen de la derecha, por su parte indica las

posiciones de las moléculas de colesterol en la estructura más representativa durante la fase de producción. 138

Figura 84. Mapas de superficie del grosor membranal y la posición de los colesteroles en el sistema H1R. A la izquierda, mapa de superficie del grosor de la membrana promedio a lo largo de la simulación del sistema H1R, los valores azules indican valores de grosor menores, mientras que los rojos valores mayores. La imagen de la derecha, por su parte indica las posiciones de las moléculas de colesterol en la estructura más representativa durante la fase de producción. 138

Figura 85. Mapas de superficie del grosor membranal y la posición de los colesteroles en el sistema H1R-CLO. A la izquierda, mapa de superficie del grosor de la membrana promedio a lo largo de la simulación del complejo H1R-CLO, los valores azules indican valores de grosor menores, mientras que los rojos valores mayores. La imagen de la derecha, por su parte indica las posiciones de las moléculas de colesterol en la estructura más representativa durante la fase de producción. 139

Lista de tablas

Tabla 1.	Composición porcentual de lípidos en las células neuronales de la raíz del ganglio dorsal.....	49
Tabla 2.	Procedimiento de calentamiento y equilibrado utilizado en los sistemas de los complejos a simular.....	51
Tabla 3.	Protocolo ajustado para asegurar la convergencia de las simulaciones de FEP para cada candidato derivado de la clozapina.....	56
Tabla 4.	Número y tiempo de simulaciones efectuadas para poder analizar la interacción entre la clozapina y los receptores D2 y H1.....	57
Tabla 5.	Valores del grosor de la membrana lipídica promedio de la fase de producción (≈90 ns)	63
Tabla 6.	Energías libres en Kcal/mol de la interacción clozapina con los receptores H1 y D2	84
Tabla 7.	Candidatos probados por acoplamiento molecular con ADT4.....	86
Tabla 8.	Resumen de las energías libres para cada derivado calculadas por acoplamiento molecular con el programa ADT4.....	88
Tabla 9.	Con el fin de determinar el efecto de la clozapina en la conformación intracelular de los receptores se calculó el número promedio de enlaces de hidrógeno, los puentes salinos y los contactos nativos.....	90
Tabla 10.	MM/GBSA del sistema D2E usando un radio de prueba de 1.4 en vez de 0.6 que fue el utilizado en el método. Se tomaron valores cada 50 cuadros de simulación...	100
Tabla 11.	Energías potenciales de interacción no enlazante entre residuos cercanos al átomo modificado en FEP para los sistemas H1 y D2.....	108

Glosario

D2R -. Receptor de dopamina D2.

D2R-E-. Complejo del receptor de dopamina D2 con la piperazina de la clozapina en posición ecuatorial en complejo en el sitio ortostérico.

D2R-A-. Complejo del receptor de dopamina D2 con la piperazina de la clozapina en posición axial en el sitio ortostérico.

FEP-. Método de perturbación de energía libre

H1R-. Receptor de histamina H1.

H1R-CLO -. Complejo del receptor H1 con la piperazina de la clozapina en posición Ecuatorial en el sitio ortostérico.

TM1, TM2, ... , TM7-. Hélices intermembranales de los receptores D2 y H1.

Capítulo 1. Introducción

La esquizofrenia es una enfermedad mental en la que el paciente pierde el contacto con la realidad y se afectan las funciones cerebrales que incluyen las emociones, el pensamiento, la cognición, la percepción y la conducta (Salomon-Ferrer, Case, & Walker, 2013).

Los síntomas de la esquizofrenia se clasifican en tres grupos, positivos, cognitivos y negativos. Los síntomas positivos incluyen ideas delirantes y alucinaciones, vinculadas a la saliencia aberrante, la cual se refiere a una asignación incorrecta de importancia a estímulos externos o internos (Márquez, 2016).

Previos a los síntomas positivos aparecen los síntomas cognitivos y negativos. Los síntomas cognitivos se caracterizan por deficiencias en el aprendizaje, la memoria verbal, la atención y el funcionamiento ejecutivo; mientras que los síntomas negativos se refieren al embotamiento afectivo o falta de expresión emocional y la avolición, que en psiquiatría se refiere al déficit en la motivación y retraimiento social (Salomon-Ferrer, Case, & Walker, 2013).

La prevalencia de la esquizofrenia es del 1.1% de la población mundial, esto significa que ~51 millones de personas padecen esta enfermedad. Su incidencia es de 4 por cada 1,000 personas, este es el número de personas que desarrollan la enfermedad en un año (McGrath J., 2008). La esquizofrenia puede llegar a ser muy tormentosa y afectar la calidad de vida, es por esto que la mortalidad es de 2 a 3 veces mayor y la esperanza de vida es 20% menor que la población general (Brown, Kim, Mitchell, & Inskip, 2010).

A la fecha, los tratamientos clínicos han sido efectivos hasta en un 60% de los pacientes esquizofrénicos, debido en gran parte al desconocimiento de la patogénesis de la esquizofrenia (Nucifora, Mihaljevic, Lee, & Sawa, 2017). Recientemente, se encontraron diversos factores que actúan en conjunto y contribuyen al desarrollo de la esquizofrenia; entre ellos se incluye la predisposición genética, acontecimientos traumáticos, abuso de sustancias psicoactivas, condiciones desfavorables durante la gestación del enfermo, cambios en el patrón de sueño, etc. (Miyamoto et al., 2003).

Existen múltiples y divergentes teorías que intentan explicar cómo funciona la esquizofrenia. Sin embargo, la mayoría de estas apuntan a un desbalance en ciertos neurotransmisores, principalmente la dopamina. Estas teorías se basan en la capacidad de ciertos fármacos para bloquear los receptores subcorticales de dopamina D2, por lo cual tienen un fuerte componente clínico (Kesby, Eyles, McGrath, & Scott, 2018).

Estas teorías presentan una postura tan rígida, que se ha llegado a asegurar que no existe un fármaco antipsicótico que no ejerza alguna actividad sobre los receptores D2 (Philip Seeman, 2014).

La clozapina fue el primer fármaco que logró eliminar los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia, sin presentar efectos secundarios motores en los pacientes. Dichos efectos motores se denominan extrapiramidales (EPS) y se caracterizan por contracciones involuntarias de los músculos que afectan a la postura, a la marcha y a los movimientos (Stroup, A Lieberman, S Swartz, & McEvoy, 2000). Desde su descubrimiento y aplicación en la década de los sesenta, no hay otro fármaco que pueda aliviar los síntomas de la esquizofrenia refractaria, es decir, en aquellos casos en los que los síntomas no remiten al probar con más de dos antipsicóticos, los cuales representan hasta el 30% del total de casos. Esta evidencia clínica permite colocar a la clozapina como el fármaco más efectivo contra la esquizofrenia. Sin embargo, este medicamento se reserva solo para casos extremos, debido a sus múltiples efectos secundarios, entre los cuales se encuentran como más grave a la agranulocitosis, que se caracteriza por la disminución en el número de neutrófilos en el cuerpo, y que conlleva a inmunodeficiencia (Davrieux, Gutiérrez, Marín, Pier, & Pais, 2007).

La clozapina fue el primer fármaco con afinidad probada por el receptor D2, por lo que la abolición de los efectos extrapiramidales se adjudicó a esta interacción (Goldstein, 2000). Posterior a su descubrimiento se desarrollaron fármacos de segunda generación o atípicos, los cuales se caracterizan por el antagonismo (bloqueo) o agonismo inverso (actividad subyacente) de los receptores de serotonina 5-HT_{2A}/5-HT_{1A} (Sullivan, Clarke, & Berg, 2015). La unión a los receptores D2 y 5-HT_{2A} confiere la reducción de los síntomas de los efectos extrapiramidales. No obstante, este tipo de antipsicóticos ha generado otros efectos adversos al presentar afinidad por receptores como el de histamina H₁. El antagonismo de los medicamentos atípicos por este receptor está asociado a efectos secundarios cardiometabólicos, como el aumento de peso ocasionado por el incremento del apetito, taquicardia, propensión para desarrollar hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, resistencia a insulina, hiperprolactemia (niveles altos de prolactina), etc. La prevalencia para desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en pacientes consumidores de fármacos atípicos es de 1.5 a 2 veces mayor en comparación con la población general (Jafari, Fernandez-Enright, & Huang, 2012). Se ha confirmado que los receptores implicados en el incremento de la prevalencia a desarrollar diabetes son únicamente los receptores H₁ y 5-HT_{2C} (Montastruc et al., 2015). También, se encontró que es la unión simultánea a estos receptores es la que incrementa el riesgo de desarrollar diabetes (Montastruc et al., 2015).

A pesar que la clozapina es el mejor antipsicótico hasta el momento, ya que su efectividad es de 70% e incluye a los pacientes refractarios, se queda el 30% sin posibilidad de ayuda (Nucifora et al., 2017). Debido a este fenómeno, es imperativo desarrollar nuevos medicamentos que puedan tratar la esquizofrenia de forma efectiva y que no generen los graves efectos adversos.

Una hipótesis sugiere que la elevada efectividad de la clozapina se debe, principalmente, a su unión transitoria al receptor D2, teoría que se denomina como *fast-off* o de disociación rápida (Philip Seeman, 2014). Esta interacción transitoria promueve la supresión de los síntomas psicóticos, y de forma paralela permite el desplazamiento del fármaco por la dopamina endógena; de este modo se mantiene al paciente estable, sin generar efectos asociados a un bloqueo exacerbado de los receptores de dopamina. Otras hipótesis afirman que la eficacia que genera la clozapina se debe al efecto pleiotrópico en la población de receptores y sus respectivas afinidades (Nucifora et al., 2017). Con base en el efecto que los antipsicóticos ejercen sobre el receptor de dopamina D2, además de algunas otras evidencias, como la psicosis que algunos pacientes sufren al ser tratados contra el Parkinson cuando se les administra levodopa (precursor de la dopamina) (Curraçan C. et.al., 2004), así como estudios de neuroimagen y PET en los que se muestran claras irregularidades en los niveles de dopamina en el sistema nigrostriatal (Weinstein J.J., et. al. 2017), se sugiere que este es el receptor objetivo para el desarrollo de fármacos contra la esquizofrenia. Por lo que su estudio es imprescindible para el diseño de nuevos fármacos.

La reciente obtención de la estructura cristalográfica, por difracción de rayos X (DRX), del receptor D2 abre las posibilidades de investigar con precisión el comportamiento de esta proteína al unírsele cualquier ligante de interés, lo que permitiría encontrar estructuras alternativas con la actividad requerida (S. Wang et al., 2018).

Existen autores que sugieren que es crucial realizar el análisis del comportamiento estructural y dinámico del receptor D2 en sus sitios de unión a ligantes, para dirigir el desarrollo de agonistas inversos o antagonistas novedosos y altamente específicos (Lagerstrom et al., 2008).

Los cálculos de la perturbación de la energía libre (FEP), están basados en métodos de la mecánica estadística para calcular las diferencias de energía libre a través de simulaciones por dinámica molecular. Se ha encontrado que la correlación entre los resultados experimentales y los cálculos de FEP es $r^2 > 0.65$, de manera que es un métodos adecuado cuando se busca una alta correlación entre las energías de afinidad predichas y las experimentales (J. Wang, Deng, & Roux, 2006). La teoría y su aplicación se remontan a varias décadas atrás, sin embargo, en años recientes ganó popularidad gracias a los avances

recientes en los campos de fuerza y algoritmos de muestreo, junto con la disponibilidad de computación paralela de alta velocidad. La confluencia de estos avances permite que las simulaciones *in silico* contribuyan a los esfuerzos de descubrimiento de fármacos al proporcionar mejores decisiones de síntesis y disminuir los tiempos de desarrollo de nuevos fármacos (J. Wang, Deng, & Roux, 2006).

Para este trabajo utilizamos cálculos de FEP acoplados a dinámica molecular para analizar las interacciones intermoleculares de la clozapina al ligarse con el receptor de dopamina D2 y el receptor H1, que como se mencionó para este último, su bloqueo genera los efectos cardiometabólicos adversos. La información obtenida, nos permitió identificar las interacciones intermoleculares predominantes entre la clozapina y los receptores, para tomar decisiones sobre las modificaciones estructurales en el fármaco, de modo que se mantenga la afinidad por el receptor de dopamina D2 y se reduzca sobre el receptor H1.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Causas de la esquizofrenia

La esquizofrenia es una grave enfermedad psiquiátrica que afecta al 1 % de la población. Este padecimiento impide llevar una vida sana y puede llegar a requerir hospitalización (McGrath et al., 2008). Infortunadamente, a la fecha, no existe un tratamiento sin efectos secundarios graves para la salud (Stroup et al., 2000). Entre el 20% y el 30% de los pacientes tratados con los antipsicóticos actuales, presentan efectos adversos y dejarán el tratamiento en un lapso de días, semanas o meses, mientras que entre el 35% al 45% dejará de tomar el medicamento en seis meses y del 65% al 80% lo hará en un lapso de 12 a 18 meses (Consumer Reports Best Buy Drugs, 2012). Estos datos indican una necesidad por contar con nuevos fármacos antipsicóticos que no presenten los efectos detrimentales que éstos causan sobre la calidad de vida del paciente.

El pobre avance en la tarea de hallar la cura de la esquizofrenia se debe a que no se conocen las causas de esta enfermedad. En 1967 Van Rossum propuso que la esquizofrenia se debe a un desbalance de neurotransmisores específicos en el cerebro, principalmente la dopamina (Van Rossum, 1967). Él propuso que en el cerebro del paciente esquizofrénico existe una señalización errática en las vías dopaminérgicas, que resultan en una activación no uniforme de las áreas cerebrales (Kesby et al., 2018). Por un lado, la sobreactivación de la ruta mesolímbica provoca alucinaciones, delirios y discurso desorganizado que se engloban bajo el nombre de síntomas positivos. Por otro lado, los síntomas negativos, que se refieren al estado emocional suprimido del paciente y la deficiencia cognitiva se deben a una baja activación en la ruta mesocortical (Chuhma et al., 2017).

En 1976, Seeman y colaboradores reportaron que el receptor de dopamina D2 está fuertemente implicado a la psicosis al reportar la elevada cantidad de receptores D2 en tejido del cuerpo estriado de los pacientes *post mortem*. A partir de estas observaciones, se sugirió que existe una distribución irregular de los receptores D2 en el cerebro esquizofrénico (Seeman 2000).

2.2 Fármacos contra la esquizofrenia

Los primeros medicamentos para tratar la esquizofrenia fueron descubiertos hace más de 60 años, como la clorpromazina, que fue el primer fármaco antipsicótico sintetizado en 1950 por M. P. Charpentier (Dundee, 1954). Debido a que la clorpromazina es antagonista de los receptores D2, el desarrollo de antipsicóticos se centró en agentes que bloqueaban a este receptor (Carlsson A. 1988). A esta primera familia de medicamentos se le llamó antipsicóticos típicos (AT). Los AT generalmente no logran manejar los síntomas negativos y son ineficaces en aproximadamente un tercio de los pacientes, además de causar efectos secundarios extrapiramidales (EPS) (Brown et al., 2010). Estos efectos se presentan por un desequilibrio entre los neurotransmisores colinérgicos y dopaminérgicos, debido al bloqueo del receptor D2 en el denominado sistema extrapiramidal. Este sistema consiste de una red neuronal que forma parte del sistema nervioso central y es parte del sistema motor, relacionado con la coordinación del movimiento y está constituido por las vías nerviosas polisinápticas que incluyen los núcleos basales y los núcleos subcorticales, diferenciándose de los tractos de la corteza motora (Brown, Kim, Mitchell, & Inskip, 2010).

Los efectos secundarios extrapiramidales se superaron de forma considerable con el uso de la clozapina en 1958, el primer compuesto de la familia de los antipsicóticos que se denominaron atípicos (APD) (Crilly, 2007). La diferencia entre los antipsicóticos de primera generación y la clozapina radica en su baja afinidad por el receptor D2, y su alta afinidad por el receptor 5-HT_{2A}, aunque se discute actualmente si es necesaria la asociación por este último receptor para generar actividad antipsicótica. En la figura 1, se muestran los APD más comunes y sus afinidades por estos receptores (Seeman & Kapur, 2000). Desde el descubrimiento de la clozapina, la lista de antipsicóticos atípicos (APDs) aumentó rápidamente debido a la alta efectividad de este medicamento para aliviar los síntomas de la esquizofrenia, incluso en la refractaria (Melfcjer & Mcquark, 1999). La eficacia de la clozapina se ha atribuido a su rápido desplazamiento por la dopamina endógena, esta hipótesis se conoce como teoría de la disociación rápida y fue propuesta por Kapur S. y Seeman T en 2001 (Figura2). Una prueba de ello es el hecho de que la clozapina tiene una ocupación mucho menor que el resto de los medicamentos antipsicóticos típicos, >45% contra >70 %, cuando hay una elevación abrupta en los niveles de dopamina (Seeman & Kapur, 2000)(Figura 3).

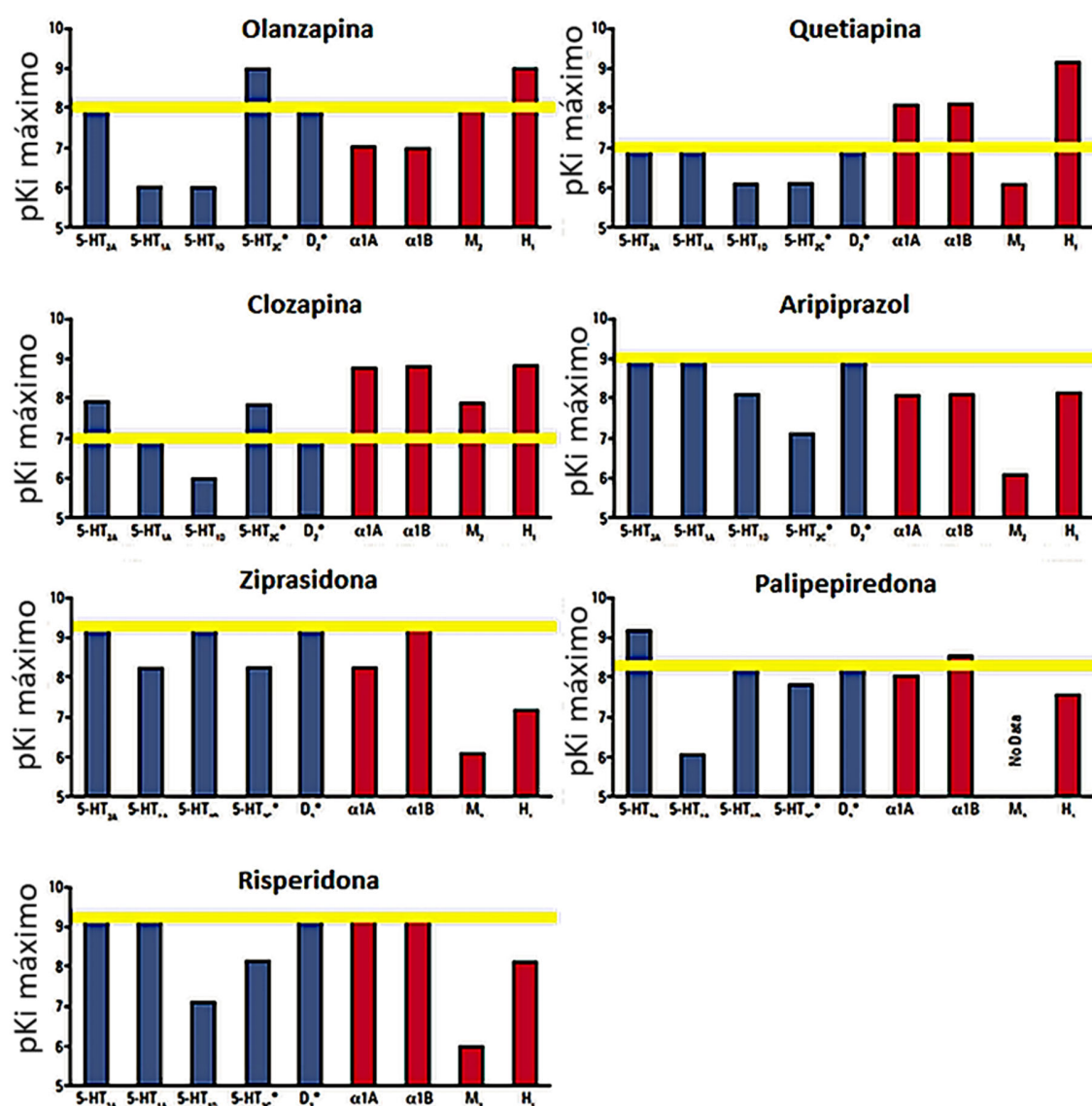


Figura 1. Perfiles simplificados de afinidad de unión de APD sobre neuroreceptores. Las barras en azul indican afinidades sobre receptores potencialmente terapéuticos (pKi), las barras en rojo indican afinidades sobre receptores que desencadenan efectos secundarios. La línea amarilla indica el nivel de afinidad D2 para cada medicamento. Imagen modificada de (Mauri et al., 2014)



Figura 2. Teoría de liberación rápida. La clozapina se une al receptor D2 de forma débil, de modo que la dopamina desplaza al fármaco por competencia y se une al receptor.

La disociación rápida de la clozapina en el receptor D2 se debe a que tiene una afinidad relativamente baja por este receptor y una alta afinidad por el receptor de serotonina 5-HT_{2A}. Como se observa en la figura 4, la clozapina bloquea al receptor 5-HT_{2A} por lo que las neuronas presinápticas de dopamina liberan al ligante endógeno de forma continua durante el bloqueo. La dopamina liberada desplaza a la clozapina por competencia del sitio activo del receptor D2, de esta manera se estabilizan los niveles de dopamina en el cerebro.

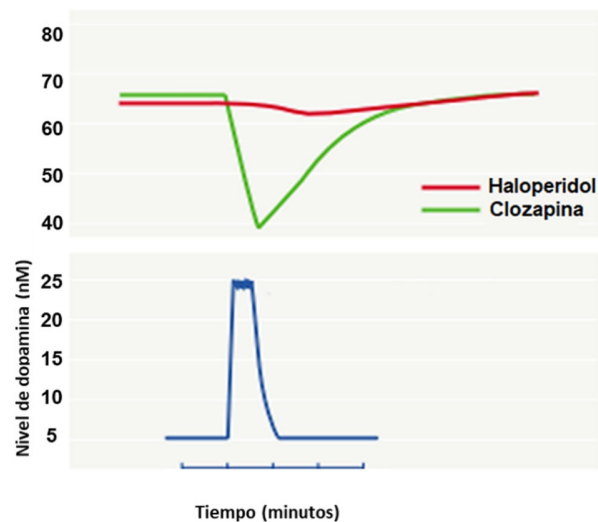


Figura 3. Efectos sobre la ocupación D2 en un disparo abrupto de dopamina después de la estabilización de niveles iguales de ocupación por haloperidol y por clozapina. Simulación realizada por medio del software de simulación de modelos STELLA (High Performance Systems, Hanover, N.H.). La ocupación del haloperidol no se modifica por la transmisión fisiológica de dopamina, mientras que la ocupación de la clozapina si disminuye con la transmisión. Imagen modificada de: (Seeman & Kapur, 2000).

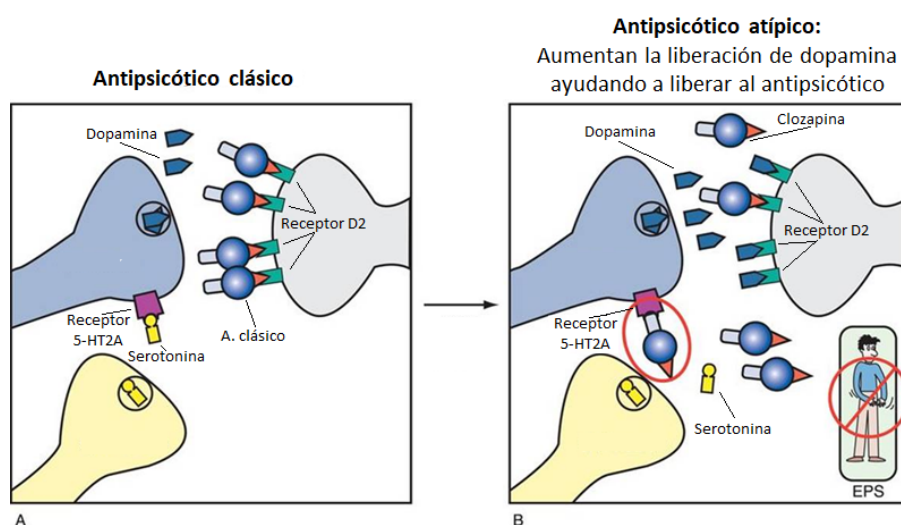


Figura 4. En la figura de la izquierda se muestra cómo funciona un antipsicótico clásico, bloquea únicamente a los receptores D2, lo que impide que la dopamina se una a la neurona postsináptica, lo que genera los síntomas extrapiramidales. En la figura de la derecha se puede observar cómo actúa un antipsicótico atípico. Este tipo de fármacos bloquean al receptor 5-HT2A, por lo que las neuronas presinápticas de dopamina liberan al ligante endógeno de forma continua. La dopamina liberada desplaza al fármaco por competencia del sitio activo del receptor D2, de esta manera la dopamina es capaz de mandar señalizaciones a las neuronas postsinápticas de dopamina, impidiendo la formación de efectos secundarios extrapiramidales (EPS). Imagen modificada de: (Morrisette & Stahl, 2014).

Es necesario conocer el cuadro clínico del paciente para la elección del fármaco ideal por que la clozapina, al igual que el resto de los antipsicóticos, puede presentar efectos secundarios graves (figura 5). El aumento de peso y los problemas cardiometabólicos se consideran los principales problemas asociados con los fármacos APD y son las principales causas de interrupción de los tratamientos por fármacos. La clozapina junto con la olanzapina, clorpromazina y la zotepina son los que presentan mayor recurrencia a padecer estos síntomas, mientras que la ziprasidona y lurasidona son los fármacos con el menor riesgo de aumentar de peso (Leucht et al., 2013). A pesar de los altos efectos cardiometabólicos adversos, la clozapina se ha retomado como modelo para diseñar nuevos fármacos, porque hasta ahora se ha demostrado que es el antipsicótico más eficaz para aliviar los síntomas positivos de la esquizofrenia (Nucifora et al., 2017).

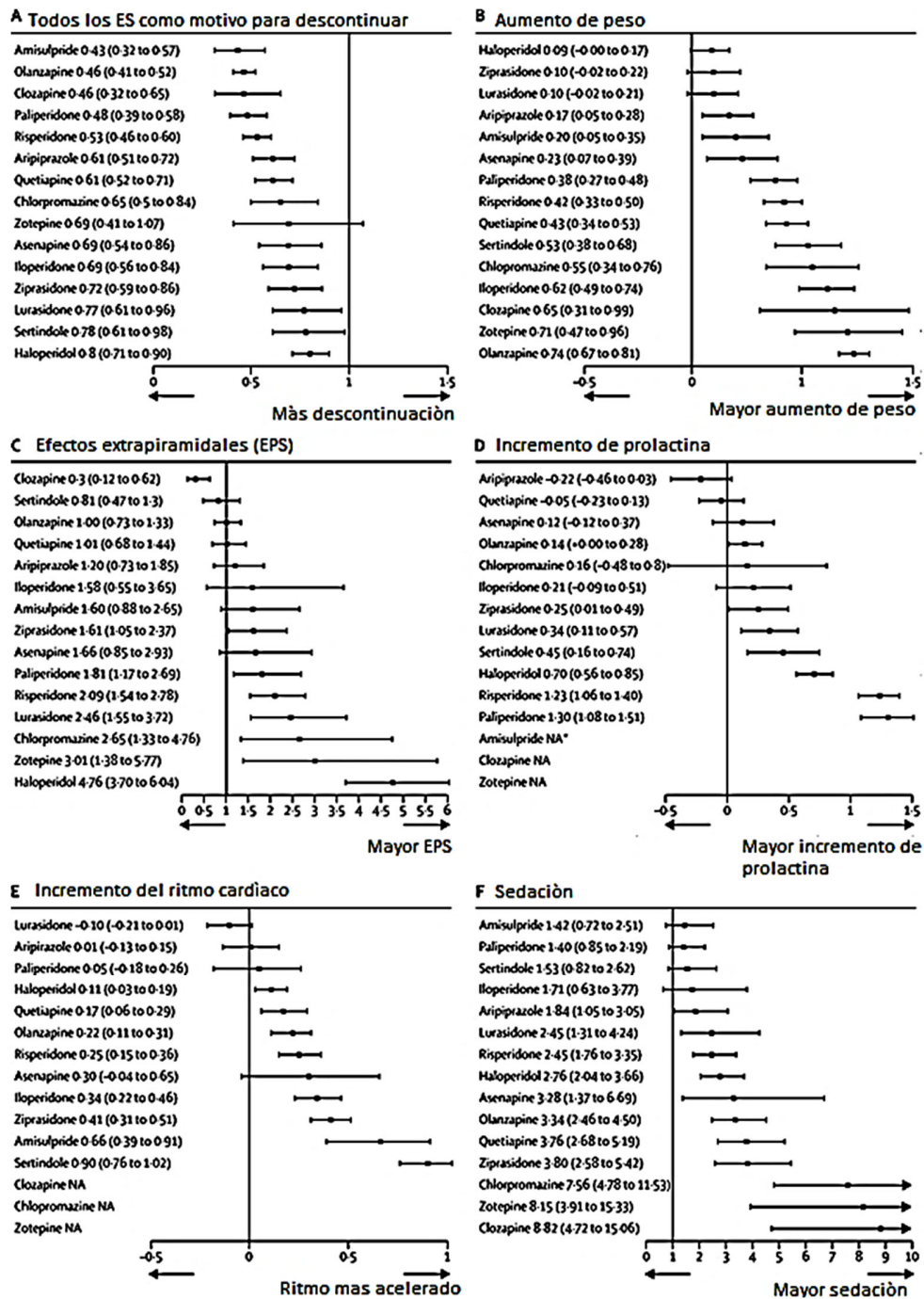


Figura 5. Diagrama de bosque de los efectos secundarios de APD. Se usó como referencia placebo. Los síntomas que se enlistan son motivos para la interrupción de los tratamientos con APDs. A) Por todas las causas, B) Por el aumento de peso, C) Por los efectos secundarios extrapiramidales, D) Por el aumento de prolactina, E) Por el incremento del ritmo cardíaco y F) Por la sedación, Imagen modificada de (Leucht et al., 2013).

2.3. Receptores asociados a riesgos cardiometabólicos

Los receptores asociados con mayor frecuencia a padecer los síntomas cardiometabólicos, son la serotonina 2C (5HT2C), la histamina 1 (H1) y los receptores muscarínicos 3 (M3) (Montastruc et al., 2015). Sin embargo, existen varias hipótesis que indican que el bloqueo de los receptores de histamina H1 genera el mecanismo primario del aumento de peso. El bloqueo del receptor H1 activa a la proteína quinasa AMP (AMPK) en el hipotálamo, la cual inhibe directamente la actividad de la acetil CoA carboxilasa que convierte el acetil CoA en malonil CoA. La disminución de los niveles de malonil-CoA desinhiben la actividad de la carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1) que regula la ingesta de comida y la termogénesis de tejidos grasos, (figura 6). Por lo tanto, el bloqueo del receptor H1 genera un estímulo exacerbado del apetito (Montastruc et al., 2015). El cuadro clínico es aún más grave durante el tratamiento a largo plazo, ya que se genera una disminución en la energía (sensación de fatiga), además de la inhibición de la lipólisis y el aumento en la lipogénesis, los cuales derivan en la obesidad (He et al., 2013).

El bloqueo combinado de los receptores H1 y 5HT2C ha sido especialmente asociado con la propensión a padecer diabetes mellitus tipo 2 y al aumento de peso. Este fenómeno permitiría explicar por qué los antipsicóticos atípicos como la olanzapina y la clozapina, que presentan grandes afinidades por los receptores 5HT2C y H1, presentan las mayores probabilidades de ganancia de peso (Montastruc et al., 2015). Actualmente existe un gran interés por parte de la psiquiatría académica en desarrollar fármacos que no tengan este tipo de efectos adversos y se concentren en tratamientos para obtener resultados sobre los síntomas de la esquizofrenia.

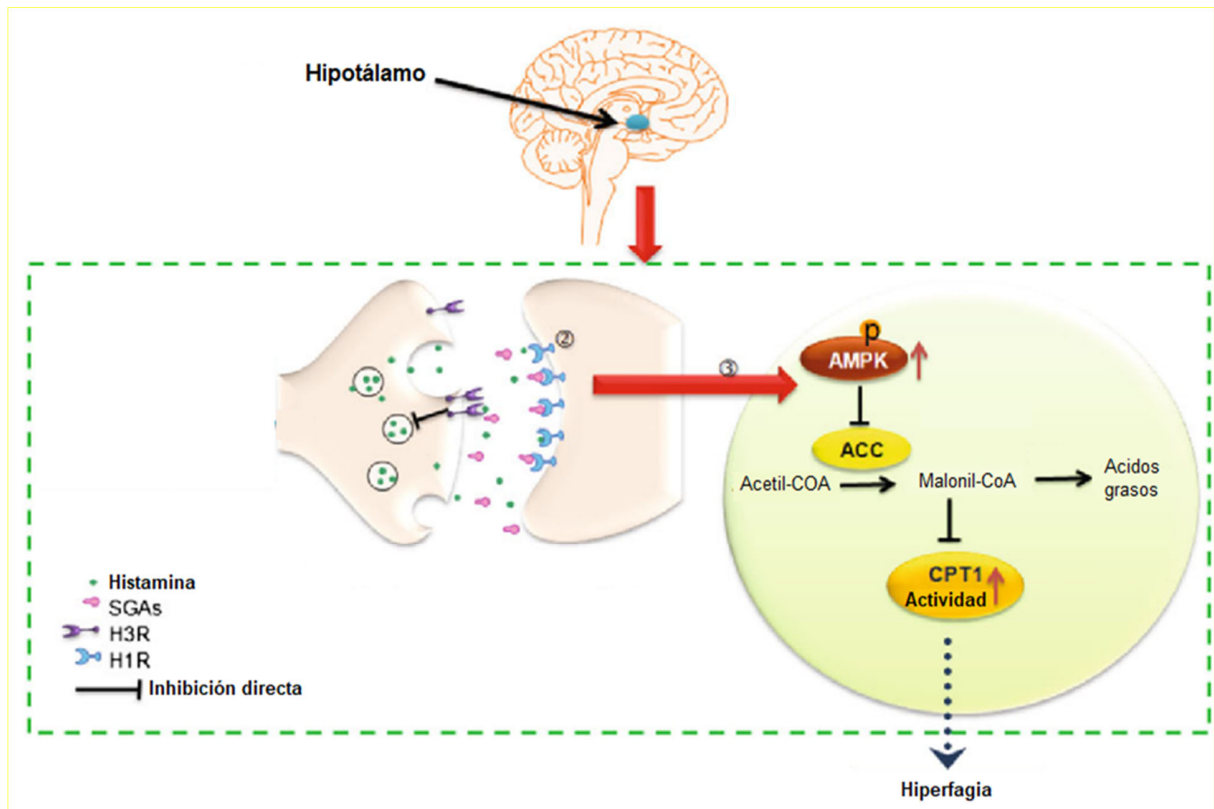


Figura 6. El bloqueo del receptor H1 activa a la proteína quinasa AMP (AMPK) la cual inhibe directamente la actividad de la acetil CoA carboxilasa que convierte el acetil CoA en malonil CoA. Niveles bajos de malonil-CoA desinhiben la actividad de la carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1) que regula la ingesta de comida y la termogénesis de tejidos grasos. Imagen modificada de (He et al., 2013).

2.4 Definición, estructura y función de la familia de los receptores D2 y H1

Los receptores D2 y H1 pertenecen a la misma subfamilia de los denominados receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por *G Proteins Coupled Receptors* en inglés) debido a que ejercen su acción fundamentalmente asociándose a una familia de proteínas heterotriméricas (formadas por subunidades alfa, beta y gama) que presentan actividad hidrolasa de guanosina-5'-trifosfato (GTP) o GTPasa (García Sainz, 2011). Se estima que las GPCRs son el blanco terapéutico de por lo menos 40% de los fármacos utilizados en la práctica médica (García Sainz, 2011), debido a que se trata de sensores moleculares que se encuentran en la membrana celular y son responsables de acoplar la unión de una molécula señal (un ligante) a su receptor con la hidrólisis de GTP.

Las GPCRs presentan estructuras constituidas por una sola cadena de 400-600 aminoácidos cuyo extremo amino-terminal se localiza en la porción extracelular de la célula y el extremo carboxilo terminal en el citoplasma. La región intermembranal consta de siete hélices alfa que se unen por tres asas intracelulares y tres extracelulares, por eso a esta familia también se le conoce como receptores 7TM (7 transmembranales) (Garcia Sainz, 2011), (Figura 7).

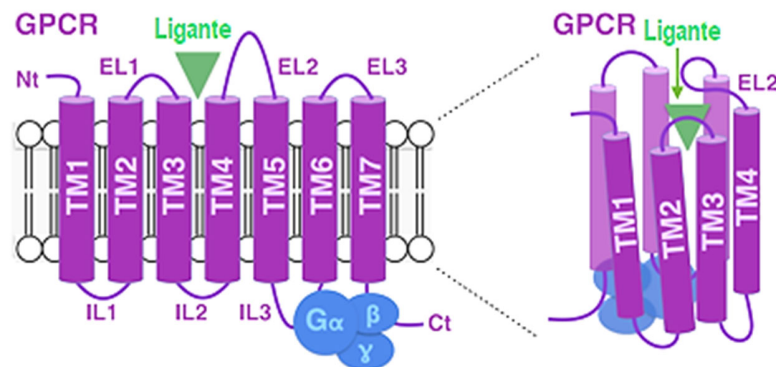


Figura 7. Representación de la estructura general de las proteínas G acopladas. La región morada constituye la cadena de aminoácidos, mientras que en verde se muestra el ligante, en azul las proteínas G y en gris la membrana lipídica; (EL es *13ntracelular loop*; IL por *13ntracelular loop*, por sus siglas en inglés).

El asa que une las hélices TM5 y TM6, así como el extremo C-terminal del receptor, ambos ubicados en el citoplasma, son importantes para las interacciones con las proteínas G (González Morán, 2018), debido a que pueden llegar a interactuar con las subunidades α , β y γ de las proteínas G en la transducción de señales. En el caso de las proteínas G heterotriméricas, la capacidad de interacción con los nucleótidos GTP o GDP reside en la subunidad α , que presenta un dominio de interacción a nucleótidos y a su vez, actividad GTPasa; es decir, la subunidad α es capaz, de forma intrínseca, de hidrolizar el GTP a GDP (González Morán, 2018). Aparte del dominio de interacción con el GTP, se distinguen otros tres dominios adicionales: el dominio de interacción con las subunidades β y γ , situado en el extremo N-terminal, el dominio de interacción con la enzima efectora o el canal y el dominio de interacción con el complejo receptor-ligante, en su extremo C-terminal (González Morán, 2018). Las subunidades β y γ de menor peso molecular presentan fundamentalmente la función de anclaje a la membrana (González Morán, 2018).

Estos receptores al activarse por sus agonistas naturales, hormonas y neurotransmisores, sufren cambios conformacionales que transmiten a las proteínas G, las cuales inician una transición del estado inactivo al

activo asociado a la unión e hidrólisis de GTP (García Sainz, 2011). Las proteínas G heterotriméricas, en su estado inactivo, presentan GDP unido a la subunidad α . Cuando la hormona se une al receptor, el complejo interacciona con la proteína G, lo que permite el intercambio de GDP por GTP. Esta activación provoca además, la disociación de la subunidad α de las subunidades β y γ . Una vez disociada la subunidad α -GTP, está preparada para actuar sobre el efector y modular su actividad. Dado que la subunidad α presenta una actividad GTPasa intrínseca, la hidrólisis posterior del GTP a GDP posibilita la reasociación de las subunidades α , β y γ , con lo cual se obtiene la configuración inicial de vuelta, (Figura 8) (González Morán, 2018).

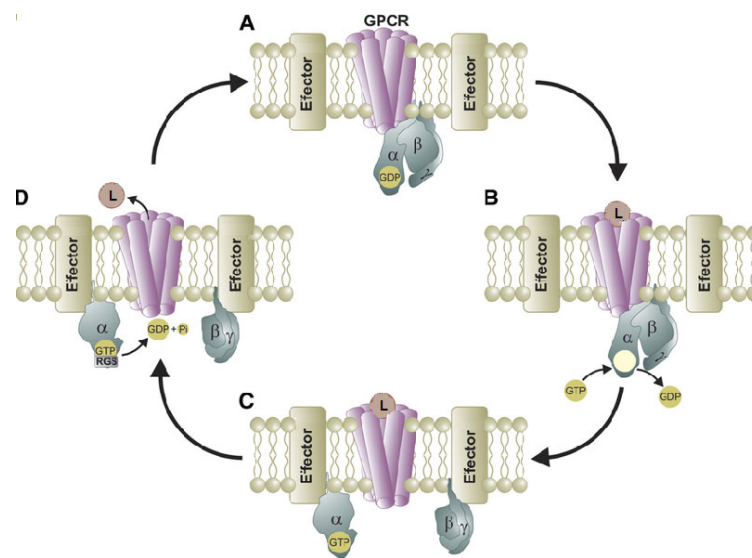


Figura 8. Ciclo de activación de las proteínas G mediadas por sus receptores acoplados. En ausencia de estímulo, la subunidad $G\alpha$ unida a GDP y el dímero $G\beta\gamma$ están asociados con al receptor. Al unirse un ligante "L" en el GPCR se induce un cambio conformacional que promueve el intercambio de GDP por GTP desde la subunidad α , lo que resulta en la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$ del receptor. Imagen modificada de: (Weis & Kobilka, 2018)

Las formas activas de las proteínas G pueden modular positiva o negativamente a diferentes canales iónicos (principalmente para potasio o calcio) o a enzimas generadoras de segundos mensajeros (González Morán, 2018). Se han caracterizado distintos tipos de enzimas efectoras capaces de ser activadas por proteínas G. Ejemplos de estas enzimas son la adenilil ciclase, que cataliza la formación del AMP cíclico y la fosfolipasa C (fosfoinositidasa), que cataliza la formación de dos segundos mensajeros: el inositol 1, 4, 5 trisfosfato y el diacilglicerol. Estos receptores reciben el mensaje del primer mensajero en la cara extracelular de la membrana plasmática e induce la producción, degradación o el cambio de concentración de metabolitos o iones mediados por los segundos mensajeros o factores de acoplamiento, como el canal

iónico de calcio, que permiten que la señal se propague al interior de la célula (García Sainz, 2011). En la figura 9, se esquematiza el ejemplo de señalización de las proteínas G a la ruta del AMPc.

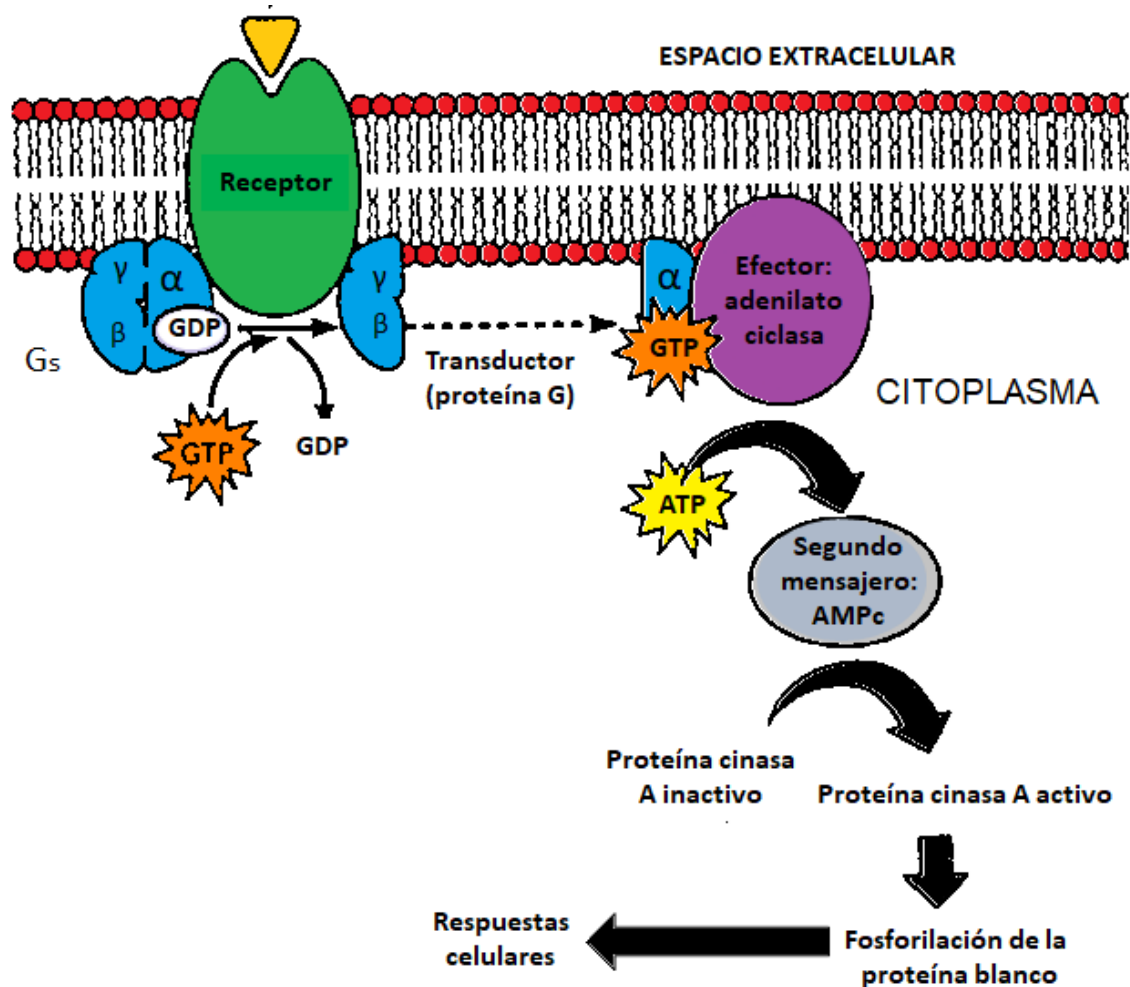


Figura 9. La vía de señalización de la adenilato ciclasa. La adenilato ciclasa (AC) fue la primera enzima caracterizada capaz de ser activada por proteínas G. La AC cataliza el ciclamiento del ATP (substrato) para originar AMP cíclico (AMPc), que es la molécula con actividad de segundo mensajero. El incremento en los niveles de AMPc pone en marcha el siguiente paso en la transducción de señal, que consiste en la activación de la proteína-quinasa A (PKA), la cual puede modificar la expresión génica de determinados genes. Imagen tomada de (González Morán, 2018).

Además, es posible que un ligante, ya sea un fármaco de origen natural o sintético, actúe como agonista (los que se unen al receptor y generan una respuesta en la célula), antagonista (los que bloquean la acción del agonista) o agonista inverso (los que generan una respuesta contraria a la ocasionada por el agonista), Figura 10.

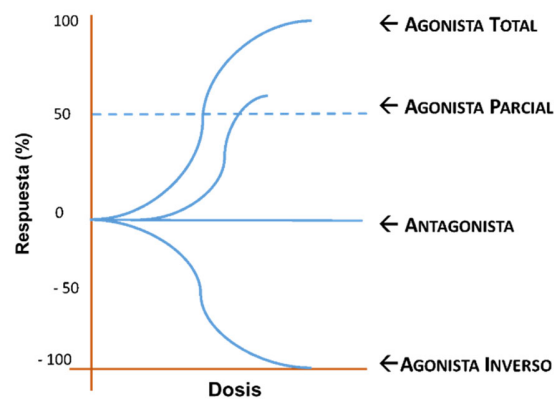


Figura 10. Muestra los tipos de ligantes según la respuesta que pueden inducir en un receptor. Los agonistas inducen una activación del receptor y pueden ser parciales o totales. Los agonistas inversos generan una desactivación del receptor con la misma magnitud del agonista, mientras que los antagonistas bloquean al receptor.

Las modificaciones postraduccionales en las GPCRs cumplen una función importante para modular la acción de los ligantes. Por ejemplo, cuando se une una determinada cantidad de agonista, por ejemplo, aminas simpaticomiméticas, es decir, que estimulan el sistema nervioso simpático, como la adrenalina o la dopamina, se presenta una activación intensa que decae con el tiempo; al aplicar una segunda dosis, frecuentemente la respuesta es menor y las dosis posteriores tienden a tener un efecto aún menor. A este proceso se le denomina desensibilización o taquifilaxia (García Sainz, 2011). Estudios en células *in vitro* han permitido establecer varias etapas en la desensibilización. En una etapa inicial, que toma unos cuantos minutos, se producen cambios en las modificaciones postraduccionales del receptor. En las GPCRs existen glicosilaciones en la cara extracelular, así como fosforilaciones y palmitoilaciones en la cara intracelular del receptor.

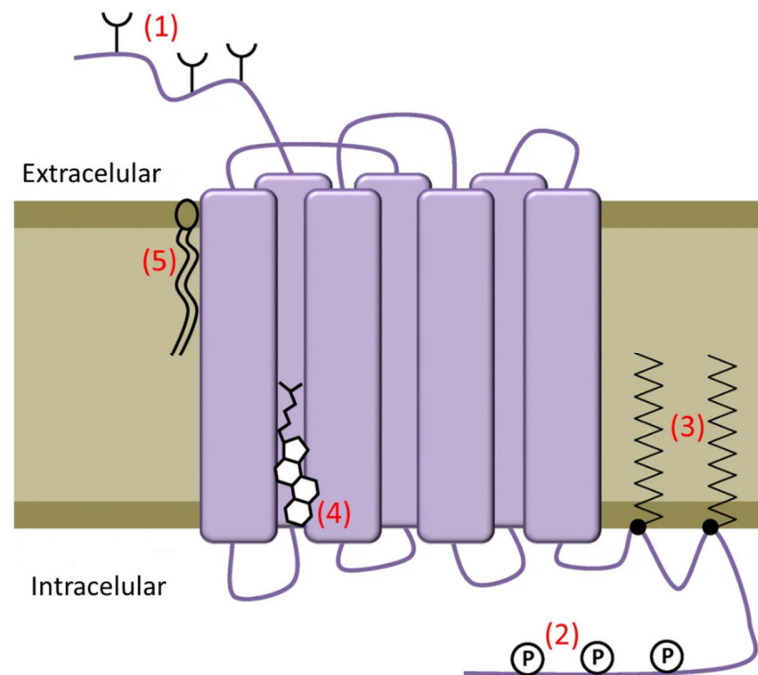


Figura 11. Esquema de regiones en las GPCRs. Zonas extracelulares, intracelulares, modificaciones postraduccionales y regiones helicoidales. Las GPCR tienen siete dominios transmembrana (TM) con un amino terminal extracelular y un terminal carboxilo intracelular y bucles intracelulares y extracelulares alternos. Estas se someten a una variedad de modificaciones postraduccionales e interactúan con varios componentes de la membrana. (1) El extremo amino terminal y los bucles extracelulares de los receptores a menudo están glicosilados, lo que puede ser vital para la correcta localización de la superficie celular. (2) La cola carboxi-terminal sufre una fosforilación reversible, que es importante en la desensibilización de la señal y la internalización del receptor. (3) La palmitoilación reversible de los residuos de cisteína dentro de los bucles intracelulares y la cola carboxiterminal dan como resultado diferentes conformaciones del bucle a medida que los grupos palmitato penetran en la bicapa lipídica. (4) El colesterol puede interactuar en sitios específicos dentro de las hélices TM de GPCR, en este caso con las TM2 y TM4. (5) Los GPCR también pueden interactuar con componentes lipídicos específicos de la membrana. Estas interacciones y modificaciones actúan en concreto para modular la actividad de los GPCR. Imagen modificada de: (Goddard A.D. , 2012)

La rodopsina se ha usado como modelo principal de la familia A de las GPCRs y ha sido ampliamente estudiada. Entre este receptor y los demás miembros de esta familia se comparten grandes similitudes estructurales y funcionales. La familia A constituye el 80% de las GPCRs en humanos y se expresan en el sistema nervioso central y prácticamente en todos los tejidos periféricos (Ortega-Gutiérrez, 2013). Por estudios de filogenia se agrupan las GPCRs en cinco familias principales nombradas glutamato, rodopsina, adhesión, *frizzled* / *Taste* y secretinas (Joost & Methner, 2002). La familia de la rodopsina es la más grande y forma cuatro clases denominadas alfa, beta, gamma y delta con 13 sub-ramas (Ortega-Gutiérrez, 2013). Existe evidencia de que las principales familias de las GPCRs surgieron antes de la división del linaje de los

nematodos que conduce a los cordados (Schiöth & Fredriksson, 2005). Sin embargo, la evolución de las GPCR en diferentes ramas filogenéticas es muy variable, ya que algunas de estas ramas son específicas para ciertos linajes como vertebrados o mamíferos, mientras que otras se encuentran en una variedad de especies mucho más grande (Schiöth & Fredriksson, 2005).

En la clase A de la familia de las rodopsinas se encuentran los receptores adrenérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos y otros más, además de los dopaminérgicos e histaminérgicos que se describen a continuación:

1. **Receptores dopaminérgicos:** Existen 5 tipos y estos se engloban por similitudes estructurales en los tipos D1 o D2. Su ligante endógeno es la dopamina, esta se sintetiza a partir del aminoácido L-tirosina (Trzaskowski et al., 2012). La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendócrina. Estimulan la formación de AMPc como principal mecanismo de transducción de señales. Los subtipos pertenecientes a la familia D2 (D2, D3 y D4) inhiben la formación de AMPc, activan canales de K⁺ y reducen la entrada de iones de Ca²⁺ a través de canales dependientes del voltaje, efectos mediados también por proteínas G (G_{ai} y G_{ao}) (Ricardo Bahena-Trujillo, Gonzalo Flores, 1998). La distribución de dopamina en el cerebro es más restringida que la de noradrenalina. Las regiones cerebrales con más abundancia de dopamina incluyen el cuerpo estriado o striatum (parte del sistema motor extrapiramidal), ciertas zonas del córtex cerebral, región mesolímbica e hipotálamo, donde actúa como factor regulador de la secreción de hormonas hipofisarias (inhibe la secreción de prolactina; e induce la secreción de somatotropina) (G. J. Wang et al., 2009).
2. **Receptor histaminérgico-** Su ligante natural es la histamina que se sintetiza a partir de la L-histidina. Hay 4 subtipos diferentes de receptores para histamina en humanos (H1, H2, H3 y H4). Cumplen funciones de vasodilatación/vasoconstricción, picor, ardor, broncoconstricción, relajamiento de músculo liso, estimulación de la secreción de ácido gástrico, síntesis de anticuerpos, proliferación de células T, producción de citosinas, etc. (Parsons & Ganellin, 2006).

2.5 Estructuras cristalográficas de las GPCRs

La base de datos de proteínas (Protein Data Bank, por sus siglas en inglés, <https://www.rcsb.org>) almacena todas las representaciones estructurales de proteínas y otras biomoléculas. Estas estructuras fueron determinadas por métodos experimentales como difracción de rayos-X (DRX), microscopía electrónica criogénica (abreviada por sus siglas en inglés como cryo-EM), o por resonancia magnética nuclear (RMN). La resolución de una molécula por estos métodos analíticos, brinda conocimiento sobre la disposición tridimensional de cada uno de los átomos que la conforman en determinado estado según las condiciones en las que fue obtenida (fuerza iónica del solvente y ligante). También es posible construir un modelo de la estructura tridimensional a partir de métodos computacionales por homología o *ab initio* que correlacionan secuencias y estructuras previamente determinadas. No obstante se debe considerar que la calidad de los resultados depende de la información inicial o datos de entrada, por lo que siempre es mejor recurrir a fuentes experimentales de información (Lozano Aponte & Scior, 2014).

A la fecha, existen estructuras cristalográficas para los 54 miembros de la clase A de las GPCRs, las cuales, en su mayoría, se encuentran en estado inactivo ya que esta conformación es más estable para la cristalización. Los receptores con más estructuras cristalográficas son la rodopsina, con 55 entradas, seguida del receptor de adenosina 2a (A2a) con 47 y los receptores beta-1-adrenergico (β -A1A) y beta-2-adrenergico (β -A2A) ambos con 24 entradas; de estos cristales algunas conformaciones se encuentran en estado activo (Wallace Chan, 2018).

2.6 Motivos estructurales conservados que regulan la activación de la clase A de las GPCRs

Los cambios conformacionales de las GPCRS durante su activación se describen por un conjunto de movimientos en las cadenas laterales de motivos conservados específicos, a estos movimientos se les puede llamar descriptores moleculares. En presencia de ligante, estos motivos funcionan de manera sinérgica como puntos de regulación que inducen al receptor a determinada conformación que permite la unión de la proteína G. En la clase A de la familia de las GPCRs hay 4 motivos conservados (White et al., 2018).

Uno de los principales motivos es el denominado **D[E]RY** llamado así por su secuencia ASP3.49, ARG3.50 y TYR3.51 (nomenclatura de Ballesteros-Weinstein (Ballesteros J., Weinstein H., 1995)). Está ubicado en el TM3, y funciona como un punto de regulación al formar un puente salino en el estado inactivo con su

cadena lateral vecina, la ASP(GLU)6.30 (ASP 68% y GLU 20% conservados), a esta interacción se le conoce como candado iónico, y en inglés como *ionic lock* (Katritch et al., 2013; Weis & Kobilka, 2018; White et al., 2018). En algunos estudios sugieren que es necesaria la presencia de una proteína G para que el puente salino se rompa y transite al estado activo (White et al., 2018).

Otro motivo estructural altamente conservado es el **NPxxY** el cual está localizado cerca del final del TM7 y contiene a la TYR7.53 (92% conservada) la cual apunta hacia el TM1, TM2, y TM6 cuando el receptor está inactivo, se ha observado que puede llegar a formar enlace de hidrogeno con la ASP2.50 (White et al., 2018). En contraste, cuando pasa a la forma activa, esta tirosina cambia su conformación y rota hacia el eje medio del TM7 y cadenas laterales del TM6 y TM3 (Katritch et al., 2013).

El motivo **CWxP** conformado por la CYS6.47, TRP6.48 Y LA PRO6.50, ubicado en el TM6 es otro motivo altamente conservado en la familia de la rodopsinas. Durante la activación del receptor la PRO6.50 crea una torsión en el TM6 y define el movimiento angular de la TM6 que se mueve hacia afuera del grupo de las hélices transmembranales. Este movimiento es el más característico de la transición a la fase de activación y oscila entre los 6 y 14 Å (figura 12)(Katritch et al., 2013).

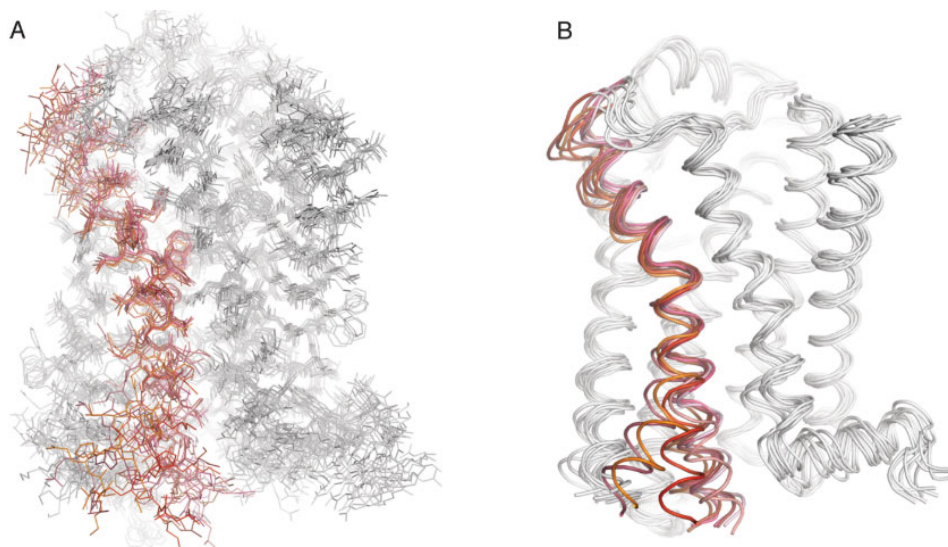


Figura 12. Cambios conformacionales una GPCR revelados a través de simulaciones de dinámica molecular. Cuadros representativos de simulaciones del receptor β 2AR unido a agonista a medida que pasa de un estado activo a un estado inactivo, con (A) todos los átomos que no son de hidrógeno representados como líneas y (B) el esqueleto de la proteína representado como cintas. La hélice transmembrana 6 (TM6) está coloreada en rojo para resaltar su alto grado de movilidad durante la transición entre los estados activo e inactivo. Imagen tomada de (Latorraca et al., 2017)

Otro descriptor molecular de fase activa es la orientación de la TRP6.48 hacia la PRO5.50 que pertenece a otro motivo conservado, el **PIF** (PRO5.50, ILE340 y la PHE6.44), estos residuos forman una interfase entre las TM3, TM5 y TM6 cerca del sitio ortostérico. La PHE6.44 en estado inactivo apunta hacia la ILE3.40, pero cuando el receptor es activado se ubica hacia La PRO5.50. A estos movimientos en conjunto se les conoce como alternador rotatorio o en inglés como *rotamer toggle switch*, en la figura 13 se puede observar donde se sitúan todos los motivos descritos en el receptor (Katritch et al., 2013; Kobilka & Deupi, 2007; Trzaskowski et al., 2012)-

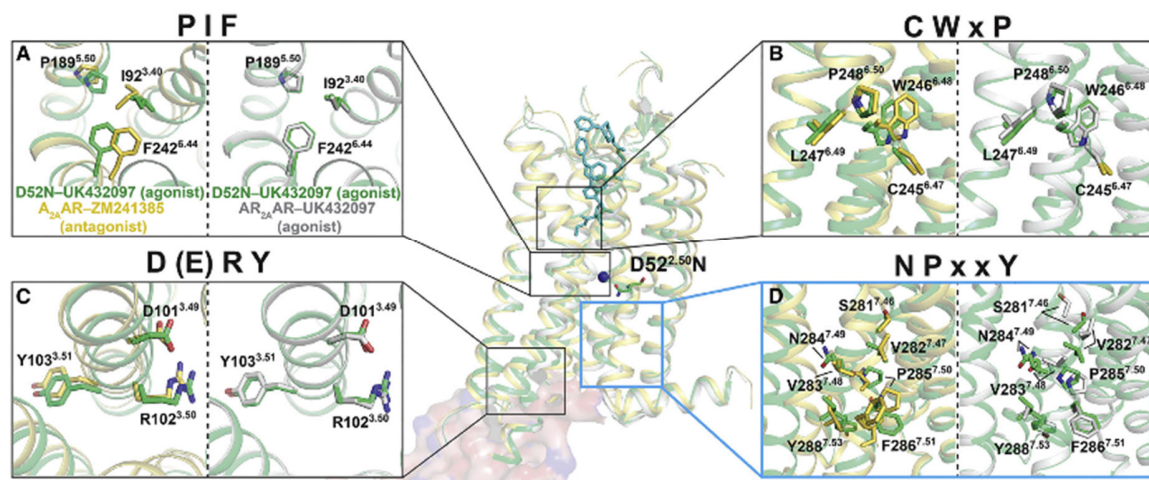


Figura 13. Dominios estructurales y sus movimientos en la activación de las GPCRs. Los aminoácidos que comprenden cada motivo estructural se muestran en representación de barras y se marcan mediante la nomenclatura de Ballesteros-Weinstein. Las posiciones de los motivos conservados en las estructuras globales se indican mediante cuadros en la superposición central de las tres estructuras. La ubicación del residuo D52^{2.50}N se indica en la vista global de la estructura. Además, los sitios de unión del ligando ortostérico (UK432097, barras de cian) y proteína G se muestran en el centro del compuesto, donde se muestra una representación superficial de la subunidad Gα_s y sus contactos con el receptor A_{2A}AR. Imagen obtenida de: (White et al., 2018).

Debe tenerse en cuenta que los movimientos en los motivos conservados descritos no siempre se cumplen para todas las transiciones de fase inactivo/activo (Katritch et al., 2013). Por ejemplo, algunas estructuras cristalográficas de GPCRs en fase activa e inactiva no mostraron cambios en el dominio TRP6.58. Además, un estado no descrito en el rotámetro TRP6.48 fue observado en la fase inactiva de los receptores muscarínicos M2 y M3. Esto demuestra que este rotámetro no está necesariamente correlacionado con los estados activo/inactivo de esta clase de receptores. Otro ejemplo, es la ausencia de la formación del interruptor iónico en la estructura cristalina del β2AR en fase inactiva. Estos eventos sugieren que existen múltiples estados conformacionales intermedios, activos e inactivos en las GPCRs, es por ello que se debe tener especial cuidado al caracterizar todos estos. Cabe mencionar que las GPCRs y los receptores

moleculares en general, no son estructuras rígidas. Estos adoptan conformaciones variables en el tiempo, por lo que la transición al estado activo es gradual, es decir, existe una serie de conformaciones intermedias entre un estado y otro (Katritch et al., 2013).

No obstante, en general se puede diferenciar entre un estado y otro por medio de dos descriptores moleculares que miden cambios macroestructurales y se utilizan ampliamente para describir las GPCRS. Estos son el ángulo de doblamiento de la TM6 o bien la formación del candado iónico **DRY** y el RMSD del motivo **NPxxY**, porque además del rotámetro de la TYR7.53, la PRO7.50 ocasiona un ligero doblamiento en la TM7 que en la fase activa se hace que se incline hacia dentro del grupo helicoidal, Figura 14 (Latorraca et al., 2017).

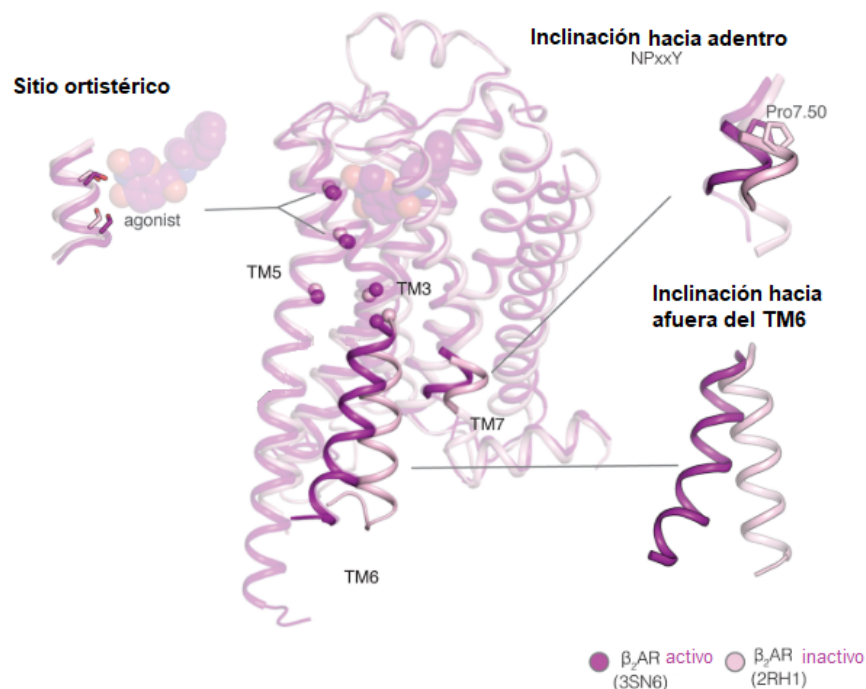


Figura 14. Reordenamientos estructurales durante la activación de GPCR. Las conformaciones inactivas (rosa claro) y activas (púrpura oscuro) del β2AR muestran diferencias en la posición de la hélice y la orientación de la cadena lateral en tres regiones distintas del GPCR: el sitio ortostérico (arriba, izquierda) y el sitio de acoplamiento intracelular de la proteína G (abajo). Imagen modificada de: (Latorraca et al., 2017).

2.7 Diseño *in silico* de fármacos

Históricamente los fármacos fueron descubiertos por serendipia. Se identificaban los ingredientes activos de productos naturales y se agrupaban en bibliotecas químicas (Shen, 1999). De estas bibliotecas surgieron

las bases para el diseño clásico, el cual se basó en el conocimiento *a priori* y pruebas *in vitro* e *in vivo* de nuevos compuestos con estructuras similares a las identificadas. Este proceso puede ser ser largo y costoso.

Desde que se desarrollaron metodologías de diseño de fármacos asistido por computadora, o diseño *in silico* o reverso, se han logrado reducir los costos, el tiempo de desarrollo y la cantidad de animales para experimentación. El número de compuestos diseñados de forma reversa que se encuentran en el mercado es grande, por lo que la investigación para el avance de métodos computacionales orientados a esta vía es cada vez mayor (Medina-Franco, López-Vallejo y Castillo, 2006).

El origen del diseño de fármacos por computadora se remonta a los estudios de Corwin Hansch quien, en la década de los sesenta, inició el desarrollo del método de relaciones cuantitativas estructura-actividad (por sus siglas en inglés, QSAR). Este proceso consiste en relacionar matemáticamente una estructura química con un proceso bien definido basado en descriptores moleculares. También existe el método de relación cuantitativa de estructura/actividad (QSAR) y estructura/propiedad (QSPR), este relaciona valores propios de las estructuras o propiedades químicas con la actividad biológica. (Brea et al., 2002).

En los primeros años de la década de los setenta se inició el uso de las gráficas moleculares generadas por computadora, lo cual condujo al desarrollo del modelado molecular en tres dimensiones, el cual puede definirse como la imitación, manipulación, cálculo y predicción de estructuras químicas reales y sus propiedades fisicoquímicas y biológicas asociadas. Las actividades biológicas asociadas incluyen plegamiento de aminoácidos, catálisis enzimática, estabilidad de proteínas y ácidos nucleicos; en tanto que las propiedades fisicoquímicas incluyen propiedades de óxido-reducción, catalíticas, de solubilidad, transiciones electrónicas, distribución de cargas, entalpías de formación, etc. Una ventaja sustancial de las metodologías de modelado computacional, es la descripción a nivel atómico de los sistemas moleculares, el cual representan una gran precisión de los cálculos. En la década de los ochenta y noventa comenzó a crecer el número de aplicaciones de diseño de fármacos que utilizan la información estructural de las macromoléculas biológicas con las que interaccionan los fármacos (Leach, 2001).

2.8 Métodos de simulación químico computacional.

No fue sino hasta el 2002, que en el diseño de fármacos se cambió la visión inicial de las proteínas como estructuras relativamente rígidas y se reemplazó por modelos computacionales dinámicos en el que los

movimientos internos y los cambios conformacionales resultantes desempeñan un papel esencial en la estructuración que implica al fármaco ligado (Leach, 2001). Los métodos de dinámica molecular (DM) permiten observar cambios conformacionales de dicho receptor y no únicamente del fármaco, lo que permite acceder a información crucial para el diseño de nuevas moléculas para uso clínico (Lozano Aponte & Scior, 2014).

Los métodos de simulación computacional son capaces de obtener una muestra representativa, con precisión suficiente, de las configuraciones de estos sistemas macroscópicos a una determinada temperatura. Existen dos grandes técnicas de simulación computacional: El método de Monte Carlo y las simulaciones por Dinámica Molecular (DM) (Sebastián Yagüe et al., 2015). Mientras que el primero se basa en analizar la energía de distintas coordenadas generadas de manera aleatoria, la DM permite generar una trayectoria de puntos que evolucionan con el tiempo siguiendo la segunda ley de Newton. Se trata por tanto de un método determinista, es decir, el estado de un punto de la trayectoria permite predecir el estado del siguiente.

Los métodos de dinámica molecular surgieron como una necesidad, en distintas áreas de la ciencia, para estudiar aquellas moléculas a nivel atómico que presentan cambios en intervalos de tiempo tan pequeños, del orden de femtosegundos, que no se pueden medir en el laboratorio. La primera simulación por dinámica molecular fue realizada por el Dr. Bernie Alder en 1957, para estudiar el equilibrio de fases, el uso de las ecuaciones de Newton de forma directa (Alder & Wainwright, 1957). No fue sino hasta 20 años después que se efectuó la primera simulación para sistemas biológicos por McCammon y Gelin en 1977 para estudiar la dinámica del péptido BPTI (por sus siglas en inglés, *bovine pancreatic trypsin inhibitor*) (McCammon et al., 1977).

La DM consiste en simular el comportamiento de un sistema físico a través del tiempo, al resolver fuerzas entre los átomos que lo conforman mediante las ecuaciones del movimiento de Newton. Una descripción más rigurosa de un sistema viene definida por la mecánica cuántica que describe en sus cálculos de manera explícita a los electrones, esto hace posible el estudio de la reactividad de la distribución de carga y la reactividad química (formación y ruptura de enlaces). Sin embargo, su uso está restringido a sistemas de centenares de átomos como máximo, por lo que es difícilmente viable para aquellos constituidos por decenas de miles de átomos (Leach, 2001).

La DM se basa en el principio de Born-Openheimer el cual considera que los núcleos atómicos son lo suficientemente pesados como para ser considerados como partículas clásicas, cuya dinámica puede ser estudiada mediante la segunda ecuación de Newton, $F = ma$, cuya forma diferencial viene dada por:

$$\frac{d^2Y}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} \quad (1)$$

Siendo F_i la fuerza aplicada a la partícula i con masa m_i y Y la distancia recorrida en función del tiempo t . A partir de las coordenadas velocidades iniciales se determina la energía potencial y la energía cinética del sistema, siendo la energía total la suma de ambas (Leach, 2001).

La evolución temporal del sistema se puede calcular con métodos de integración numérica. De este modo se obtienen pequeñas etapas sucesivas separadas en el tiempo por un intervalo fijo ∂t (tiempo de integración) (Gago, 1994). La fuerza que actúa sobre cada partícula en un instante de tiempo t se determina mediante la derivada de la energía potencial con respecto a las coordenadas

$$F = -\frac{\partial E_{potencial}}{\partial x} = 0 \quad (2)$$

2.9 Integración de las ecuaciones de movimiento

El método más simple para integrar las ecuaciones de movimiento es mediante algoritmos que aplican las series de Taylor (Leach, 2001). Empleando esta aproximación, la posición de una partícula a tiempo $t + \partial t$ se expresa en función de su posición, velocidad y aceleración.

$$x_i(t + \partial t) = x_i(t) + \frac{\partial x_i}{\partial t} \partial t + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 x_i}{\partial t^2} (\partial t)^2 \quad (3)$$

Uno de los métodos más utilizados para integrar las ecuaciones de movimiento en simulaciones de DM es el algoritmo de Verlet (Schiff & Verlet, 1967). Este usa las posiciones y aceleraciones a tiempo t y las posiciones en la etapa previa, $x_i(t - \partial t)$, para calcular las nuevas posiciones a $t + \partial t$, $x_i(t + \partial t)$. El tiempo de integración se selecciona con base en que un tiempo de integración demasiado grande dará lugar a inestabilidades por solapamiento de altas energías, pero un tiempo demasiado corto recorrerá una región

limitada del espacio conformacional. En el caso de biomoléculas, los movimientos más rápidos provienen de las vibraciones de los enlaces entre átomos pesados e hidrógeno (X-H) que tienen lugar en la escala del femtosegundo (Sebastián Yagüe et al., 2015). Sin embargo, estos movimientos rápidos contribuyen poco al comportamiento global de la molécula y supondrían emplear más recursos computacionales. Para evitarlo, se utiliza el algoritmo SHAKE que mantiene constantes las longitudes de los enlaces X-H en sus valores de equilibrio y permite emplear un tiempo de integración mayor (2 fs), esto reduce el coste computacional (Ryckaert et al., 1977).

El valor de la fuerza se asume constante durante cada paso de integración. Al sumar sobre cada núcleo las fuerzas de interacción con las demás partículas del sistema se obtiene la fuerza total a partir de la cual podemos determinar las aceleraciones de las partículas que se combinan con las posiciones y velocidades al tiempo t para calcular las posiciones y velocidades a tiempo $t + \Delta t$ (Sebastián Yagüe et al., 2015).

2.10 Condiciones periódicas de contorno

Las simulaciones de DM deben intentar reproducir las interacciones de un solvente acuoso con el sistema de estudio, como el caso del agua en estos sistemas, ya que es de suma importancia, al modular el plegamiento de proteínas y ácidos nucleicos. Durante una simulación, el sistema biológico dentro de una caja de agua incluye átomos que se localizan en el borde del área de simulación. Para evitar anomalías y asegurar una inmersión completa del soluto en el solvente, se emplean condiciones periódicas de contorno de manera que el sistema se considera rodeado por replicas iguales en todas las direcciones y el cálculo de la simulación se desarrolla como si el sistema fuera infinito en el espacio (figura 15) (Smith., D. R., Nutt, 2007). La forma y tamaño de las cajas depende de la geometría del sistema, se usan cajas octaédricas y rectangulares para el estudio de ácidos nucleicos y proteínas (Smith., D. R., Nutt, 2007).

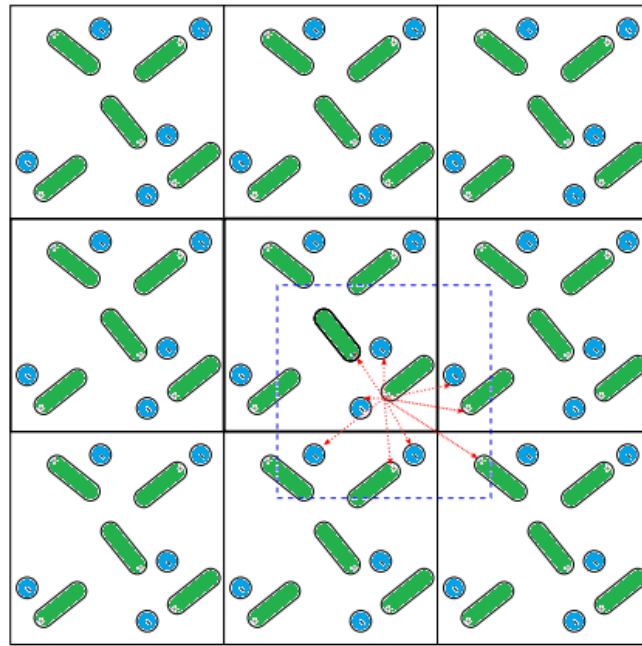


Figura 15. Ejemplo de condiciones de contorno periódicas (se ha considerado por simplicidad un caso bidimensional). La caja central se ha representado en trazo grueso, mientras que las partículas que se encuentran dentro de la caja de líneas discontinuas son las que interactúan con la partícula que se encuentra en su centro según la convención de mínima imagen. Las interacciones se representan por las flechas de trazo rojo.

El cálculo de los términos no enlazantes en una DM es el proceso más costoso en tiempo. Una aproximación muy utilizada para acelerar este proceso consiste en anular las interacciones entre los átomos que estén separados a determinada distancia, a esta distancia se le llama distancia límite o en inglés *cut off* (Leach, 2001). Es importante tener en cuenta que la distancia límite debe ser inferior a la distancia entre cualquier punto de la caja hasta cualquiera de sus copias vecinas. Sin embargo, el uso de esta distancia límite, sin embargo, afecta especialmente al término electrostático debido a que esta interacción es de largo alcance. Con la sumatoria de Ewald se consigue calcular la interacción electrostática total, al sumar las interacciones con réplicas infinitas del sistema original.

La sumatoria de Ewald se hace con la convención de mínima imagen, que consiste en considerar que cada partícula interactúa sólo con las imágenes de las otras $N - 1$ partículas cercanas a ella, tal y como se puede ver en la figura 15 donde una partícula dada interactúa con las ubicadas en una caja dibujada en línea discontinua centrada en dicha partícula (Tornberg, 2016).

2.11 Campo de fuerzas

La energía de una molécula en su estado basal, puede considerarse como una función de las coordenadas de los núcleos atómicos. Esta función se la denomina Campo de Fuerzas o *Force Field*, por sus siglas en inglés. Los cambios que se producen en la energía potencial de un sistema pueden representarse como una superficie, denominada superficie de energía potencial (Leach, 2001).

Un campo de fuerzas está formado por una función que describe la energía potencial y por los parámetros empíricos por cada uno de los términos usados para definir las moléculas. Los campos de fuerzas contienen un gran número de parámetros, incluso si están diseñados para modelar sistemas pequeños. El objetivo es encontrar un modelo capaz de aproximarse lo mejor posible a los valores experimentales, por lo cual es importante contrastarlos con datos experimentales (Hagler et al., 1974).

Los primeros campos de fuerzas para simulaciones biomoleculares fueron desarrollados por primera vez en 1970 (Huang & Levitt, 1977; Warshel & Karplus, 1972; Warshel & Levitt, 1976). Desde entonces un gran número de campos de fuerza empíricos se desarrollaron para la simulación de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras moléculas biológicas. Es importante diferenciar entre los programas empleados en simulación y los parámetros desarrollados para ellos, dado que en muchas ocasiones los nombres coinciden. Entre los programas más usados para las simulaciones de DM destacan AMBER, CHARMM, GROMOS, NAMD y TINKER (Jensen, 2007).

Una característica importante de los campos de fuerzas es su capacidad de poder ser transferidos, es decir, una misma serie de parámetros puede ser empleada para el estudio de distintas moléculas relacionadas entre sí. La mayoría de los campos de fuerzas empleados para sistemas moleculares pueden definirse mediante una ecuación con dos componentes principales que incluyen las interacciones enlazantes y no enlazantes del sistema:

$$E_{total} = \underbrace{E_{enlace} + E_{ángulo} + E_{torsional}}_{\text{Enlazantes}} + \underbrace{E_{vdw} + E_{elec}}_{\text{No enlazantes}} \quad (4)$$

Los términos enlazantes incluyen contribuciones debidas a los enlaces covalentes, ángulos de valencia y ángulos torsionales propios e impropios. Los términos no enlazantes se definen por dos términos, de atracción o repulsión del tipo Lennard-Jones para las fuerzas de VDM y términos coulómicos para las interacciones electrostáticas (Jensen, 2007). En la siguiente figura se esquematizan ambos tipos de interacciones.

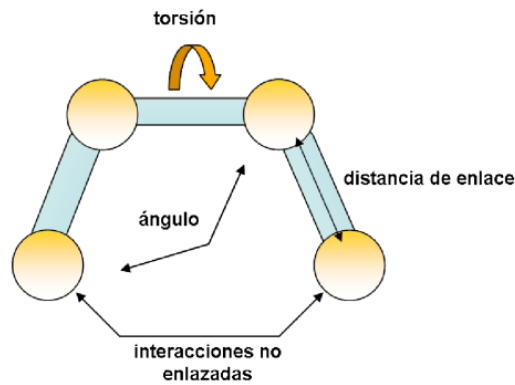


Figura 16. Esquema de las interacciones enlazantes y no enlazantes que se tienen en cuenta en un campo de fuerzas de DM. Imagen obtenida de: (Sebastián Yagüe et al., 2015).

El término de enlace mantiene las longitudes de enlace cercanas a los valores de equilibrio medidos experimentalmente (Sebastián Yagüe et al., 2015). En términos generales la energía potencial para un enlace covalente se define mediante la ley de Hooke, por la cual la energía varía en función del desplazamiento desde la longitud de referencia del enlace (Leach, 2001).

$$E_{enlace} = \frac{K_r}{2}(r - r_{eq})^2 \quad (5)$$

La variación de los ángulos con respecto a sus valores de referencia se representa mediante un potencial armónico de Hooke:

$$E_{ángulo} = \frac{K_\theta}{2}(\theta - \theta_{eq})^2 \quad (6)$$

El término de torsión describe la variación de la energía asociada a la rotación alrededor de un enlace B-C dentro de una serie de cuatro átomos A-B-C-D unidos entre sí. Se caracteriza por presentar una periodicidad en el ángulo ϕ : si el enlace rota 360° la energía debe volver al mismo valor. Su perfil energético se expresa como una serie de Fourier:

$$E_{torsional} = \frac{V_n}{2}[1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (7)$$

La constante V_n determina la altura de la barrera de torsión alrededor del enlace B-C, n describe la multiplicidad (el número de mínimos en la función cuando se rota 360° , ϕ el ángulo de torsión y γ el ángulo de fase (indica en qué punto pasa la torsión por mínimo energético (Leach, 2001).

Para los términos no enlazados, las moléculas y los átomos independientes interaccionan entre ellos a través de interacciones de VDM e interacciones electrostáticas. En los siguientes apartados se explica en qué consisten.

2.12 Interacciones de Van der Waals

Estas interacciones se originan a partir de un balance entre fuerzas atractivas y repulsivas. Esta energía de interacción varía en función de la distancia entre ambos átomos y llega a ser despreciable a distancias relativamente cortas $\approx 5 \text{ \AA}$. Al reducirse la distancia, la energía disminuye hasta llegar a un mínimo. Después, la energía crece rápidamente al continuar disminuyendo la distancia. La función más eficiente conocida para describir las interacciones de VDM es la función de Lennard-Jones:

$$E_{vdw}(r_{ab}) = 4\epsilon \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^6 \quad (8)$$

r es la distancia entre A y B; ϵ es la profundidad del potencial y describe con cuanta fuerza se atraen A y B; σ es la distancia finita a la que el potencial interpartícula es cero y es igual a la mitad de la distancia internuclear entre partículas no unidas. (Figura 17).

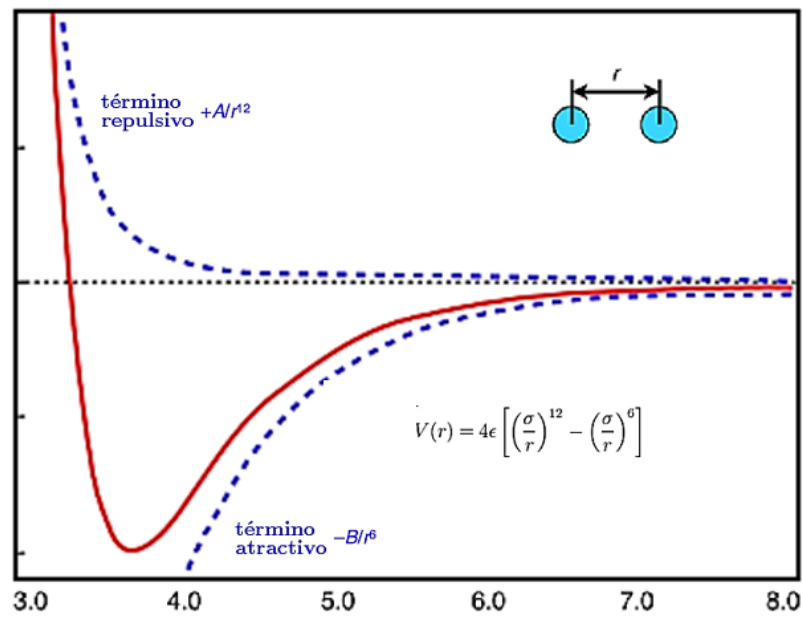


Figura 17. Potencial de Lennard-Jones. Imagen obtenida de: (Martinez Tellez, 2009)

2.13 Interacciones electrostáticas

La distribución de la carga en una molécula se puede representar como una ordenación de las cargas puntuales. Estas cargas reproducen las propiedades electrostáticas de la molécula. En el caso de que las cargas estén centradas en los núcleos, se las denomina cargas atómicas parciales. La interacción electrostática de una molécula se calcula, por tanto, como la suma de las interacciones entre pares de cargas puntuales según la ley de Coulomb (Jensen, 2007).

$$E_{elec}(r_{AB}) = \frac{q_A q_B}{4\pi\epsilon_0 r_{AB}} \quad (9)$$

Donde q_A y q_B son las cargas puntuales de cada átomo, r_{AB} la distancia entre ellos y ϵ_0 la constante dieléctrica del medio que las separa. Si las cargas puntuales de dos átomos son contrarias estos se atraerán entre sí, pero si las cargas son del mismo signo se repelerán.

Se requieren de distintas fases para preparar un sistema dado y obtener así, un muestreo válido para los estados conformacionales en una determinada condición termodinámica. Estas fases son la minimización de energía, calentamiento y equilibrado. En los apartados siguientes se explica en qué consiste cada uno.

Dentro del campo de la bioquímica es muy común observar la formación de los llamados **puentes salinos** entre aminoácidos como la lisina y el glutamato, o bien la arginina y el aspartato. Dichos puentes salinos engloban dos tipos de interacciones que se presentan entre los grupos funcionales de dichos aminoácidos, enlaces de hidrogeno, entre los hidrógenos del grupos amino y los oxígenos del carboxilo e interacciones electrostáticas entre el nitrógeno del grupo amino y el oxígeno del grupo carboxilo, (Figura 18) (Carey, Francis & Sundberg, Richard, 2000).

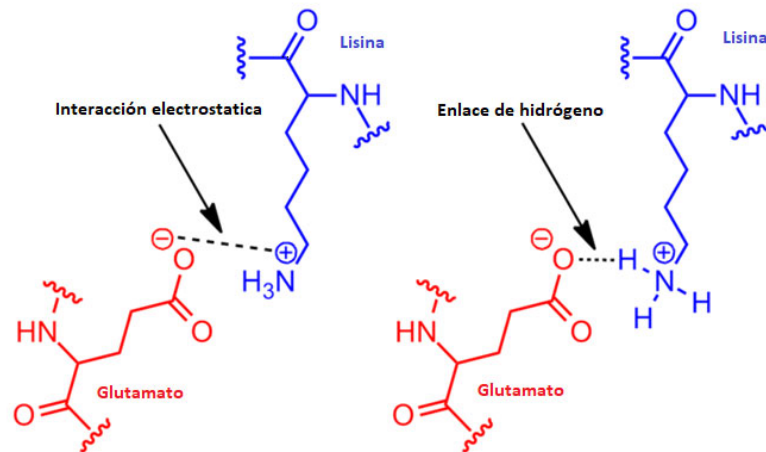


Figura 18. Puente salino formado entre los aminoácidos glutamato y lisina. En el diagrama se muestran los dos tipos de interacciones que conforman al puente salino, los enlaces de hidrógenos que se forman entre el oxígeno no enlazado del carboxilo y cualquiera de los hidrógenos del grupo amino y las interacciones electrostáticas de los átomos cargados entre los grupos amino y carboxilo.

2.14 Minimización de energía

La energía potencial de un sistema viene definida por el modo en el que la energía de las moléculas varía en función de sus coordenadas. Es necesario estudiar los puntos mínimos en energía potencial que corresponden a los estados estables del sistema. En muchos casos puede haber un gran número de mínimos en la superficie energética. Aquel punto con el mínimo energético más bajo se le conoce como mínimo global mientras que los demás puntos se los denomina mínimos locales (Figura 19). En un punto

mínimo, la primera derivada de la función de potencial “ f ” con respecto a las coordenadas cartesianas o internas (x_i) es igual a cero mientras que las segundas derivadas son positivas (Leach, 2001).

$$\frac{\partial f}{\partial x_i} = 0 : \frac{\partial^2 f}{\partial x_i^2} > 0 \quad (10)$$

Al punto energético más elevado en el camino entre dos mínimos se le conoce como punto de silla y corresponde al estado de transición, Figura 19 (Jensen, 2007). El proceso que permite identificar las geometrías del sistema que corresponden a los puntos de mínima energía potencial se denomina algoritmo de minimización (Jensen, 2007). Los métodos más empleados para la minimización de energía en modelado molecular son los basados en las derivadas de la función de potencial, especialmente el de “descenso más pronunciado” (*steepest descent*) y el de “gradiente conjugado” (*conjugate gradient*) (Stewart A., 2006). Ambos modifican las coordenadas de los átomos mientras desplazan el sistema hacia el del punto de mínima energía. El primero hace una búsqueda siguiendo la máxima pendiente y se suele emplear cuando la estructura a estudiar está muy alejada del mínimo. Al aproximarse a este punto mínimo, el método de descenso más pronunciado se vuelve demasiado oscilante y por ello puede sustituirse con el método de gradiente conjugado que evita estas oscilaciones. Los métodos de minimización generan configuraciones individuales de mínima energía que, en muchos casos, pueden ser suficientes para predecir ciertas propiedades de un sistema. Sin embargo, estos métodos difícilmente pueden ser aplicados cuando queremos estudiar las propiedades estructurales y termodinámicas de sistemas macromoleculares que contienen numerosos puntos mínimos de energía (Jensen, 2007).



Figura 19. Esquema de las zonas en un potencial energético. El punto energético más elevado en el camino entre dos mínimos se le conoce como punto de silla y corresponde al estado de transición entre dos mínimos, ya sean locales o globales.

2.15 Calentamiento, equilibrado y producción

Una vez optimizada la estructura, es necesario asignar velocidades iniciales a cada uno de los átomos. Esto se hace de manera aleatoria a partir de una distribución de Maxwell-Boltzmann a una determinada temperatura.

Una vez que el sistema ha sido minimizado y las velocidades han sido asignadas, puede comenzar la simulación propiamente dicha. Las simulaciones de DM se componen de dos etapas: Una fase de equilibrado y una fase de producción. El objetivo del equilibrado es llevar al sistema a un estado estable a partir de la configuración final del calentamiento, es preciso equilibrar las partículas bajo ciertas condiciones físicas, como son el volumen y la presión del sistema de simulación. Para el caso de la simulación de proteínas y ácidos nucleicos, se hacen simulaciones canónicas NVT, por las siglas **número de partículas, volumen y temperatura**, que se mantienen constantes para estabilizar el volumen y la temperatura, seguido de simulaciones isotérmico-isobáricas NPT, donde se mantiene constante la presión y la temperatura (Sebastián Yagüe et al., 2015).

Durante esta fase se monitorizan varios parámetros como la energía potencial, la temperatura y la densidad hasta que la fluctuación de estos valores se estabiliza. Para conseguir un equilibrado óptimo, en ocasiones se aplican restricciones al sistema, liberándolas a continuación lentamente para permitir su adaptación a las condiciones deseadas. Este proceso suele durar entre 200 y 500 picosegundos aunque en ciertos casos conviene equilibrar el sistema durante varios nanosegundos (Sebastián Yagüe et al., 2015).

Después de un correcto equilibrado comienza la producción, en la cual permitimos la evolución del sistema, obteniendo una trayectoria que será analizada a continuación. Cuanto mayor sea el tiempo de simulación, se explorará más espacio conformacional y por lo tanto los resultados serán más precisos. En general se estima que el tiempo de simulación debería ser al menos diez veces más largo que la escala temporal del proceso a estudiar. En la práctica esto significa que con los ordenadores actuales sólo se pueden simular procesos que tienen lugar en la escala de unos pocos nanosegundos aunque gracias a la mejora en los algoritmos de paralelización, la capacidad de almacenamiento en discos y el uso de supercomputadores se ha logrado simular hasta microsegundos (Sebastián Yagüe et al., 2015).

Distintos grupos científicos han juntado esfuerzos para crear paqueterías de DM de sistemas biológicos, que utilizan modelos cada vez más amplios y robustos. A pesar de los grandes avances realizados, las principales limitantes de la DM son el tiempo, el número de partículas en los sistemas, así como las

aproximaciones de los campos de fuerza. En consecuencia se observa de manera general que entre mayor sea el tamaño del complejo biológico, menor es el tiempo de simulación posible de simular. *V.gr.* la simulación de la maduración de la cápside del virus del VIH que se constituye por 65×10^6 átomos requirió una computadora con un rendimiento de 10 petaflops para hacer una simulación de 1 nanosegundo (Chipot, C. 2015).

2.16 Cálculos de energía libre: Métodos de electrostática en continuo

Alternativamente se han buscado formas más efectivas a la resolución de las ecuaciones de movimiento para cada átomo en un complejo, sobretodo aquellos de gran tamaño. Los métodos de cálculo de la energía libre permiten calcular la probabilidad de escribir el cambio de la energía entre un estado y otro. La probabilidad de encontrar un sistema en un estado u otro, está determinado por la diferencia de las energías libres de ambos estados y esta diferencia puede ser relacionada directamente con un amplio conjunto de parámetros como: constantes de afinidad, solubilidad, coeficientes de partición o de adsorción. Los cálculos de energía libre permiten analizar: fenómenos de transporte, la permeabilidad de barreras, mutagénesis dirigida, unión proteína- proteína, cálculo de los coeficientes de partición, unión de proteína-ligando, *V.gr.* la interacción entre fármacos y sus receptores (Jorgensen et al., 2011).

En términos de la mecánica estadística, las diferencias en energía libre pueden ser expresadas en términos de promedios sobre las energías libres asociadas a las configuraciones atómicas de los complejos moleculares de interés. Dichas configuraciones se generan por dinámica molecular o simulaciones Monte Carlo (MC) (Liu et al., 2012). Dependiendo del problema en cuestión, se elegirá el método que se ajuste más a la obtención de la diferencia en energía libre de Helmholtz ΔA_{ij} . De forma rigurosa, la diferencia en energía libre entre dos estados termodinámicos en un sistema a volumen constante es:

$$\Delta A_{ij} = -k_B T \ln \frac{Q_j}{Q_i} = -k_B T \ln \frac{\int_{V_i} e^{-\frac{U_i(\vec{q})}{k_B T}} d\vec{q}}{\int_{V_j} e^{-\frac{U_j(\vec{q})}{k_B T}} d\vec{q}} \quad (11)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, Q es la función canónica de partición, T es la temperatura en Kelvin, U_i y U_j son las energías potenciales en función de las coordenadas canónicas, esto es, coordenadas cartesianas y momento ($\vec{q}$) en el espacio donde todos los posibles estados son representados (espacio de

fase), V_i y V_j son el volumen del espacio de fase por donde se hará la medición. El volumen del espacio de fase es el set total de coordenadas y momentos en los que el sistema tiene una probabilidad distinta de cero de ser encontrado. En este contexto se asume que esta fase de espacio-volumen es la misma para ambas moléculas. Por cuestiones de notación en las siguientes definiciones se usa $k_B T = \beta$, y se usa la energía potencial en vez del Hamiltoniano más general H , para claridad (Liu et al., 2012).

De esta definición básica, se hace énfasis en que los cálculos de energía siempre son las diferencias entre dos estados, no hay energías libres absolutas. Todas las cantidades de interés en medidas biofísicas hacen alusión a las diferencias entre dos estados. Incluso las energías libres “absolutas” de enlace de fármacos siguen siendo la diferencia entre dos estados. Por ejemplo entre dos estados, (1) el del fármaco ligado al sitio de unión y (2) el del ligante y el receptor separados el uno del otro (J. Wang et al., 2006).

La energía libre relativa de unión como una propiedad computable es una buena medida de la afinidad de unión entre dos moléculas. Existen distintos métodos para calcular dicha energía, por ejemplo, los **cálculos de energía libre de electrostática en continuo**. Este tipo de métodos dan una mejor aproximación que los cálculos de acoplamiento molecular pero menor que los métodos de perturbación de energía libre (Liu et al., 2012).

Ambos métodos calculan la energía de interacción total por medio de un ciclo termodinámico artificial que separa la contribución de la energía de solvatación y la energía de interacción entre el receptor y el ligante. Es bien sabido que los sistemas biomoleculares tienen una dependencia del disolvente, y tienen hasta 90% de disolvente, por lo que las fluctuaciones en la energía total provienen mayoritariamente por este mismo y son de órdenes de magnitud mayores que la energía de enlace (Figura 20) (J. Wang et al., 2006).

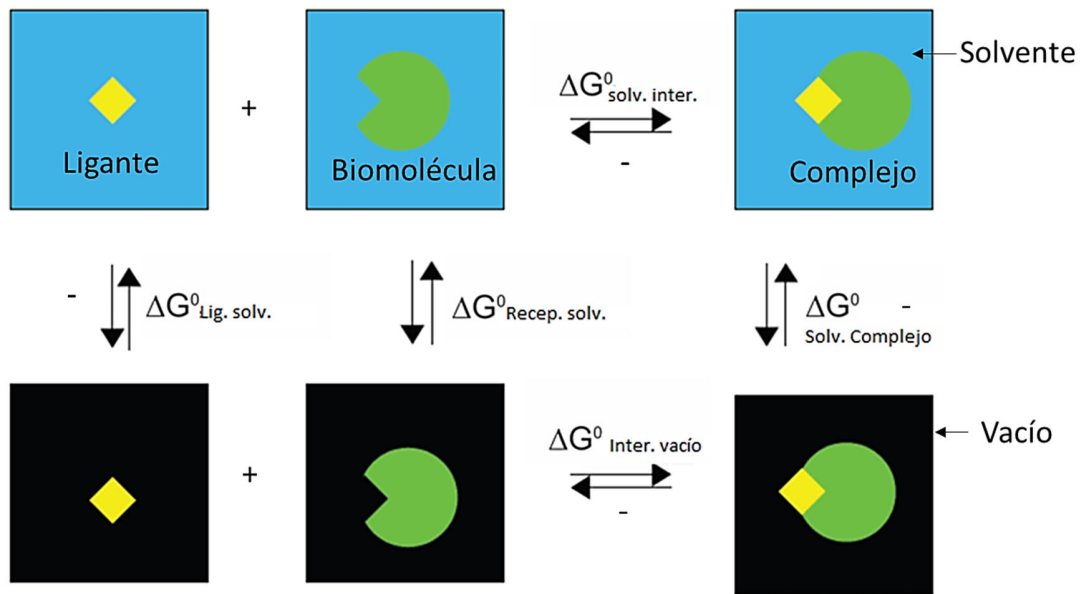


Figura 20. Ciclo termodinámico propuesto para el cálculo de la diferencia en energía libre de una biomolécula en interacción con un ligante en presencia de disolvente. La energía libre de unión se calcula obteniendo la diferencia en la energía de formación del complejo en el vacío y la energía libre de formación del complejo en presencia de disolvente. Así mismo, la energía de formación del complejo es la energía libre del complejo menos las energías libres asociadas a la biomolécula y el ligante no unidos.

Los métodos de MM/XBSA (por las siglas en inglés *Molecular Mechanics/ X*, puede ser método de Born generalizado o Poisson Boltzmann y *Surface Area*) suman las contribuciones de la energía internas (EMM) energía de solvatación (G_{solv}) y el producto de la temperatura (T) por la entropía de un sistema (SMM), definido por el complejo ligante-biomolecular y el solvente .

$$G^0_{\text{Int. solv}} = E_{\text{MM}} + G_{\text{solv}} - TS_{\text{MM}} \quad (12)$$

La energía interna es la contribución de las energías de enlace (torsionales, ángulos, enlace) y las energías no enlazantes dadas por las interacciones electrostáticas y de VdW

$$E_{\text{MM}} = E_{\text{enlace.}} + E_{\text{elec.}} + E_{\text{VdW}} \quad (13)$$

La energía de solvatación se calcula sumando la contribución de las energías polares y no polares. Las energías no polares se pueden calcular aproximándolas a la superficie accesible al disolvente, mientras que las contribuciones polares pueden obtenerse por el método de Poisson-Boltzmann (PB) o el de Born-Generalizado (GB). La idea del método de PB es calcular el potencial electroquímico de la interfase formada por los iones sobre una superficie polar. El potencial, $\nabla^2\psi$, se calcula con la ecuación de Poisson, para la que se necesita obtener la densidad de carga, que se calcula mediante la distribución de Boltzmann.

$$\nabla^2\psi = \frac{\partial^2\psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\psi}{\partial z^2} = -\frac{\rho_e}{\epsilon_r\epsilon_0}, \quad (14)$$

Donde ρ_e es la densidad de carga local en C/m³, ϵ_r es la constante dieléctrica del disolvente, ϵ_0 es la permitividad en el espacio libre y Φ es el potencial eléctrico.

La ecuación generalizada de Born (GB) es una aproximación del método de PB y hace uso de la ecuación de Coulomb en donde se asume, conjuntos de átomos con carga $q_{i/j}$, separados por una distancia $R_{i/j}$, cuyo dieléctrico interno, $\epsilon_{interna}$, es más bajo que el del ambiente ϵ_{Medio} . La agrupación de átomos se determina de acuerdo al entorno local, existen varios métodos y al radio de la esfera se le conoce como radio de Born, b_i .

$$G_{(Elec)} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} - \frac{1}{2} \left(1 - \frac{1}{\epsilon} \right) \sum_{i=1}^N \frac{q_i^2}{b_i} \quad (15)$$

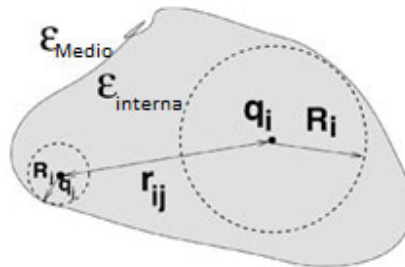


Figura 21. Diagrama donde se indican las constantes internas para el sustrato (proteínas o ácidos nucleicos) y del medio o solvente. ϵ corresponde a las constantes dieléctricas, q la cargas y r el radio de Born en un medio continuo de solvatación y sustrato (interna).

Debe tomarse en cuenta que los métodos de MM/XXSA ignoran la estructura molecular del disolvente; en algunos casos, esto podría afectar los resultados, particularmente cuando las interacciones clave entre el receptor y el ligante están unidas por moléculas de agua (Hayes et al., 2011).

Otros métodos mucho más precisos que los de solvatación en continuo como

Métodos basados en histogramas; en este método se monitorea la evolución de la simulación de una variable ξ , ya sea un ángulo diedro o torsional, a lo largo de un grado de libertad definido. Para estos métodos se calcula la probabilidad de encontrar al sistema dentro de este grado de libertad $P(\xi)$ y se relacionan con la energía en el equilibrio A_0 (Chipot, 2015.).

$$\Delta A(\xi) = -\frac{1}{\beta} \ln P(\xi) + \Delta A_0 \quad (16)$$

Simulaciones de trabajo fuera del equilibrio; este método se aplica en procesos físicos o químicos donde las variables termodinámicas cambian en función del tiempo, y es posible medir el trabajo para efectuar tal cambio. En estos métodos se correlaciona la energía libre del complejo en el equilibrio con el trabajo correspondiente a estados fuera del equilibrio. El promedio de varios ensayos con estados fuera del equilibrio deben converger al estado de energía en el equilibrio (Chipot, 2015).

$$\exp(-\beta \Delta A) = \langle \exp(-\beta \omega) \rangle \quad (17)$$

Integración termodinámica; este método mide la fuerza (J) que actúa sobre algún átomo o ion en dirección de las coordenadas de reacción definidas. Además, se define a los átomos involucrados en las coordenadas de reacción como centro de masa de la estructura analizada, v.gr. un canal iónico, en el que se busca analizar la ruta de un ion a través del canal. Una vez que se calcula la fuerza, se puede promediar a lo largo de la simulación, y se puede mostrar que el promedio de la fuerza equivale a la derivada de la diferencia en energía, por lo que integrando se encuentra el perfil de la energía (Chipot, 2015).

$$\frac{dA(\xi)}{d\xi} = \left\langle \frac{dU}{d\xi} - \frac{1}{\beta} \frac{d \ln |J|}{d\xi} \right\rangle_{\xi} \quad (18)$$

Cálculos de perturbación de energía libre (FEP)). Este método hace uso de la maleabilidad de la función de la energía potencial. Se transforma una especie química en otra, variando directamente la función de

energía potencial, las cargas o los parámetros no enlazantes. Lo interesante de este método es que solo requiere de un estado: estado de referencia, para obtener la relación con el estado siguiente (Chipot, 2015).

2.17 Cálculos de perturbación de la energía libre (FEP)

El desarrollo del método de perturbación de la energía libre se remonta a 1954, con el trabajo publicado por Robert Zwanzig (Zwanzig, 1954).

Lo que hace a FEP un método predilecto es que solo requiere del conocimiento de un estado de referencia para poder calcular la diferencia en cuanto al otro estado desconocido. Cabe mencionar, que este método debe reservarse para cambios mínimos de estado ya que entre mayor es la diferencia entre estos, mayor el riesgo de obtener cálculos erróneos (Tuckerman, 2007).

Este método también se le conoce como promediado exponencial, debido a que promedia con respecto al estado de referencia o estado cero. El método consiste en extraer estados durante una simulación por MD que va del estado inicial al final, denominados estado 0 y 1 respectivamente. A cada estado se le hacen perturbaciones de energía y el promedio de la diferencia de energía para cada estado perturbado con respecto al estado 0, equivale a la diferencia de energía entre 0 y 1. Lo mismo se efectúa en la trayectoria de simulación inversa, es decir, al tomar como referencia el estado final y seguir la trayectoria al estado 0, estratificando, perturbando y calculando la diferencia. Ambas diferencias en energía deben ser similares y converger, puesto que la diferencia es independiente del camino que se siga (Miyata et al., 2010).

La derivación de la ecuación para el método de la perturbación de la energía libre, parte de la energía libre de Helmholtz (Chipot, 2015):

$$A = k_B T \ln \frac{1}{Q} \quad (19)$$

Donde A es la función canónica de partición y es equivalente a $Q = \int e^{-\beta(U(\vec{q}))} d\vec{q} dp$, por lo que introduciendo dicha equivalencia tenemos que:

$$A = \beta^{-1} \ln \frac{1}{\iint e^{-\beta(U(\vec{q}))} dq dp} \quad (20)$$

Rescribiendo la unidad en el nominador como:

$$A = \beta^{-1} \ln \frac{\iint e^{-\beta(U(\vec{q}))} dq dp \iint e^{\beta(U(\vec{q}))} dq dp}{\iint e^{-\beta(U(\vec{q}))} dq dp} \quad (21)$$

Se puede notar que esta ecuación está normalizada por lo que se puede expresar en términos de la densidad de probabilidad $P(\vec{q})$

$$A = \beta^{-1} \ln \iint e^{-\beta(U(\vec{q}))} P(\vec{q}) dq dp \quad (22)$$

$$A = \beta^{-1} \ln \langle e^{-\beta(U(\vec{q}))} \rangle \quad (23)$$

De modo que la diferencia en energía libre A es:

$$\Delta A = \beta^{-1} \ln [\langle e^{-\beta(U_0(\vec{q}))} \rangle_0 - \ln [\langle e^{-\beta(U_1(\vec{q}))} \rangle_1] \quad (24)$$

Hacer converger las estructuras 0 y 1 es demasiado tardado en términos computacionales, porque los procedimientos de muestreo están diseñados para especies con bajas energías, pero las especies con altas energías en la ecuación anterior contribuyen exponencialmente a la suma, por lo que, partiendo de nuevo de la ecuación de Helmholtz y haciendo uso de las leyes logarítmicas tenemos:

$$\Delta A = \beta^{-1} \ln \frac{Q_A}{Q_B} = -\beta^{-1} \ln \frac{Q_B}{Q_A} = -\beta^{-1} \ln \frac{\iint e^{-\beta(U_1(\vec{q}))} dq dp}{\iint e^{-\beta(U_0(\vec{q}))} dq dp} \quad (25)$$

Se hace una modificación a la integral como se hizo con la ecuación 7

$$= -\beta^{-1} \ln \frac{\iint e^{-\beta(U_1(\vec{q}))} [e^{\beta(U_0(\vec{q}))} e^{-\beta(U_0(\vec{q}))}] dq dp}{\iint e^{-\beta(U_0(\vec{q}))} dq dp} \quad (26)$$

Y re-agrupando, al tener la normalización, se define en términos de la densidad de probabilidad

$$= -\beta^{-1} \ln \iint e^{-[\beta(U_1(\vec{q})) - \beta(U_0(\vec{q}))]} P_0(\vec{q}) \quad (27)$$

Lo que en notación Braket se escribe como:

$$\Delta A = \beta^{-1} \ln \left\langle e^{-\beta(U_1(\vec{q}) - U_0(\vec{q}))} \right\rangle_0 = \beta^{-1} \ln \left\langle e^{-\beta \Delta U(\vec{q})} \right\rangle_0 \quad (28)$$

De esta forma el diferencial de energía queda caracterizado por el promedio de los estados en torno al estado de referencia 0 (Chipot, 2015).

Una de las grandes ventajas de FEP es que es reversible y se puede volver a dichos estados, al introducir un parámetro de acoplamiento o perturbación, λ , que permite una transformación continua desde la energía potencial del estado 0 al 1 y viceversa en la siguiente relación lineal (Chipot, 2015):

$$U(\lambda) = (1 - \lambda)U_0 + \lambda U_1 \quad (29)$$

Para poder explicar más detalladamente de dónde proviene esta relación lineal, se necesita introducir la definición del **paradigma topológico dual**. En este, partimos de una configuración en la cual se efectúa una transformación alquímica, que implica la alteración de una especie química en una alternativa durante el curso de la simulación (Chipot, 2015). Los átomos en la topología molecular se pueden clasificar en tres grupos, (i) un grupo de átomos que no cambian durante la simulación, (ii) los átomos que describen el estado de referencia del sistema, y (iii) los átomos que corresponden al estado objetivo, al final de la transformación alquímica. Los átomos representativos del estado 0 al 1 no deberían interactuar con los del estado 1 a 0 a lo largo de la simulación de MD (Chipot, 2015). Tal configuración, en la que los átomos de los estados inicial (0) y final (1) del sistema están presentes en las topologías moleculares en ambos estados, es característico del llamado paradigma de **topología doble**. Por ejemplo, en la mutación puntual de una cadena lateral de alanina en una de serina, mediante un cálculo de perturbación de energía libre o integración termodinámica, la topología tanto del grupo metilo de alanina como del hidrógeno-oxígeno transportado en la serina coexisten a lo largo de la simulación (ver Figura 22), pero sin encontrarse realmente, es decir, que los átomos representativos del estado 0 al 1 no interactúan con los del estado 0 y 1 a lo largo de la simulación en MD (Axelsen & Li, 1998).

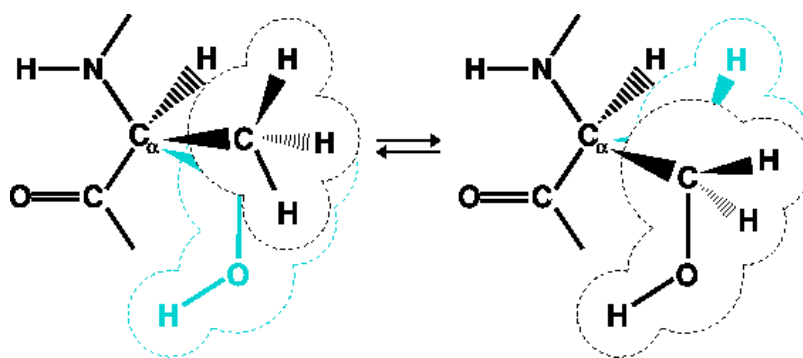


Figura 22. Descripción de topología dual para una simulación alquímica. Ejemplo de caso de la mutación de alanina en serina. Ejemplo de caso de la mutación de alanina en serina. El color más claro denota el estado alternativo que no interactúa con la parte señalada en línea discontinua negra. Imagen obtenida de: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.9/ug/node58.html>.

Se puede hacer uso del paradigma topológico dual para calcular el error de los cálculos de FEP. La contraposición de los histogramas de la densidad de las probabilidades en función de las energías potenciales para la trayectoria del estado 0 a 1 y de la trayectoria inversa, es un buen indicativo para corroborar que los cálculos de FEP tienen la variancia mínima; la correspondencia entre los histogramas para ambas trayectorias, debería en teoría ser la misma. Es por eso que, una gran diferencia es indicativo de que los cálculos son poco precisos. Normalmente, al incrementar el número de cálculos entre un estado y otros, es decir introduciendo más estados intermedios, se reduce el error de los cálculos al lograr relacionar un estado y otro por medio de la relación secuenciada de dichos estados. La variancia se calcula con la siguiente ecuación:

$$\sigma^2 = \frac{2}{n} \left[\left(\int \frac{2p_0 p_1}{p_0 + p_1} dq^N \right)^{-1} - 1 \right] \quad (30)$$

Donde n_0 es el número de configuraciones estadísticamente independientes de U_0 y n_1 para U_1 . Mientras que N son los grados configuracionales de libertad, $q_1, q_2, \dots, q_N$. La integral en esta ecuación es una medida de la sobreposición entre las dos densidades de probabilidad en el espacio de configuraciones (J. Wang et al., 2006).

Los cálculos de FEP son teóricamente muy rigurosos, por lo que sus cálculos son bastante confiables en el diseño de fármacos *in silico*. No obstante, el acoplamiento molecular es mucho más sencillo de automatizar, y por eso estos métodos son más populares. Se han vuelto a retomar los cálculos de FEP

debido a que en cuestiones de gasto computacional, es mucho más liviano y rápido, en el sentido que se pueden correr los cálculos en paralelo, a diferencia de otros métodos que forzosamente son subsecuentes. Debido los grandes avances tecnológicos y el cada vez mayor desarrollo de campos de fuerza, FEP se está convirtiendo en uno de los métodos preferidos para el diseño de fármacos, especialmente para aquellos en el que espacio-fase del estado final sea un subconjunto del estado inicial, es decir cuando las variaciones estructurales son pequeñas (Jorgensen et al., 2011).

En este trabajo se buscarán derivaciones de una sola molécula y se analizarán sus afinidades por los mismos receptores, es decir, que los estados inicial y final variarán muy poco y el error será muy bajo, por lo que esperamos valores muy precisos al aplicar FEP.

2.18 Estructuras tridimensionales disponibles de los neuroreceptores asociados a la esquizofrenia

El escenario de la modelación molecular en el diseño de fármacos está determinado principalmente por la disponibilidad de información acerca de la estructura tridimensional de los receptores a estudiar.

La obtención reciente de la estructura del receptor D2 por DRX proporciona un punto de partida para el diseño de medicamentos más efectivos y específicos para este receptor. Una ventaja adicional es que dicha estructura fue cristalizada con un ligante, la risperidona. El complejo de interacción entre la risperidona y el receptor aporta la localización del sitio de unión y aporta gran información respecto a la interacción del receptor con un ligante de segunda generación que pertenece a la misma categoría que la clozapina (S. Wang et al., 2018).

La estructura del receptor humano de histamina H1 fue obtenida por DRX en 2011 a una resolución de 3.1 Å. Dicha estructura fue cristalizada con el ligante doxepina, lo cual ofrece mucha información sobre el sitio de unión (Shimamura et al., 2011).

Otro receptor que se ha relacionado con la esquizofrenia es el receptor 5-HT_{2A} debido a que los antipsicóticos atípicos se unen a él, además de que el LSD que tiene afinidad por este receptor, induce síntomas parecidos a la esquizofrenia, fue cristalizado recientemente en 2019 (Kimura K.T., 2019).

Capítulo 3. Justificación, hipótesis y objetivos

3.1 Justificación

Es posible diseñar un fármaco con una mayor selectividad por el receptor D2, el cual es el centro de acción de los antipsicóticos. Esto se puede lograr a partir de la modificación de un antipsicótico con actividad conocida. Hasta ahora la clozapina, con actividad ampliamente caracterizada ha demostrado ser el antipsicótico más eficiente de su tipo y puede aliviar incluso los síntomas de la esquizofrenia refractaria y es por esto que en este trabajo se ha tomado a este fármaco como modelo inicial. El incremento de la selectividad del fármaco a proponer se puede lograr porque los sitios de unión de la clozapina en el receptor D2, y el receptor H1, que podría ser uno de los responsables de los efectos cardiometabólicos adversos, son lo suficiente distintos (22% de identidad) como para permitir hacer pequeños cambios en la estructura química de la clozapina y así eliminar o al menos reducir los efectos cardiometabólicos.

Mediante métodos *in silico* será posible reproducir de forma fiable la interacción dinámica de dichos fármacos con los receptores implicados y permiten calcular la energía de afinidad entre estos, la cual es suficiente para predecir una determinada actividad entre ligante-receptor, que está directamente relacionada con la actividad terapéutica y los efectos secundarios que se buscan reducir en la clozapina.

3.2 Hipótesis

Es posible proponer un derivado de la clozapina que mantenga su afinidad por el receptor D2 y disminuya la afinidad por el receptor H1 a través de métodos in-silico.

3.3 Objetivo general

Diseñar una variación en la estructura de la clozapina para anular la interacción con el receptor de histamina H1 y mantener la afinidad por el receptor de dopamina D2.

3.4 Objetivos específicos

1. Validar los modelos estructurales mediante análisis de la dinámica molecular.
2. Analizar la interacción entre la clozapina y los receptores D2 y H1 mediante dinámicas moleculares.
3. Calcular la afinidad relativa de los compuestos propuestos mediante métodos de cálculo de energía libre por métodos MM/GBSA MM/PBSA y FEP.

Capítulo 4. Metodología

4. 1. Obtención de las estructuras

Se obtuvieron las representaciones gráficas de los receptores a partir de los modelos cristalográficos disponibles en la base de datos del PDB (por sus siglas en inglés, *Protein Data Bank*, disponible en <http://www.rcsb.org/>). El receptor H1 (PDB id: 3RZE) se cristalizó con un agonista inverso el cual estabilizó la conformación inactiva. De igual manera, el receptor D2 (PDB id: 6CM4) se cristalizó con un antagonista que indujo al receptor a la conformación inactiva. Ambos modelos presentaron algunos átomos faltantes y mutaciones por lo que fue necesario reconstruir las proteínas.

4.2. Reconstrucción de los receptores

Los receptores se reconstruyeron con el programa I-tasser (disponible en <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Este programa reconstruye las proteínas por el método de enhebrado de motivos estructurales, la selección de las estructuras se hizo por homología de secuencias con otras estructuras reportadas.

La alimentación al programa I-tasser consistió en la introducción de la secuencia canónica que en el caso del D2 fue de 443 residuos y del H1 de 487. Además de los modelos tridimensionales mencionados en el párrafo anterior como la base principal de reconstrucción.

Una vez que se obtuvieron las estructuras reconstruidas se ajustaron estados de protonación para un pH 7.2 con la aplicación web PROPKA2.0 (http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/), después se minimizaron por 300 ciclos con el programa MAESTRO de Schrödinger, que usa el campo de fuerzas OPLS_2005.

4.3. Preparación de la clozapina

Se preparó la estructura tridimensional de la clozapina con el campo de fuerza OPLS3 usando el programa Maestro. En este se encontró que la clozapina contiene un grupo amino protonado en condiciones

biológicas dando una carga total de +1 a la molécula, el cual se utilizó para todos los pasos siguientes. En cuanto a la inversión de los grupos heterocíclicos, el anillo B de la benzodiazepina no es plano y experimenta una inversión de nitrógeno tipo mariposa (figura 23); la barrera energética de inversión calculada es mayor de ~ 6 kcal/mol por lo que se eligió trabajar con la conformación dada por la parametrización del programa Maestro. Además de esta inversión, está la del anillo D o piperazina, la cual puede tener al grupo metilo en posición ecuatorial o axial. Se decidió simular ambos estados (Figura 23).

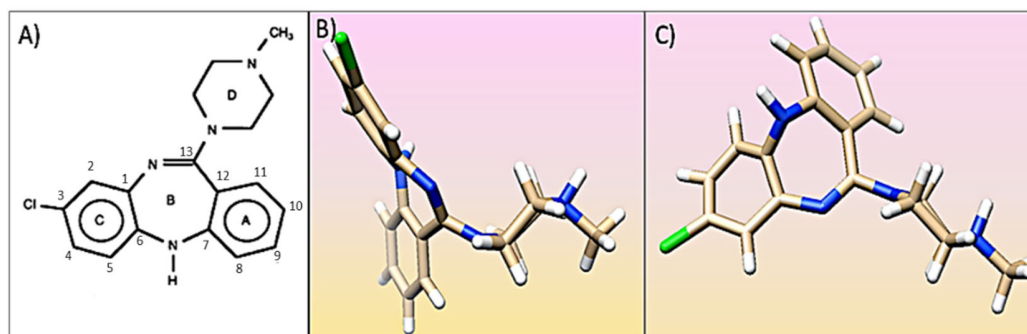


Figura 23. Estructura de la Clozapina. A) Estructura de la clozapina. Los números y letras corresponden a la nomenclatura acordada por IUPAC para numerar los carbonos y anillos en la molécula. El anillo D corresponde al anillo de la piperazina, los anillos C y A son bencenos unidos a B, un anillo heptacíclico denominado diazepina. B) y C) muestran las conformaciones tridimensionales de la clozapina usadas en este trabajo. B) representa la estructura de la clozapina con la piperazina en posición axial. C) es la conformación de la clozapina con la piperazina en posición ecuatorial.

4.4. Determinación de modo de unión del ligante

Se determinaron los modos de unión de la clozapina en el sitio ortostérico para ambos receptores, así como la energía libre de Gibbs correspondiente con el programa *Autodock4.2* (error ~ 2.4 Kcal/mol) (Morris et al., 2009). A continuación se detalla el protocolo de acoplamiento molecular utilizado para todos los modos de unión. La proteína reconstruida en *I-Tasser* Se modeló con el programa *Autodock4* con y se agregaron cargas parciales Marsilli-Gasteiger (Gasteiger & Marsili, 1980), se eliminaron los hidrógenos no polares y se agregaron los tipos atómicos. Se introdujo el ligante previamente preparado y se le asignaron los tipos atómicos. Posteriormente se estableció el espacio de búsqueda para la proteína H1 de modo tal, que este rodease completamente los residuos reconocidos como parte del sitio activo en el PDB id: 3RZE (Shimamura et al., 2011); para ello se seleccionó un espacio cúbico centrado en (47.080, 55.531, 60.107) con un espaciado de 0.375 Å y 42 puntos en los ejes X y Y, así como de 36 en el eje A. Para el caso de la proteína D2, se escogió un espacio de búsqueda cúbico que rodease los residuos que conforman el sitio

activo según Thomas, Fang, Yuriev, & Chalmers, 2015 quienes simularon previamente a la clozapina en este receptor; para ello se especificó el centro del cubo en (53.605, 67.200, 48.354) con un espaciado de malla de 0.375 Å y 40 puntos de malla en los tres ejes.

Se pre-calcularon los parámetros del campo de fuerza semi-empírico AutoDock4.2 (Huey et al., 2007) con la rutina *AUTOGRID*. Este cálculo consiste en colocar un átomo de prueba en cada punto de la malla, calcular y asignar la energía de interacción de este átomo con los átomos circundantes. El algoritmo de búsqueda para predecir las poses en la macromolécula fue el algoritmo genético de Lamarckiano (Morris et al., 1639). El número de individuos de población fue de 150, con 27000 generaciones y un número máximo de 25, 000,000 de evaluaciones, mientras que la semilla se dejó en aleatorio.

4.5. Ensamble de los receptores en bicapa lipídica y solvente

La construcción de la bicapa lipídica incluyó los tres componentes principales de la membrana lipídica de una neurona de rata (Tabla 1). La parte intermembranal del receptor fue embebida en una bicapa lipídica con un área determinada de manera que el receptor, que fue posicionado en el centro, tenga un espaciado de 15 Å de cada lado en las direcciones XY. La adición de los lípidos a la proteína se hizo con la herramienta web CHARM-GUI (<http://www.charmm-gui.org>) por medio del método de reemplazo. En este método la proteína es primero empaquetada por esferas de tamaño similar a un lípido, cuyas posiciones se usan posteriormente para colocar moléculas de lípido seleccionadas al azar entre los tipos elegidos previamente.

Además, se solató el complejo con agua y 0.15 M de cloruro de sodio, así como la adición de contra-iones necesarios para neutralizar las cargas del sistema, incluyendo las de las proteínas. El tamaño de la caja fue de 116 Å³ aproximadamente para todos los sistemas, (Figura 24).

Tabla 1. Composición porcentual de lípidos en las células neuronales de la raíz del ganglio dorsal. (Datos obtenido de: Calderón R, et. al. 1995)

Tipo de fosfolípido	% lipídico
Fosfatidilcolina (POPC)	29%
Fosfatidiletanolamina (POPE)	16.6%
Colesterol	15.4%
Otros	39%

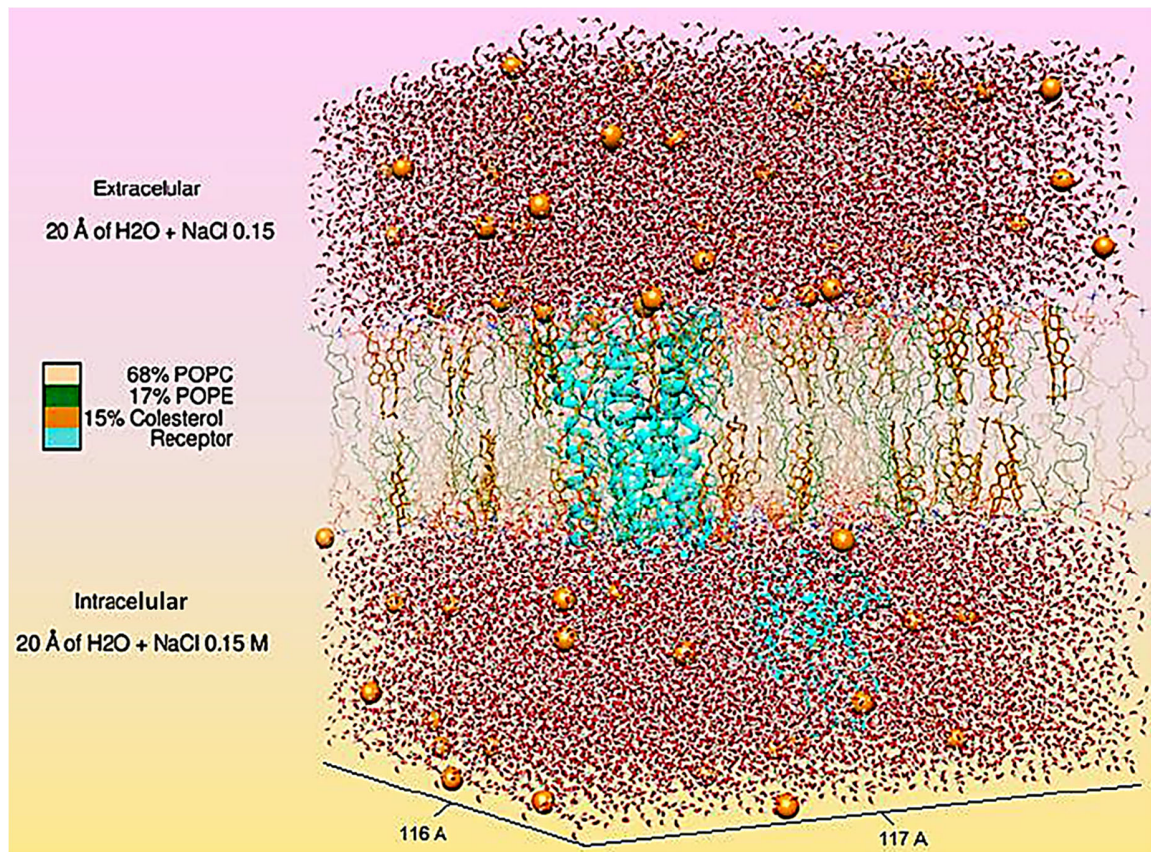


Figura 24. Sistema construido para los sistemas biomoleculares simulados. Las proteínas con/sin ligante fueron embebidas en una bicapa lipídica compuesta por 68% 1-palmitoil-2-oleoil-sn-fosfatidilcolina (POPC), 17 % 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (POPE), 15% colesterol. La cual fue solvatada con una capa de 20 Å de agua con 0.15 M de cloruro de sodio (NaCl).

4.6. Minimización, equilibrado y producción

Una vez contruidos los sistemas se hizo a la minimización de energía que consistió de 1500 pasos por el método de *steepest-descent*, seguido de 27,000 pasos por método del gradiente conjugado. Con la finalidad de ajustar el sistema a condiciones realistas de temperatura y presión se llevó a cabo la fase de calentamiento en ensamble NVT con el termostato de Langevin, un paso de integración de 1 fs y restricciones en los fósforos de lípidos y carbonos α de proteínas. Después, se siguió con la fase de equilibrado en ensamble NPT, la presión se controló con el baróstato de Berendsen, las restricciones se disminuyeron progresivamente hasta que el sistema quedo completamente libre y se equilibró por 50 ns adicionales, los detalles de estas dos fases se pueden ver en la tabla 2. Para optimizar el tiempo de simulación y garantizar una conformación estructural ideal, se constriñó la frecuencia de vibración de los enlaces que implican a los átomos de hidrógeno por medio del algoritmo SHAKE.

Tabla 2. Procedimiento de calentamiento y equilibrado utilizado en los sistemas de los complejos a simular.

Ensamble		NVT			
Paso	Número de Pasos	Temperatura (K)	Restricción proteínas (Kcal/mol/A)	Restricción lípidos (Kcal/mol/A)	
1	250,000	0 a 50	10	2.5	
2	250,000	50 a 100	10	2.5	
3	500,000	100 a 200	10	2.5	
4	300,000	Lineal 200 a 303.15	10	2.5	
Ensamble		NPT			
Paso	Número de Pasos	Restricción proteínas (Kcal/mol/A)	Restricción lípidos (Kcal/mol/A)		
5	250,000	8	2.5		
6	250,000	5	1.5		
7	250,000	3	1		
8	250,000	1	0.5		
9	250,000	0.5	0.1		
10	250,000	0.1	0		
11	25,000,000	0	0		

Para validar la fase de equilibrado y pasar a la fase de producción se graficaron la energía potencial y el RMSD en función del tiempo. El RMSD, así como el RMSD que viene dado por la ecuación:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_1^N (r_i - r_f)^2}{N}} \quad (31)$$

En donde r_i y r_f son las coordenadas de un átomo al principio del paso de integración y r_f las coordenadas después del paso y N el número total de átomos. Los átomos que se seleccionaron para medir el *RMSD* fueron los carbonos alfa de la cadena principal de la proteína, además se calculó el *RMSD* para la parte intermembranal.

También se calculó el *RMSD* promedio a lo largo del tiempo para cada conjunto de residuos, es decir el RMSF, el cual refleja la flexibilidad local de las proteínas.

La energía potencial para cada estrato de la simulación disponible en el archivo “.mdout” fue extraída para graficar con la herramienta “*process_mdout.perl*” de Amber. El resto de los cálculos se hicieron con la herramienta CPPTRAJ de la paquetería Amber, con los comandos “*RMS*” para el *RMSD* y “*atomicfluct*” para el RMSF.

4.7 Análisis de la dinámica

El análisis comprendió la descripción del comportamiento de las membranas, mediante la determinación del grosor de la membrana y el área por lípido a lo largo de la simulación. Estos valores se obtuvieron con la herramienta MEMBPLUGIN 1.1 para VMD (Guixa-Gonzales R., 2014), porque estas medidas en la membrana pueden ser comparadas con datos experimentales

El grosor de membrana corresponde a la distancia promedio entre los átomos de fosforo en los lípidos de la bicapa. El área por lípido se calcula al medir las dimensiones de la caja de simulación en los ejes X y Y paralelos a la membrana lipídica, se multiplican entre si y el resultado se divide entre el número de lípidos, *N*:

$$\text{Área por lípido} = \frac{XY}{N} \quad (32)$$

Para el análisis de la proteína se hizo un agrupamiento de las conformaciones de cada trayectoria según la distancia entre los carbonos delta del GLU3.50 y el carbono zeta de la ARG6.30 *versus* el *RMSD* de todos los átomos que conforman el motivo NPxxY, figura 25. Así mismo, se hizo otra gráfica donde la abscisa fue el *RMSD* de todos los átomos en el motivo NPxxY y la ordenada fue la energía de interacción no enlazante (VDW y electrostáticas) entre oxígenos-nitrógenos y oxígenos-hidrógenos de los grupos amino, la energía de interacción se hizo con el comando *pairwise* de la herramienta CPPTRAJ de Amber (Case et al., 2005).

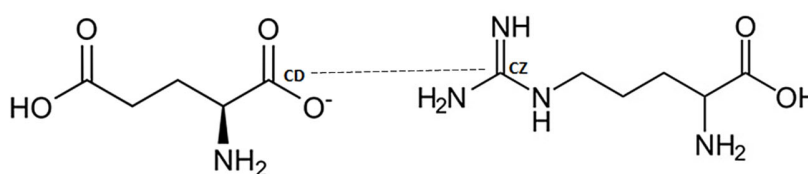


Figura 25. Distancia medida entre el ácido glutámico y la arginina, esta distancia fue la que se utilizó como descriptor molecular del candado iónico GLU6.30-ARG3.50. A la izquierda la posición del carbono delta del glutamato y a la

derecha el carbono zeta de la arginina. Para todas las simulaciones se midió la distancia entre estos carbonos con el fin de caracterizar una posible formación de puente salino, en el que distancias menores a 4.2 Å dan cuenta de una formación de dicha interacción.

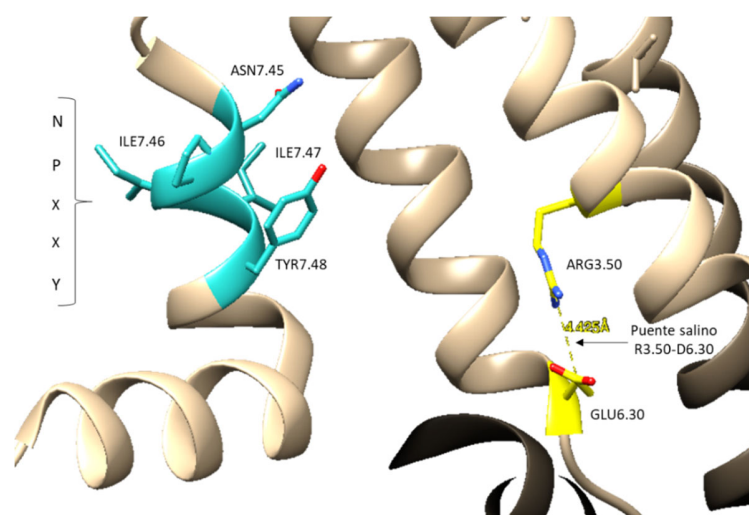


Figura 26. Motivos conservados en la clase A de las GPCRs cuyas posiciones son determinantes para la caracterización del estado activo/inactivo. La formación de un puente salino entre la ARG3.50 y GLU6.30 es característica de un estado inactivo, mientras que el motivo NPxxY presenta el mayor movimiento en la transición de estados.

Para el cálculo del *RMSD* del motivo NPxxY, se eligieron como referencia a las conformaciones, en el tiempo 0 de la fase de producción para cada receptor y se tomaron en cuenta todos los átomos de este motivo.

Para poder determinar las zonas de estado, es decir identificar en las gráficas que conformaciones están en fase activa o inactiva, se utilizaron cinco controles; dos inactivos que corresponden a los modelos estructurales base de las simulaciones, los PDB 6CM4 y 3RZE y 3 controles activos; Uno es el receptor Beta 2 adrenérgico (β 2AR), PDB Id: 4LDO, este receptor fue cristalizado con su ligante endógeno, la adrenalina (Ring et al., 2013). El porcentaje de identidad y similitud es de 44% y 49% respectivamente con el receptor H1 y 46% de identidad y 51% de similitud con el receptor D2. Otro control fue el receptor de rodopsina, PDB Id: 4A4M, el cual representa a la clase A de las GPCRs, el cual fue activado con luz y estabilizado en el C-terminal de la subunidad α de la proteína G. El porcentaje de identidad y similitud es de 16% y 33% respectivamente y con el receptor H1 21% de identidad y 33% de similitud. El tercer control positivo fue el receptor de serotonina 5-HT_{2C}, PDB Id: 6BQG, con el que se mantiene un porcentaje de identidad de 30% y 52% de similitud con el receptor H1 y 33% y 55% de identidad y similitud con el receptor D2

respectivamente. Se obtuvo la estructura en fase activa de este receptor ligado a la ergotamina, un agonista fuerte para este receptor. La mayoría de los antipsicóticos atípicos se unen a este receptor serotoninérgico.

4.8 Cálculos de energía libre con métodos de electrostática en continuo

Con la finalidad de obtener una diferencia de energía libre de afinidad relativa promedio entre los receptores y la clozapina a lo largo de la simulación, se recurrió a los métodos de electrostática en continuo con los modelos de Poisson-Boltzman (MM/PBSA) y Born-generalizado (MM/GBSA). Se utilizó la herramienta MMPBSA.py de AmberTools18 para calcular las energías de afinidad relativas por los métodos de MM/PBSA y MM/GBSA para los complejos H1/CLO, D2R-E y D2R-A. Para el cálculo se seleccionaron sistemas cada 50 estratos de la trayectoria de simulación. La constante dieléctrica de la membrana fue de 2.2 (Huang & Levitt, 1977), el grosor de membrana fue de 43 Å, la constante de la proteína fue de 2, porque el sitio activo de los receptores contiene más de dos grupos funcionales cargados y de acuerdo a Hou, 2011 dicha constante dieléctrica mejora los cálculos para este caso (Hou et al., 2011). La constante dieléctrica del agua fue de 80 (default), la concentración de sal de 0.15 M y el radio de prueba para el cálculo de la superficie accesible al solvente de 0.6 (Hou et al., 2011).

4.9 Cálculos de energía libre para los derivados de la clozapina

Además, los métodos de solvatación en continuo son útiles para identificar los residuos de interacción más significativos y poder acotar el número de mutantes de la clozapina probados a cinco. Una vez que se identificaron las zonas de interacción clave en la clozapina se procedió a probar cinco candidatos con ADT4. Para ello se utilizó el mismo método descrito en la determinación de la pose del ligante y se trabajó con la estructura proteica construida con I-TASSER. La parametrización de las mutantes se hizo con la herramienta en línea *SwissParam* (<http://www.swissparam.ch/>).

Al terminar la fase de producción de las dinámicas se escogió el estado más representativo basado en un histograma de frecuencias de las energías potenciales de las tres réplicas de simulación. Para construir las columnas se determinó la frecuencia en intervalos de energía de 20 Kcal/mol, después se calculó la moda para los valores de la columna más frecuente. Dicho estado se utilizó para proceder al método de FEP, y

calcular el cambio en energía libre de Gibbs de la sustitución de los grupos funcionales del fármaco. Se decidió comenzar los cálculos en FEP al sustituir el átomo del halógeno cloro por flúor, bromo e iodo y se determinó el cambio en la energía libre para su interacción con el receptor H1.

Para todos los sistemas se aplicó un potencial de núcleo suavizado para las interacciones de VdW y electrostáticas con el propósito de facilitar la convergencia de las simulaciones de FEP. Para el caso de las interacciones de VdW, $\lambda_{vdW} = 0.6$, lo que significa que las interacciones de VDM para partículas salientes y entrantes se reducirían respectivamente, comenzando de $\lambda = 1.0$ hasta $\lambda_{vdW} = 0.4$ y viceversa. Las interacciones electrostáticas para partículas salientes y entrantes se redujeron, respectivamente, de 0.0 a $1.0 - \lambda_{elec} = 0.5$ (figura 27). Para cada mutante se ajustaron los parámetros de minimizado, equilibrado y valor de λ específicos con el fin de obtener la convergencia en las dinámicas en ambos sentidos de FEP. Los valores específicos para cada mutante se describen en la tabla 3.

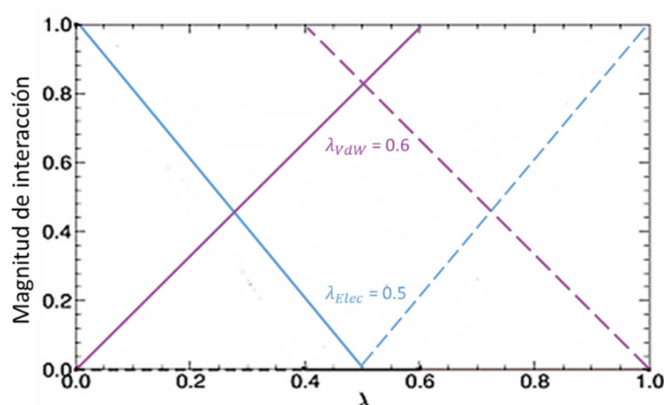


Figura 27. Esquema general del desacoplamiento de interacciones electrostáticas y de VdW dentro de la implementación de NAMD. Las líneas continuas representan átomos salientes y las líneas discontinuas representan átomos entrantes. Dos variables definen cómo el sistema perturbado se acopla o desacopla de su entorno, a saber. λ_{elec} (alchElecLambdaStart) y λ_{vdW} (alchVdWLambdaEnd). En el escenario actual, $\lambda_{vdW} = 0.6$, lo que significa que las interacciones de VDM para partículas salientes y entrantes se reducirán, respectivamente, comenzando de $\lambda = 1.0 - \lambda_{vdW} = 0.4$ a $\lambda = 1.0$, y ampliado a partir de $\lambda = 0.0$ a $\lambda = \lambda_{vdW}$. Si $\lambda_{elec} = 0.5$, Las interacciones electrostáticas para partículas salientes y entrantes se reducen, respectivamente, de 0.0 a $1.0 - \lambda_{elec} = 0.5$, y se amplió de λ_{elec} a 1.0.

Tabla 3. Protocolo ajustado para asegurar la convergencia de las simulaciones de FEP para cada candidato derivado de la clozapina. El método de minimización que se eligió fue el de gradiente conjugado y en la tabla se especifica el número de pasos. El equilibrado se llevó a cabo con un paso de integración de 0.001 ns sin ninguna restricción, el mismo paso de integración se usó para la fase de producción. La leyenda “*Descartado*” significa que debido a los resultados no deseados con los resultados de FEP para el Sistema H1, se descartaron los cálculos para el sistema D2.

Sistema H1-CLZ				
Original/Mutación	Minimización	Equilibrado	Producción	λ
Cl/F	10,000	100	400	0.0625
Cl/Br	10,000	100	400	0.0625
Cl/I	25,000	200	400	0.0625
H8/C8	10,000	100	400	0.03125
H8/C8 y Cl/F	10,000	200	600	0.03125
H8/C8 y Cl/I	25,000	100	400	0.0625
H8/C8 y Cl/Br	25,000	100	400	0.03125
H9/C9	10,000	100	400	0.03125
H10/C10	25,000	200	600	0.0625
H10/Cl	35,000	200	600	0.0315
Sistema D2R-E				
Original/Mutación	Minimización	Equilibrado	Producción	λ
Cl/F	10,000	100	400	0.0625
Cl/Br	10,000	100	400	0.0625
Cl/I	25,000	200	400	0.0625
H8/C8	10,000	200	400	0.03125
H8/C8 y Cl/F	15,000	400	600	0.03125
H8/C8 y Cl/I	25,000	300	400	0.0625
H8/C8 y Cl/Br	25,000	100	400	0.03125
H9/C9	Descartado	Descartado	Descartado	Descartado
H10/C10	Descartado	Descartado	Descartado	Descartado
H10/Cl	Descartado	Descartado	Descartado	Descartado

Capítulo 5. Resultados

Para los complejos clozapina con el metilo ecuatorial y axial para el receptor D2, la clozapina en estado ecuatorial para el receptor H1 y los receptores sin ligante se produjeron 3 réplicas de simulaciones de 30 ns con un paso de integración de 0.002 ps de, lo que produjo 450 ns totales de simulación (Tabla 4).

Tabla 4. Número y tiempo de simulaciones efectuadas para poder analizar la interacción entre la clozapina y los receptores D2 y H1.

Sistema	Tiempo por réplica (ns)	No. de replicas	Tiempo total (ns)
D2R-E	30	3	90
D2R-A	30	3	90
D2R	30	3	90
H1-CLO	30	3	90
H1R	30	3	90
Tiempo en total			450

De los 10 candidatos resultantes del ensamblaje molecular se seleccionó el de menor energía. El resultado de energía libre para el estado ecuatorial en el receptor D2 es de -9.93 kcal/mol, mientras que para el estado axial fue del 9.27 Kcal/mol. Para el caso del receptor H1, el estado ecuatorial dio un resultado de -9.34 kcal/mol y para el estado axial -7.49 kcal/mol. Debido a la baja afinidad del estado axial por el receptor H1, en comparación con el estado ecuatorial se optó por excluirlo de los cálculos de dinámica molecular y se procedió a preparar los sistemas en complejo con los estados axial y ecuatorial para el receptor D2 y solo el ecuatorial para el H1.

5.1 Validación de la fase de equilibrado y producción

Con la finalidad de verificar que el sistema alcanzó el equilibrio se utilizaron cuatro parámetros: La energía potencial, RMSD (por sus siglas en inglés, *Root Mean Square Deviation*) (ecuación 31), grosor de la membrana y área por lípido en los 30 ns de producción. Para el caso de la energía potencial y el RMSD, se consideró el sistema equilibrado cuando la pendiente de la recta proyectada sobre la producción tendía a valores cercanos a cero, ya que esto significa que el sistema tiene fluctuaciones bajas en el movimiento de sus átomos.

Para disminuir la fluctuación de los valores en la energía potencial se utilizó la función del filtro de media móvil simple. Un gráfico de la media móvil simple (*Moving Average*) muestra la media aritmética de los n datos anteriores en n . En las gráficas de la energía potencial de todos los sistemas se recurrió a esta función de suavizado, y se midió la pendiente de la fase de simulación (Figuras 28 y 31). Para el caso de la energía potencial en el receptor D2 sin ligante la pendiente fue de 2×10^{-4} , para el complejo D2R-E de 3.5×10^{-3} y para el complejo D2R-A 2.6×10^{-3} . Estos resultados sugieren una estabilización de los tres sistemas (Figura 28.)

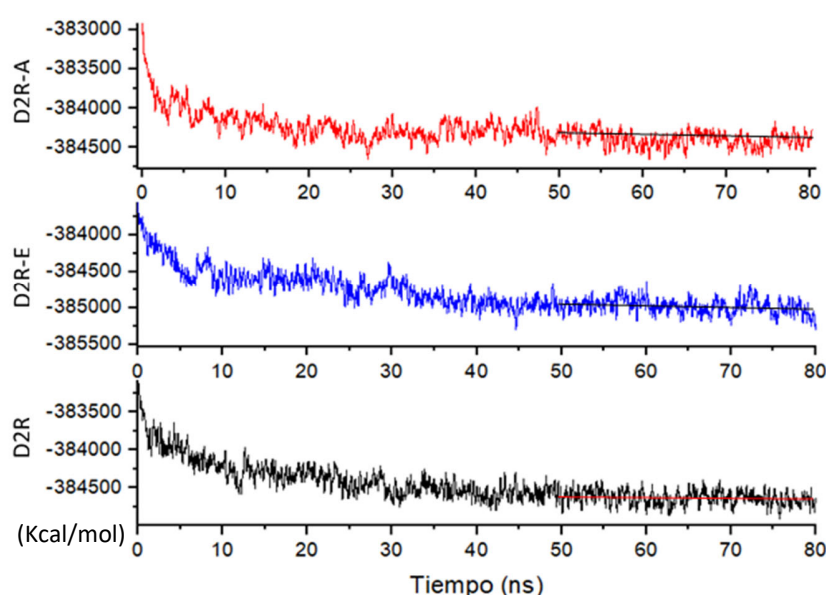


Figura 28. Energías potenciales en Kcal/mol de la fase de equilibrado y producción de los sistemas integrados con el receptor D2. Estas dos fases se produjeron en ensamble NPT con un paso de integración de 2 fs utilizando el campo de fuerza CHARMM36m.

Los resultados del RMSD para la fase de producción de los sistemas con el receptor D2 se muestran en la Figura 29. Los complejos D2R-E y D2R-A presentaron un comportamiento más estable en comparación con el receptor sin ligante, esto se puede ver en la menor fluctuación que presentan la línea roja y azul, que corresponde a los sistemas D2R-E y D2R-A, en la Figura 29 con respecto a la línea negra del sistema D2R. En los ajustes lineales se mostraron pendientes de 3.5×10^{-2} para el sistema D2R-E de 1.9×10^{-2} para el sistema D2R-A y de 3.05×10^{-2} para el D2R. Aunque las pendientes son ~ 10 veces mayor en comparación con la energía potencial, debe tomarse en cuenta que el RMSD se calculó solo para 416 átomos (carbonos α de los 416 residuos de la proteína), mientras que la energía potencial tomó en cuenta los $\sim 166,000$ átomos, esto hace que los resultados parezcan una discrepancia sin necesariamente serlo, el resultado

total incluye la fracción correspondiente a los carbonos alfa de la proteína que conforman el sistema completo. Las proteínas son sistemas altamente dinámicos, mientras que la energía potencial depende del número de átomos totales. Esto da indicio de que se alcanzó un estado conformacional estable para los sistemas D2 con la clozapina, a continuación las gráficas del RMSD para los sistemas con D2.

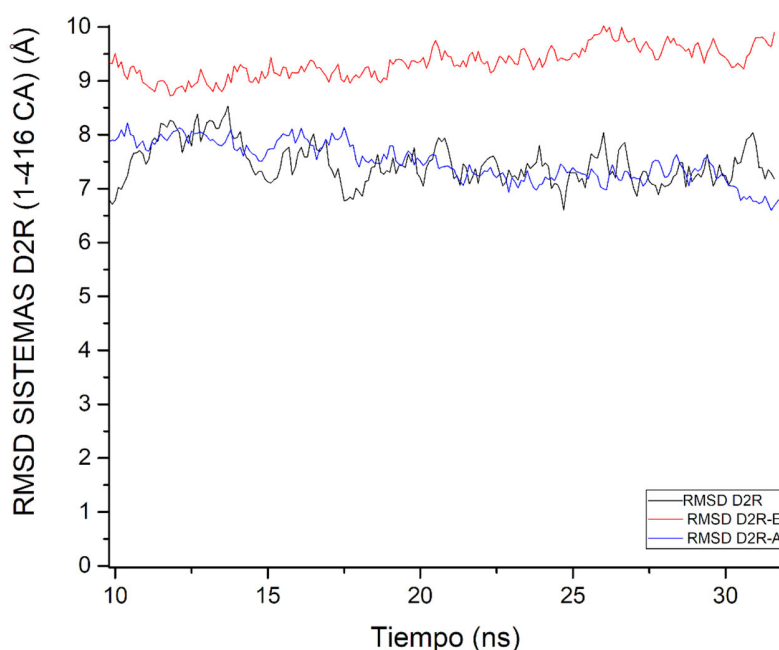


Figura 29. RMSD de los carbonos alfa de la cadena única del receptor D2 integrado sin ligante (D2R), y con la clozapina con la piperazina en estado ecuatorial (D2R-E) y axial (D2R-A). Las unidades del RMSD son Å.

La flexibilidad de los residuos del receptor D2 en todos los sistemas se estudió por medio del RMSF. El RMSF (por sus siglas en inglés, *Root Mean Square Fluctuation*) mide el desplazamiento promedio de átomos específicos en referencia a una estructura determinada del tiempo total de simulación, por lo que, a diferencia del RMSD, en el eje x se grafica el número de residuo en vez del tiempo. En este caso se midió el RMSF de los carbonos α de ambos receptores y la referencia fue el tiempo 0 de la simulación. En la figura siguiente se observa que la unión de ligante disminuye el RMSD promedio en comparación con el receptor solo. Esto se hace evidente en los bucles entre el TM2-3, TM4-5 y TM6-7, donde el RMSD promedio es casi 2 Å mayor que el D2R-E y D2R-A. Entre los sistemas D2R-E y D2R-A el RMSF tiene el mismo comportamiento en las regiones intermembranales; sin embargo, en la región intracelular se presentan comportamientos distintos. Hay un incremento pronunciado entre los residuos 180 al 220 de todos los sistemas D2R. En la región que va del residuo 220 al 250 hay un incremento de hasta 12.5 Å para

el D2R, de 6.4 Å para el D2R-A y de 5.2 Å para el D2R-E. Entre la región del 250 al 280 el RMSF disminuye hasta 1 Å para el D2R, 4 Å para el D2R-E y 1.2 Å para el D2R-A. Entre los residuos 280 al 330 hay un aumento de 9 Å para el sistema D2R, de 7 Å para el D2R-A, y de 5 Å para el D2R-E (Figura 30).

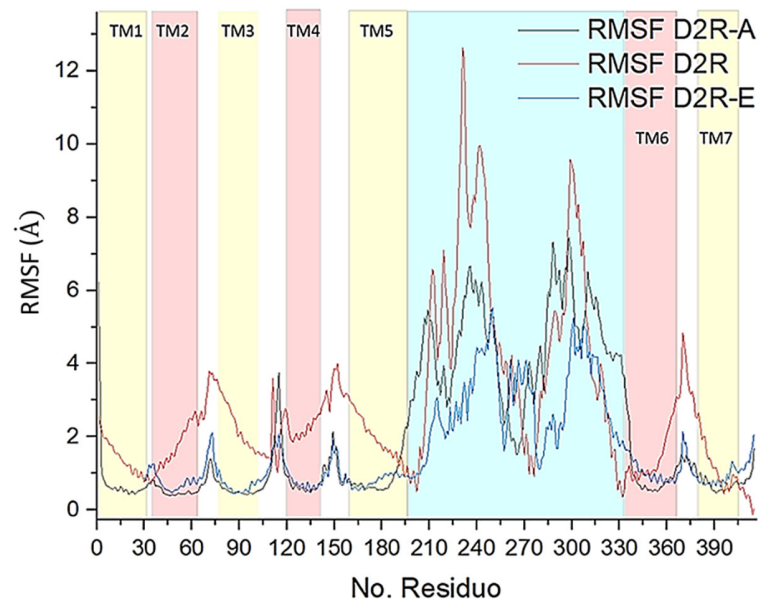


Figura 30. RMSF de los sistemas con el receptor D2 integrado. En la gráfica se observa en rojo el RMSF del receptor sin ligante, en azul el RMSF del D2R-E y en negro el RMSF del complejo D2R-A. Sombreados en amarillo y rojo se resaltan las hélices intermembranales del receptor, en azul la región intracelular y los residuos sin sombreado corresponden a los bucles de unión entre las hélices.

A continuación se presentan los resultados de la energía potencial para los sistemas H1 con la función de suavizado y las pendientes evaluadas de igual forma que para los sistemas D2. Estas fueron de 1.3×10^{-4} para el receptor H1 y de 1.63×10^{-3} para el sistema del receptor H1 con la clozapina, Figura 31.

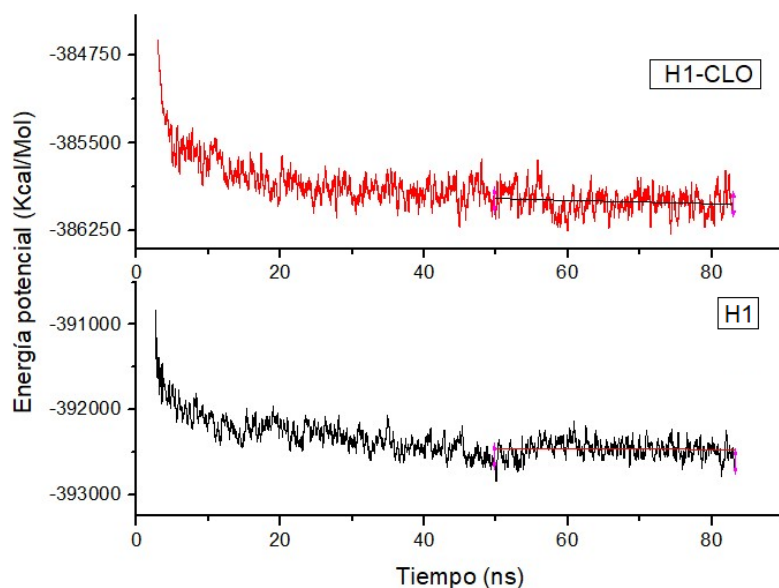


Figura 31. Complejo H1R: Energías potenciales de la fase de equilibrado y producción de los sistemas integrados con el receptor H1. Estas dos fases se produjeron en ensamble NPT con un paso de integración de 2 fs utilizando el campo de fuerza CHARMM36m.

La pendiente de la fase de producción del RMSD de la proteína para el sistema H1R tiene una pendiente de 7.6×10^{-2} y para el sistema H1-CLZ de -1×10^{-3} . El RMSD del receptor H1 indica una posible transición de estado conformacional, a ello se debe que la pendiente sea mayor que el sistema H1-CLO y el de los sistemas D2R. No obstante el cambio en el RMSD es de $\sim 1 \text{ \AA}$ y la pendiente de la energía potencial es muy parecida al resto de los sistemas, por lo que al considerar que este tipo de proteínas son altamente flexibles se puede considerar que se ha alcanzado el equilibrio, véase el capítulo 6.1 de la discusión para mayor detalle en esta parte del receptor H1. Estos valores en conjunto con las pendientes de la energía potencial prueban que se ha alcanzado el equilibrio (Figura 32).

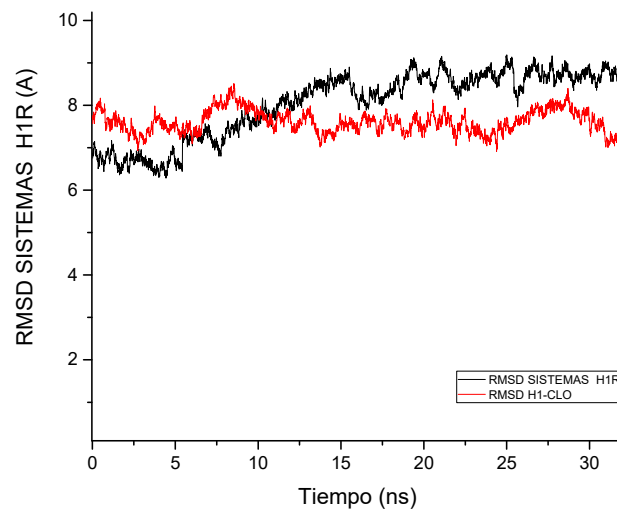


Figura 32. RMSD de las primeras trayectorias de simulación de los sistemas del receptor H1 (H1R) en azul y H1 con la clozapina (H1-CLO) en rojo.

El RMSF de ambos sistemas para el receptor H1 muestra un comportamiento similar al de los sistemas D2, donde las regiones más flexibles son las asas que unen a las hélices alfa y la región intracelular. Para ambos sistemas existen diferencias en esta última región, sobre todo en las regiones de los residuos del 275 al 300, y de los residuos del 360 al 450, para el caso del H1R hay un incremento de 15 Å que no está en el sistema H1-CLO (Figura 33).

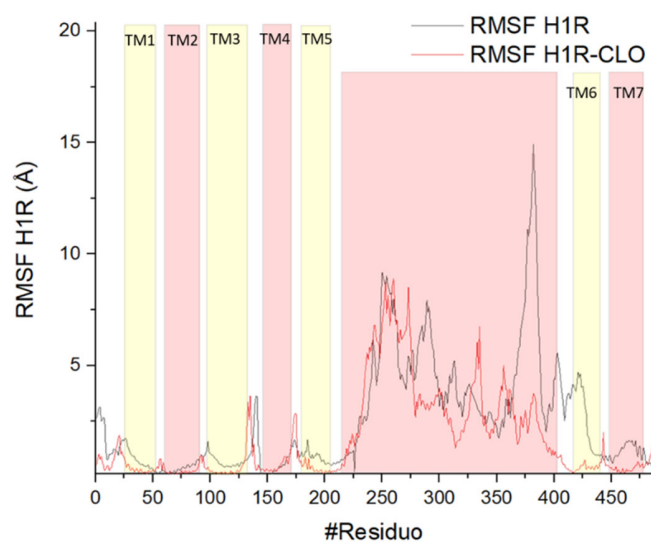


Figura 33. RMSF de los sistemas con el receptor H1 integrado. En la gráfica se observa en rojo el RMSF del receptor ligado a la clozapina y en negro el receptor sin ligante. Sombreados en amarillo y rojo se resaltan las hélices intermembranales del receptor, la zona que va de los residuos 225 a 400 residuos corresponde a la zona intracelular del receptor y los residuos sin sombreado corresponden a los bucles de unión entre las hélices.

5.2 Caracterización de la bicapa lipídica

El área por lípido (APL) y el grosor de la membrana fueron determinados para todos los sistemas. Los valores calculados se compararon contra los valores experimentales y/o otras bicapas simuladas (bicapas modelo de de POPC y POPE). En la tabla 5, se resumen los valores promedio obtenidos de grosor y área por lípido obtenido para la bicapa lipídica de cada sistema, el área por lípido se presenta de manera desglosada para cada componente por separado.

Tabla 5. Valores del grosor de la membrana lipídica promedio de la fase de producción (≈ 90 ns). Membrana compuesta de 68% fosfatidilcolina (POPC), 17%Fosfatidiletanolamina (POPE) y 15% Colesterol. También se muestran las áreas por lípido promedio para todos los lípidos, y por cada tipo de lípido por separado

Complejo	Grosor de membrana (Å)	APL total (Å ²)	APL POPC (Å ²)	APL POPE (Å ²)	APL Colesterol (Å ²)
D2	43.0 $\pm$ 0.3	59.5 $\pm$ 0.4	65.5 $\pm$ 2.6	59.4 $\pm$ 5.2	32.5 $\pm$ 2.5
D2E	43.7 $\pm$ 0.3	58.1 $\pm$ 0.4	63.2 $\pm$ 1.8	62.3 $\pm$ 5.7	30.3 $\pm$ 2.3
D2A	43.6 $\pm$ 0.3	58.3 $\pm$ 0.4	63.8 $\pm$ 2.0	60.9 $\pm$ 5.1	30.3 $\pm$ 2.5
H1	44.0 $\pm$ 0.3	58.8 $\pm$ 0.4	61.4 $\pm$ 2.9	61.4 $\pm$ 2.9	32.4 $\pm$ 2.4
H1CLO	44.1 $\pm$ 0.3	58.8 $\pm$ 0.5	64.9 $\pm$ 4.0	64.9 $\pm$ 4.0	33.8 $\pm$ 2.8

Los resultados para el grosor de membrana van de los 43 Å a los 44 Å para todos los sistemas, los cuales exceden por ~ 5 Å según los datos experimentales para bicapas puras de POPC 64.6 ± 1.0 (Kučerka, Nieh, & Katsaras, 2011). Por otro lado, el área por lípido promedio total tuvo un valor de 58.8 Å^2 para los sistemas H1R y de 58.1 Å^2 a 59.5 Å^2 para los sistemas D2. Estos valores son $\sim 5 \text{ Å}^2$ menores de lo esperado para las bicapas puras de POPC (64.3 Å^2) (Kučerka et al., 2011) y $\sim 2 \text{ Å}^2$ mayores que los datos experimentales para bicapas de POPE (56.6 Å^2) (Kučerka et al., 2008). Estos resultados, en síntesis, muestran que los valores del área por lípido están dentro del margen. Sin embargo, el grosor de membrana para todos los sistemas es mayor de lo esperado. Es necesario analizar cómo están interaccionando los componentes de la membrana entre sí para explicar el engrosamiento, ya que se usó un alto porcentaje de colesterol (15%) en ambas capas.

5.3 Determinación de los estados conformacionales predominantes en los complejos de simulación.

Existen dos movimientos notables en el proceso de activación de las GPCRs, estos son: la formación del puente salino entre la GLU6.30 y la ARG3.50 y el movimiento en los rótameros de la tirosina y prolina, en conjunto con una reestructuración completa del motivo conservado NPxxY. La formación del puente salino se puede caracterizar de dos maneras: por la distancia entre los grupos funcionales implicados en la formación del puente salino, o por la energía no enlazante entre estos dos residuos. Se determinaron dichos movimientos y se hizo un análisis por agrupamiento o *clustering*, 1) basado en la distancia entre los carbonos delta de la GLU6.30 y el carbono zeta de la ARG3.50 y el RMSD del motivo NPxxY; 2) agrupamiento con la energía no enlazante entre los residuos del puente salino y el RMSD del mismo motivo.

Los análisis del agrupamiento para cada sistema presentan la distancia entre el carbono δ de la GLU6.30 y el carbono α ARG3.50 vs RMSD del motivo NPxxY. También se presentan los agrupamientos basados en la energía de interacción entre los oxígenos de la cadena lateral del GLU6.30 y los grupos amino de la ARG3.50 vs RMSD del motivo NPxxY para cada uno de los sistemas. En las figuras se delimitan dos zonas: En rosa la zona de fase inactiva y en amarillo la de fase activa. Las zonas se definieron con base en análisis publicados para diversas GPCRS que en este trabajo se repitieron para los controles cristalográficos (Latorraca et al., 2017; Tikhonova et al., 2013). De esta manera el RMSD límite fue de 3.5 Å, pues fue la diferencia entre los controles en estado activo y los inactivos; la distancia entre la ARG3.5 y la GLU6.30 fue de 12 Å por qué esta es la distancia máxima de separación entre el carbono delta del ácido glutámico y el carbono Z de la arginina cuando las TM6 y TM3 están cercanas entre sí como en los cristales activos; y el límite de la energía de interacción no enlazante fue de -50 Kcal/mol, porque esta corresponde a la formación de dos enlaces de hidrogeno, que son clave en la identificación de los puentes salinos con la herramienta CPPTRAJ, no obstante, el único de los controles que en su modelo contiene al puente salino fue el receptor D2, PDB id: 6cm4, con energía no enlazante de -120 Kcal/mol.

A continuación, se presentan los agrupamientos para el sistema D2R. En estos, se observan valores con una baja fluctuación y están dentro de la zona de inactivación. Aunque la distancia entre los residuos del puente salino fueron > 4.2 Å, la energía de interacción presentó valores entre -50 y -100 Kcal/mol, lo que indica que estos residuos están cercanos entre sí y pueden formar el puente salino en ciertas condiciones. El RMSD del motivo conservado osciló entre los 2 Å. (Figuras 34 y 35).

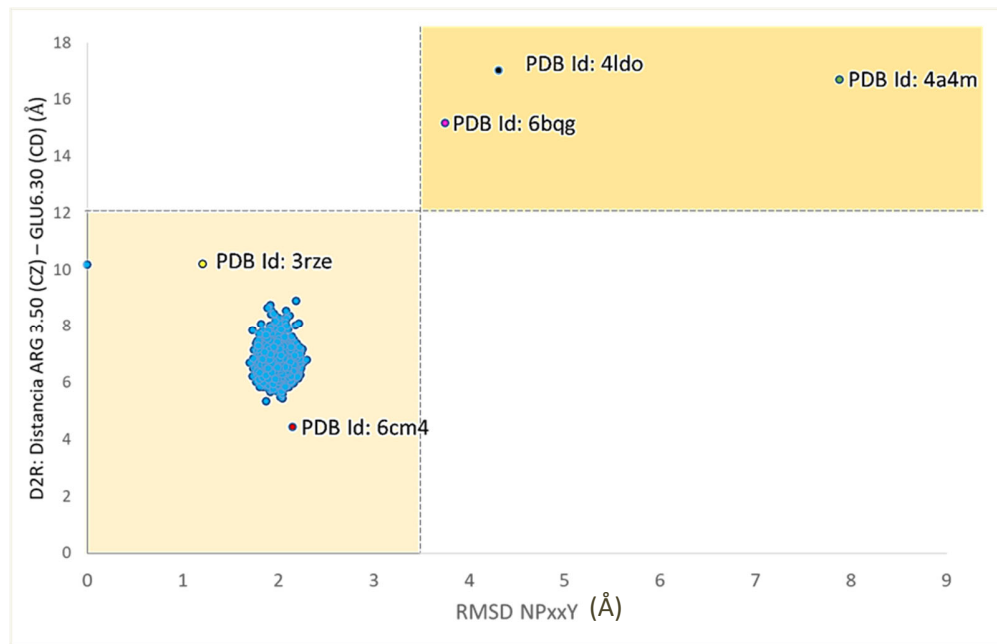


Figura 34. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2 basados en la distancia entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto rojo representa las mismas mediciones para el receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en amarillo se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en morado el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en verde el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo).

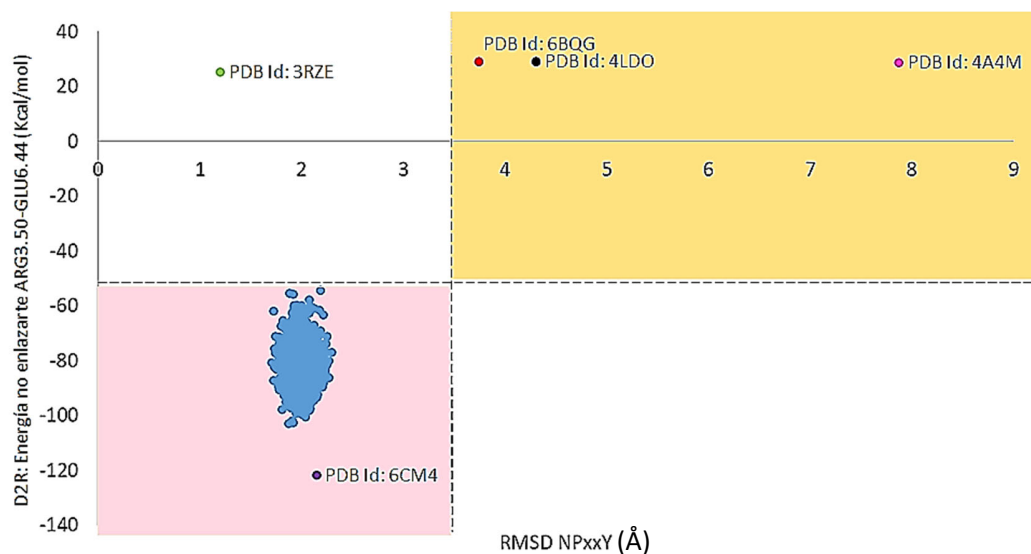


Figura 35. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2 basados en la energía no enlazante (VdW + electrostáticas) entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto morado representa las mismas mediciones para el receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en verde se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en rojo el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en rosa el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo).

La tirosina del motivo NPxxY se orienta hacia la asparagina del mismo motivo a lo largo de toda la simulación del receptor D2, como se puede observar en las gráfica 36 de distancia y la gráfica 37 de energía. Esto es una prueba más de una conformación inactiva predominante.

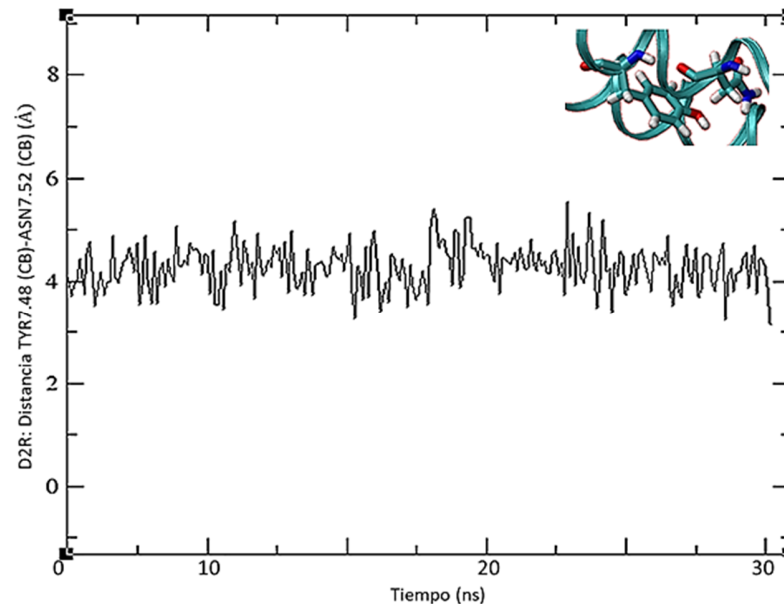


Figura 36. La interacción no enlazante entre la TYR7.48 y la ASN7.52 es indicativo de una conformación inactiva. La tirosina 7.48 se orienta hacia la parte media del TM7 como se puede observar mediante la distancia a la ASN7.52 en la simulación para el receptor D2 sin ligante. Ambos residuos pertenecen al motivo conservado NPxxY.

Como se puede observar en la figura 36 la distancia entre los carbonos B de la TYR7.48 y la ASN 7.52 del receptor D2 se mantiene a una distancia $\sim 4.5 \text{ \AA}$, esta distancia se explica con la gráfica de energía, la cual es de $\sim -50 \text{ Kcal/mol}$ que corresponde a la formación de dos enlaces de hidrogeno, uno entre las cadenas principales y otro entre las cadenas laterales de los residuos mencionados.

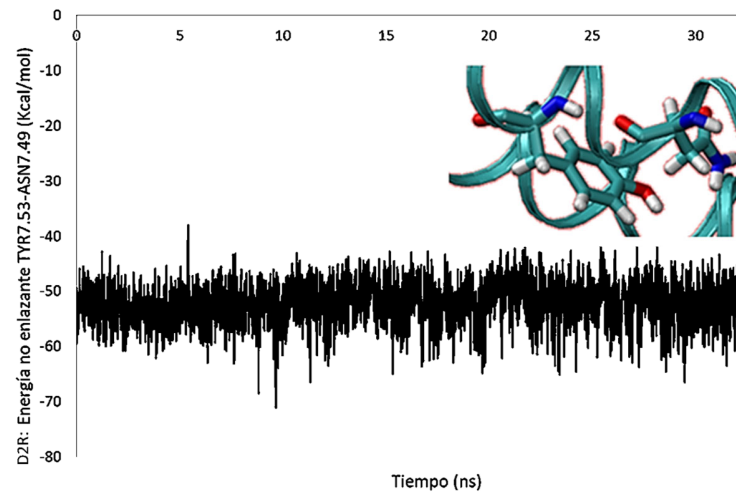


Figura 37. La energía de interacción no enlazante entre la TYR7.48 y la ASN7.52 es indicativo de una conformación inactiva. La tirosina 7.53 está en interacción no enlazante con la ASN7.49 a lo largo de la simulación del sistema D2R. Ambos residuos pertenecen al motivo conservado NPxxY. La energía de interacción es la suma de los enlaces de hidrogeno que se forman entre el oxígeno del grupo funcional de la tirosina y el hidrogeno del carbono beta de la asparagina mas otro enlace de hidrogeno entre los grupos amino y carboxilo de las cadenas principales de ambos residuos.

Para el caso del sistema D2R-A la distancia entre el carbono zeta de la ARG125 y el carbono delta de la GLU340 corresponde a la formación del puente salino característico de la conformación inactiva de las GPCRs en un 52.25 % de la fase de producción, en tanto que el RMSD osciló $\sim 1 - 2$ Å (Figura 38).

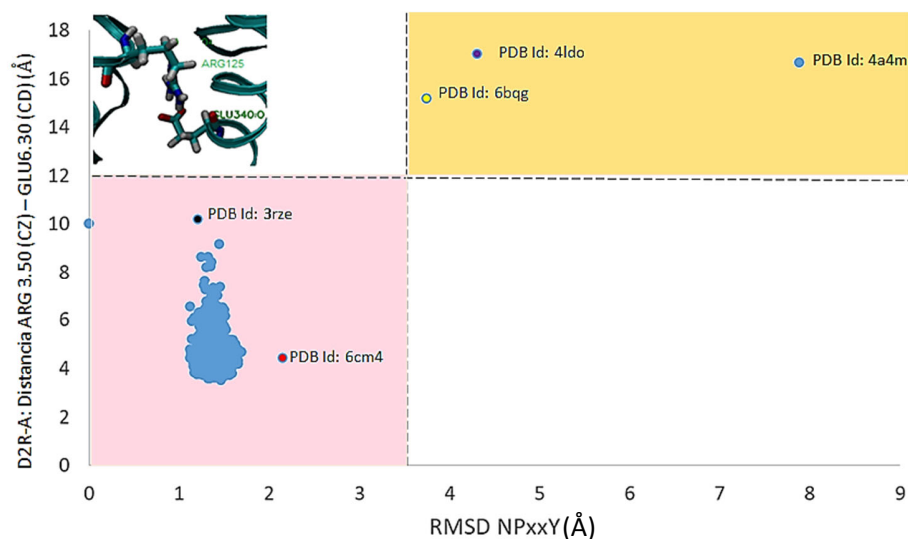


Figura 38. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2R-A basados en la distancia entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto rojo representa al receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en amarillo se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en morado el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en verde el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4lido).

La energía no enlazante del sistema D2R-A tuvo valores más oscilantes ~ -25 -200 Kcal/mol. El 90% del tiempo de la simulación mostró valores < -50 Kcal/mol, por lo tanto, se presentó el estado inactivo con la formación del puente salino (Figura 39).

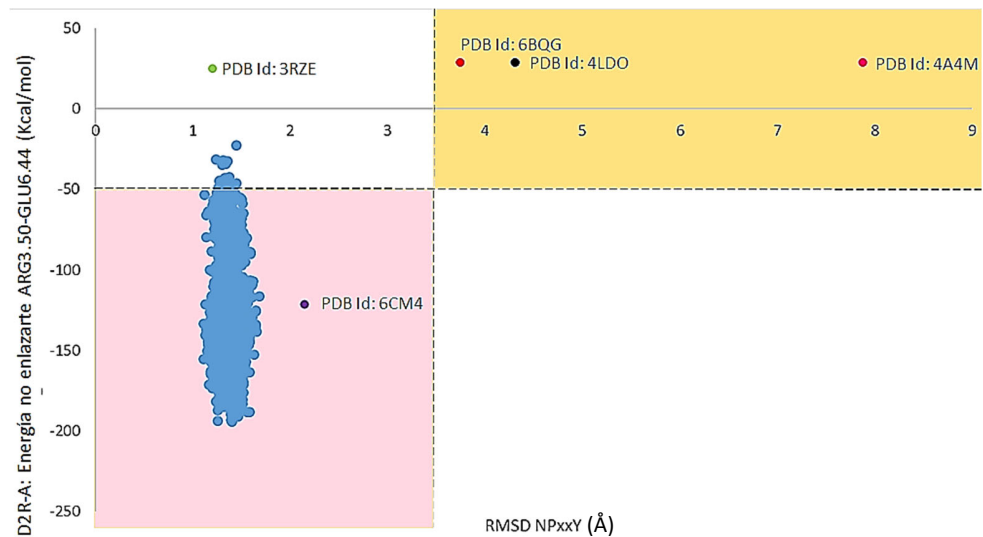


Figura 39. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2R-A basados en la energía no enlazante (VdW + electrostáticas) entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto morado representa al receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en verde se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en rojo el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en rosa el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo).

Para el complejo D2R-E se formó una sola agrupación alrededor del control del PDB id: 6cm4 para ambas agrupaciones de distancia y energía de interacción, esto hace evidente que la conformación de esta simulación es inactiva con la formación del característico puente salino en al menos un 50% del tiempo de la fase de producción (Figura 40 y 41).

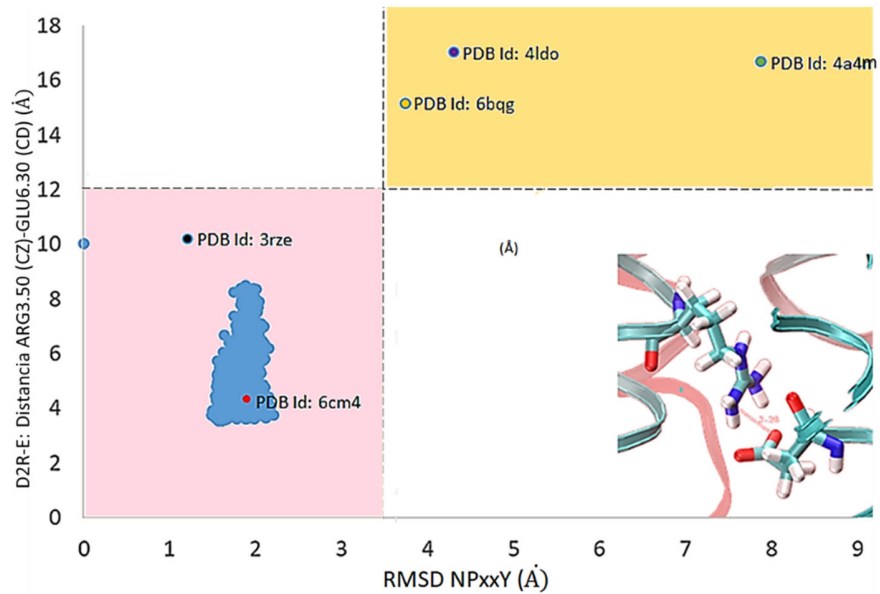


Figura 40. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2R-E basados en la distancia entre la GLU6.30 y la ARG3.50 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto rojo representa las mismas mediciones para el receptor 5-HT2C en fase activa (PDB: 6cbqg), en amarillo se muestra el receptor B2AR (PDB: 4LDO) y en verde el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m).

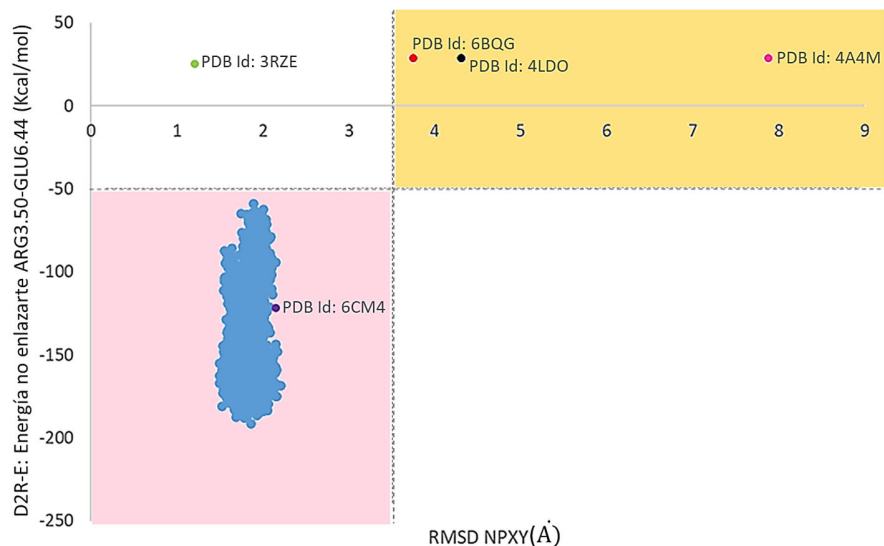


Figura 41. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor D2R-E basados en la energía no enlazante (VdW + electrostáticas) entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto morado representa las mismas mediciones para el receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en verde se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en rojo el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en rosa el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo).

EL RMSD del NPxxY se mantuvo menor a 2.5 Å, esto se explica con la formación de un enlace de hidrogeno, que puede ser caracterizado por distancias < 3.5 Å, entre la TYR7.48 y la ASP2.50, ubicado en el TM2 al tiempo de 7 ns de la fase de producción y representa un 46% del tiempo de simulación (Figura 42).

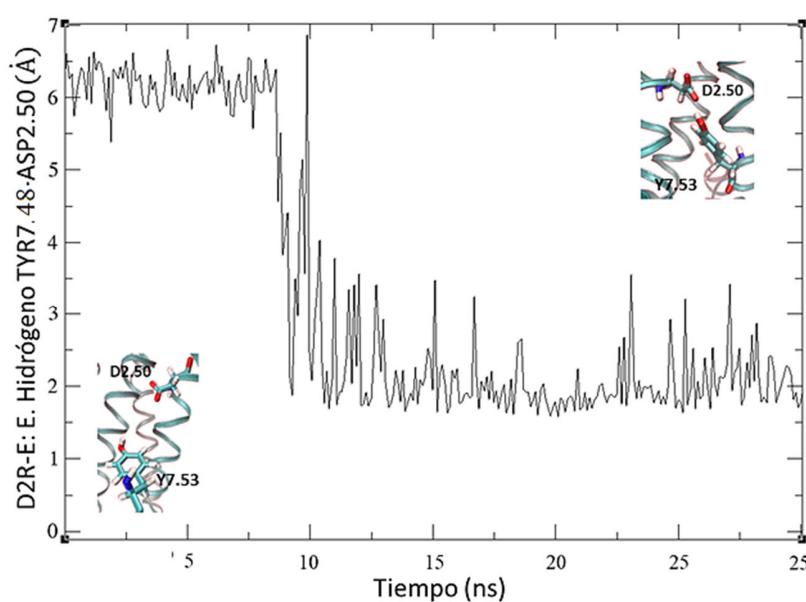


Figura 42. Distancia entre el hidrogeno del hidroxilo de la TYR7.48 y el carboxilo del grupo R de la ASP2.50 en el sistema D2R-E. La distancia inferior a 3.5 Å es indicio de la formación de un puente de hidrogeno entre la TYR7.48 y la ASP2.50 del TM2 en la simulación del complejo D2R-E.

Se calculó la energía de interacción no enlazante entre la TYR7.47 y la ASP2.50, en este se encontró que las interacciones alcanzaron valores energéticos < -50% el 74% de la simulación (Figura 43). Si comparamos este valor con el límite de energía en los agrupamientos, se puede concluir que se trata de una interacción fuerte entre estas dos especies y esto se debe en gran parte a la cercanía entre las especies moleculares implicadas en la interacción que se mantuvo la mayoría de la simulación en valores ~ 2 Å (Figura 42).

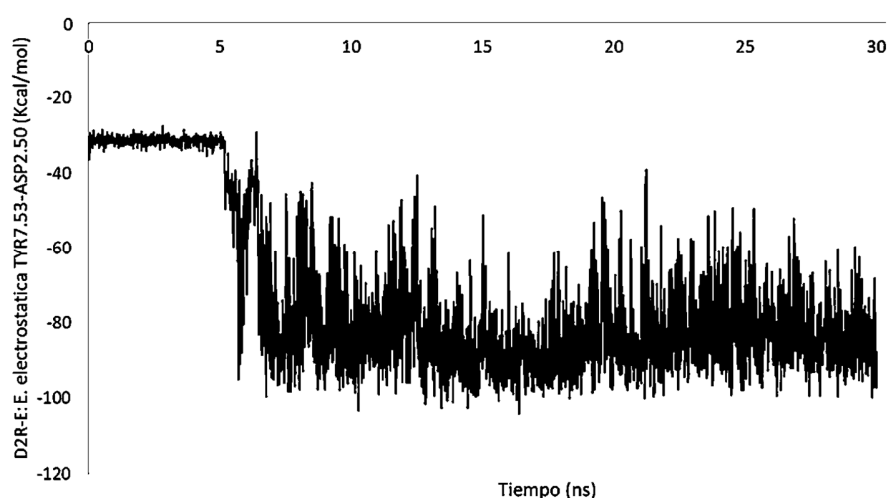


Figura 43. Energía de interacción electrostática entre los grupos R de la TYR7.48 y la ASP2.50 en el sistema D2R-E. Aproximadamente a los 5 ns de la fase de simulación hay un descenso abrupto en la energía electrostática, esto es otro indicio de la formación de un puente de hidrogeno entre la TYR7.48 y la ASP2.50 del TM2 en la simulación del complejo D2R-E. Este enlace está presente en un 45.97% de la fase de producción.

Los resultados de ambos agrupamientos para el sistema H1 muestran conformaciones que salieron de los límites de distancia y energía para ser categorizados como inactivos. Aproximadamente un 44% de la simulación excedió los límites según la energía de interacción (Figura 44) y 32% con el límite de distancia (Figura 45). No obstante el RMSD se mantuvo dentro del rango de inactividad. Cabe mencionar que los rangos de distancia oscilaron alrededor del cristal inactivo que se usó para modelar al receptor H1, el PDB id: 3RZE, que no presenta formación de puente salino en su estructura, sin embargo los valores de energía fueron mucho menores que este control. Estos datos en conjunto sugieren una posible transición de estado conformacional.

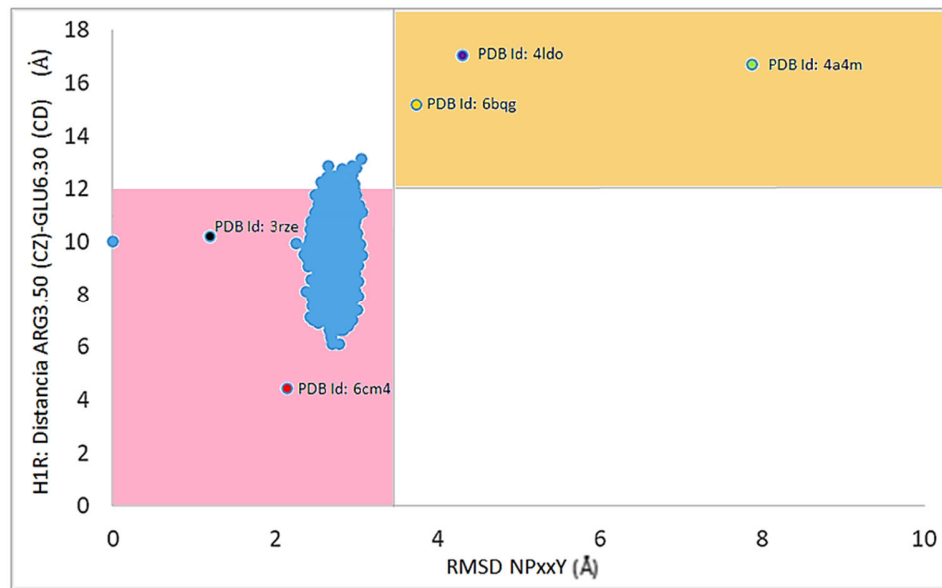


Figura 44. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor H1R basado en la distancia entre la GLU6.30 y la ARG3.50 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto rojo representa las mismas mediciones para el receptor 5-HT2C en fase activa (PDB: 6cbqg), en amarillo se muestra el receptor B2AR (PDB: 4LDO) y en verde el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m).

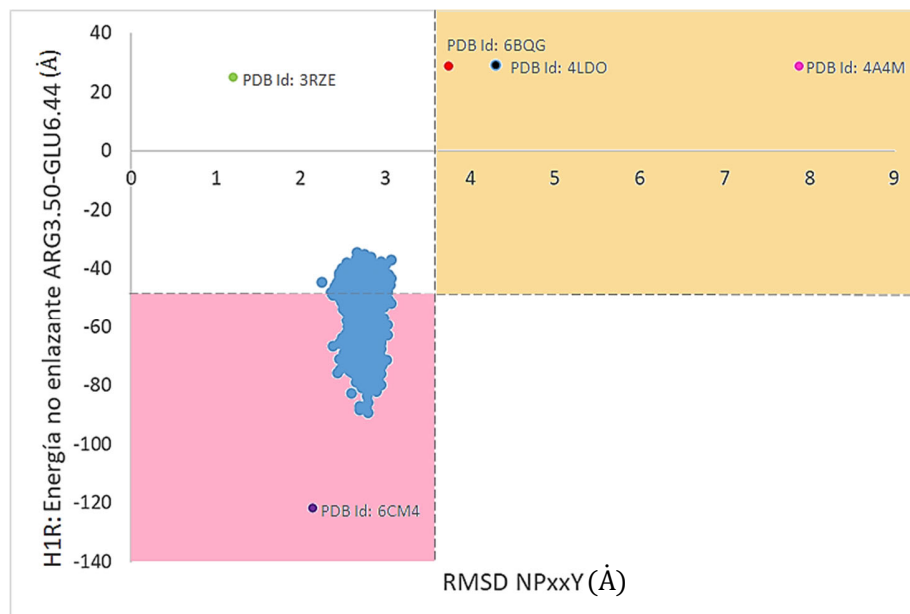


Figura 45. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor H1R basados en la energía no enlazante (VdW + electrostáticas) entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto morado representa las mismas mediciones para el receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en verde se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en rojo el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en rosa el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo).

Un análisis más minucioso de los motivos conservados en la simulación del H1 muestra la formación de un enlace de hidrógeno entre la ARG3.50 y la TYR7.48 el 70.55% de la fase de producción, como se puede observar en la Figura 46 que representa la gráfica de distancia vs tiempo y la Figura 47 en la que se grafica la energía de interacción no enlazante en función del tiempo.

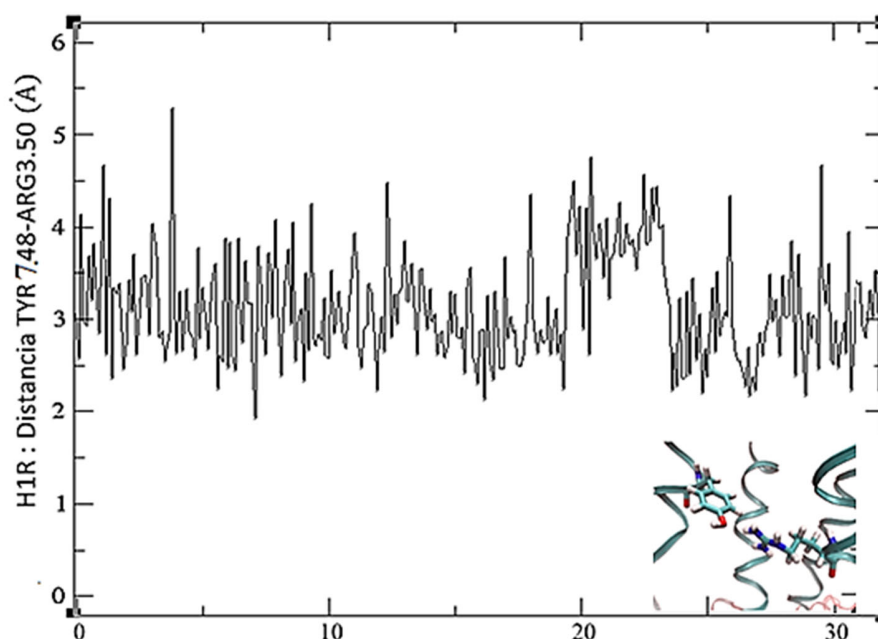


Figura 46. Distancia entre el oxígeno del grupo R de la TYR468 del motivo conservado NPxxY y el carbono Z de la ARG125 en la simulación del sistema H1R. Se observa la formación de un enlace de hidrogeno en un 70.55% de la fase de simulación.

La energía de interacción entre los residuos TYR7.48 y ARG3.50 presentó valores de energía asociados con distancias ~ 3 Å (Figura 46) de -60 Kcal/mol (Figura 47), esto corresponde a la formación de un enlace de hidrógeno tomando en cuenta las interacciones electrostáticas y de VdW.

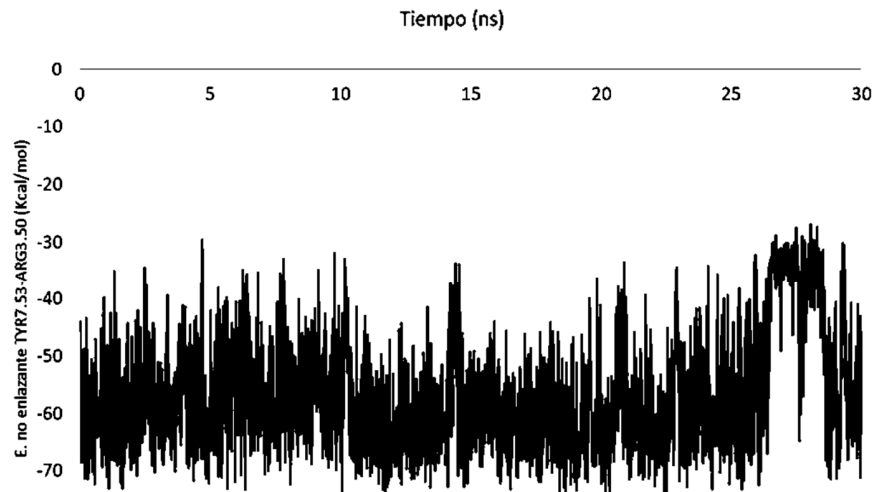


Figura 47. Energía no enlazante, VdW y electrostáticas, entre el oxígeno del grupo R de la TYR468 del motivo conservado NPxxY y el carbón Z de la ARG125 en la simulación del sistema H1R. Se observa interacción en un 83% de la fase de simulación.

El agrupamiento de la gráfica de distancia vs RMSD el sistema H1-CLO (Figura 48) presenta conformaciones inactivas en toda la trayectoria. Mientras que la energía de interacción presentó el 97% energías inferiores a los -50 Kcal/mol (Figura 49).

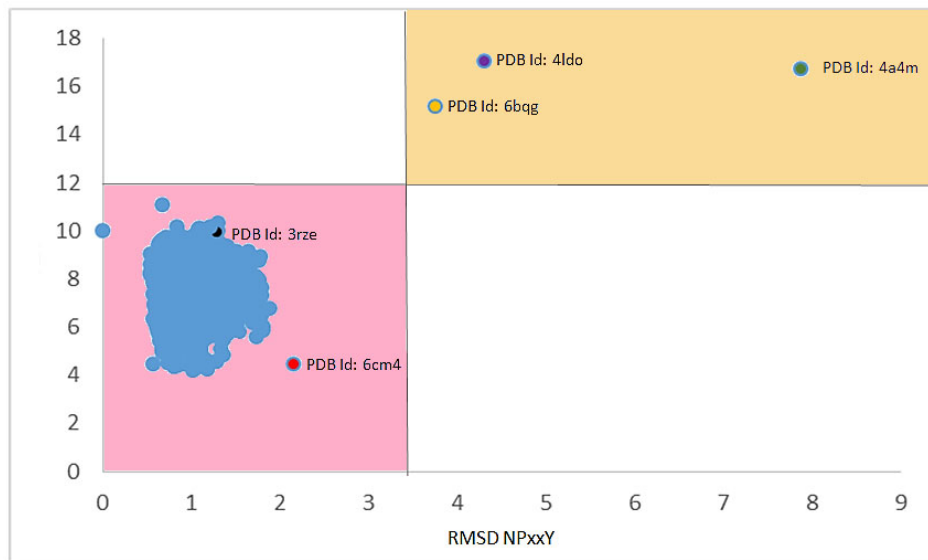


Figura 48. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor H1R-CLO basado en la distancia entre la GLU6.30 y la ARG3.50 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto rojo representa las mismas mediciones para el receptor 5-HT2C en fase activa (PDB: 6cbqg), en amarillo se muestra el receptor B2AR (PDB: 4LDO) y en verde el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m).

Es interesante ver que las conformaciones no tuvieron distancias entre la ARG3.50 y la GLU6.30 menores a las del control 6CM4 (Figura 48), el cual fue reportado con la formación de puente salino, pero en la agrupación de energía vs tiempo en la Figura 49 un grupo reducido de conformaciones tuvieron energías < -120 Kcal/mol, que son inferiores a las del control 6CM4.

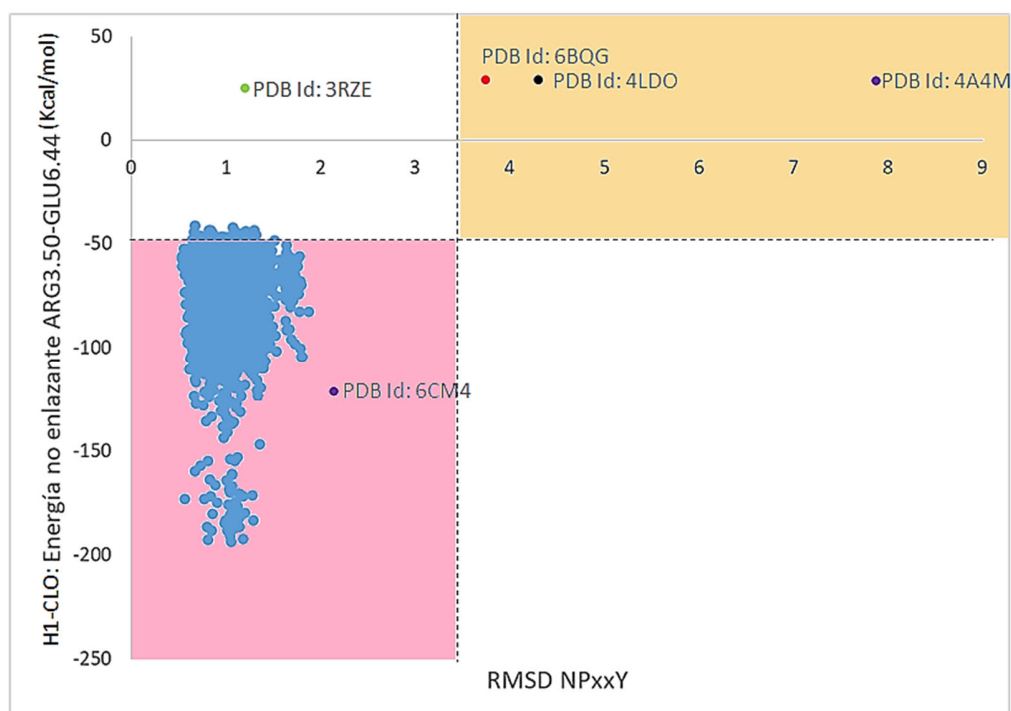


Figura 49. Agrupamiento de las conformaciones a lo largo de la simulación del receptor H1R-CLO basados en la energía no enlazante (VdW + electrostáticas) entre la ARG3.50 y la GLU6.30 y el RMSD para todos los átomos del motivo NPxxY. Cada punto azul representa un cuadro en la trayectoria de simulación. El punto morado representa las mismas mediciones para el receptor D2 con PDB id: 6cm4 en fase inactiva, en verde se muestra el receptor H1 (PDB: 3rze) y en rojo el receptor 5-HT2C con PDB id: 6bqg, en rosa el receptor de rodopsina activado con luz (PDB 4a4m) y en negro el receptor β 2AR (PDB: 4ldo).

Una interacción interesante en la simulación del sistema H1-CLO, es la de la ASP2.50 con la TYR7.48 del motivo NPxxY. Entre estos se forma un enlace de hidrógeno el 100% del tiempo de simulación como lo indica la distancia entre estos residuos (Figura 50).

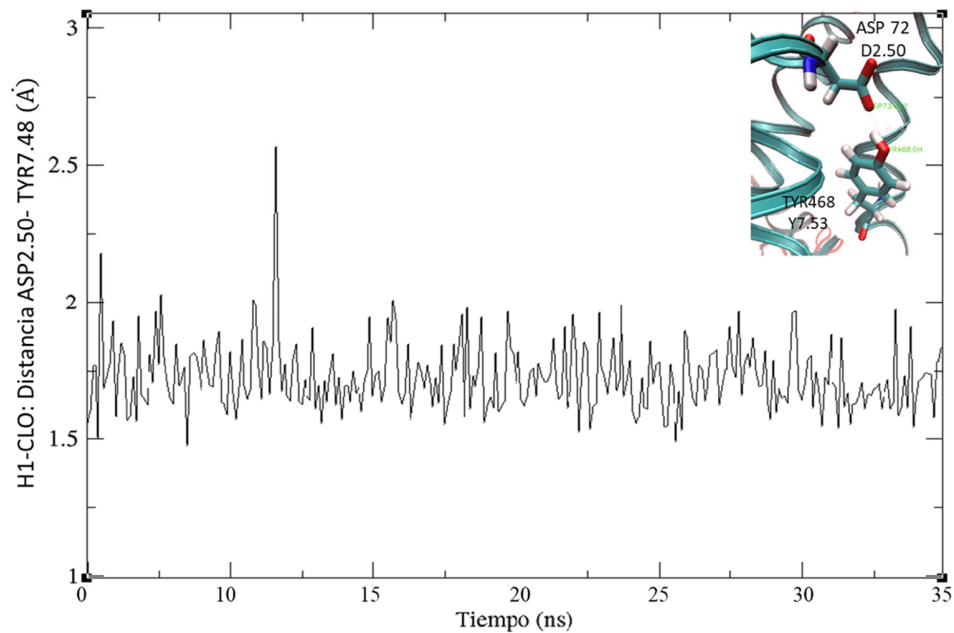


Figura 50. Distancia entre la ASP72 y la TYR468, del motivo D2.50 y NPxxY respectivamente. Se tomaron las distancias entre uno de los oxígenos del grupo funcional de la ASP3.50 y el hidrógeno del hidroxilo en la TYR7.48 Este enlace se forma el 100% de la fase de producción de la simulación H1-CLO.

Además la energía de interacción entre estos residuos oscila ~ 60 Kcal/mol (Figura 51), estos valores de energía son muy parecidos a los de la Figura 47 donde también se identificó la formación de un enlace de hidrogeno, en la que se incluyen las contribuciones de la energía electrostática y de VdW. Ambos resultados en conjunto demuestran que la TYR7.48 se orienta hacia la TM2, lo cual es un fundamento más de que se encuentra en un estado conformacional inactivo.

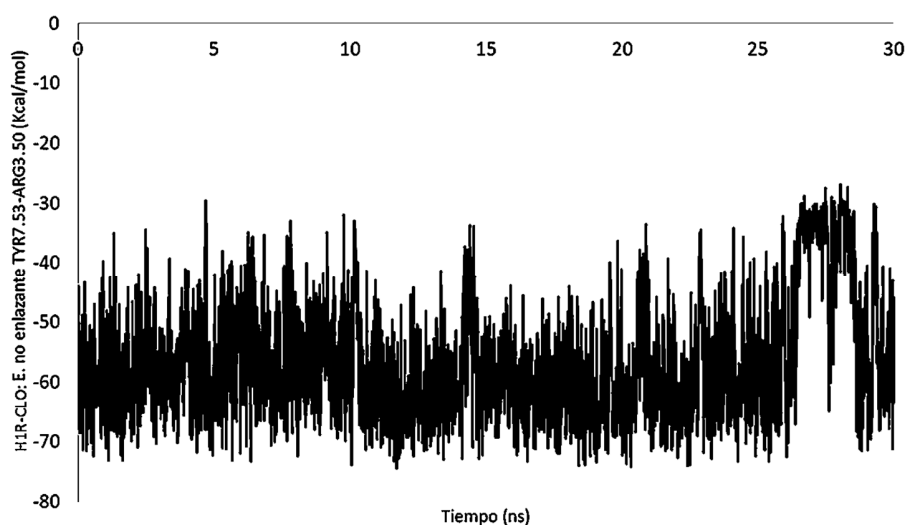


Figura 51. Energía de interacción entre la ASP72 y la TYR468, del motivo D2.50 y NPxxY respectivamente. Este enlace se forma el 100% de la fase de producción de la simulación H1-CLO.

5.4 Determinación de las poses más representativas

Se obtuvieron los estados más representativos para la simulación de los sistemas con la clozapina en estado ecuatorial para los receptores H1 y D2. La energía más frecuente para el sistema H1-CLO fue de -386015 Kcal/mol y del sistema D2 de -385031 Kcal/mol (Figura 52).

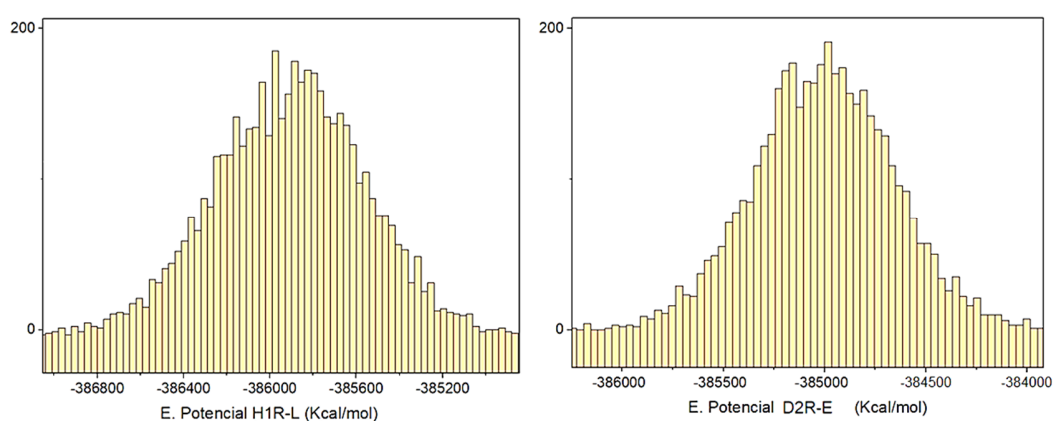


Figura 52. Histogramas de frecuencia de las energías potenciales de los cuadros de las tres réplicas de simulación de los sistemas H1 y D2 con clozapina, con la piperazina en estado ecuatorial. Las frecuencias se midieron para intervalos de 20 Kcal/mol.

5.5 Modo de unión y cálculos de energía libre de interacción ligante-receptor

El modo de unión de la clozapina en los receptores fue determinada por acoplamiento molecular a través del uso del programa Autodock4 (ADT4)) (Garret M.M, Huey R., et. al., 2009). De esta manera, estos modos de unión fueron los seleccionados para iniciar las dinámicas moleculares (Figura 53).

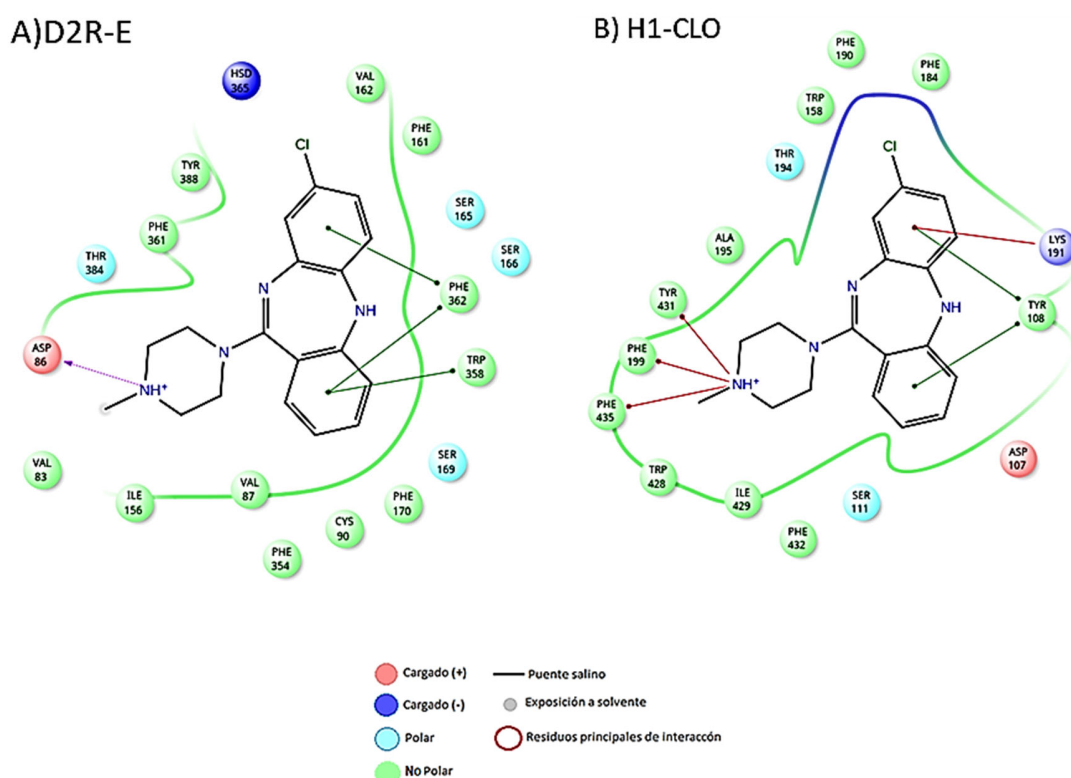


Figura 53. Diagramas de interacción entre la clozapina y los receptores estudiados. Modos de unión de la clozapina con la piperazina ecuatorial en los receptores D2 (A)) y H1 (B)) al tiempo 0 de la fase de producción en DM.

Al final de la dinámica se midió la energía de interacción no enlazante con los métodos de MM/PBSA y MM/GBSA para ello se alimentó al programa al seleccionar estados conformacionales de la simulación cada 0.5 ns y se decidió excluir las contribuciones de solvatación no polar para los cálculos de MM/PBSA, porque la mayor parte de la proteína está embebida en la bicapa lipídica, es decir, la interacción se da en la zona apolar del sistema y la interacción proteína-lípido es calculada por separado. Así, la contribución polar es más significativa en la zona extracelular, ya que se encuentra en contacto con el disolvente y es

rica en residuos polares. Los resultados que se muestran a continuación son un desglose de los tipos de energías no enlazantes para cada residuo alrededor de 5 Å del ligante según el método de MM/PBSA y MM/GBSA. Se resaltan en rojo los valores de energía de VdW y electrostáticas de los residuos cuya suma sea $\geq \pm 1 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}}$. Al final de los desgloses se resumen en una tabla los valores totales de ΔG para cada sistema con ambos métodos.

Para el caso del sistema H1-CLO según el método de MM/PBSA, los residuos de interacción más significativos son la ASP107 cuya interacción electrostática es atractiva fuerte en comparación con la de los demás residuos y la LYS179 y LYS191 cuyas interacciones son electrostáticas repulsivas (Figura 54). Otros residuos significativos son la LEU104, TYR108, TYR185, VAL187, PHE190, Y PHE435.

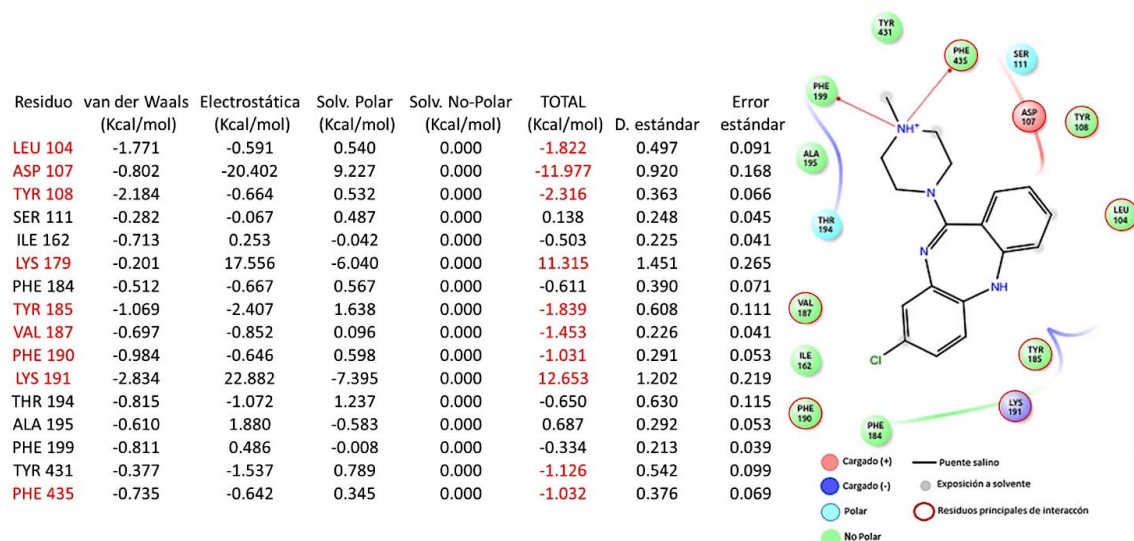


Figura 54. Resultados de las energías no enlazantes para el sistema H1-CLO, de acuerdo al método de MM/PBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar.

Los resultados son muy distintos entre el método de MM/GBSA y MM/PBSA para el mismo sistema. V.g. la contribución total de la ASP107 y la LYS179 están en el rango de los decimales y la LYS191 no es de los residuos principales de interacción (Figura 55). Es necesario analizar y comparar ambos métodos como tal para poder definir cuál de estos métodos es más preciso. Otros residuos cuya interacción es significativa son la LEU104, TYR108 y PHE435.



Figura 55. Resultados de las energías no enlazantes para el sistema H1-CIO, de acuerdo al método de MM/GBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar.

Los resultados de MM/PBSA están en la Figura 56, el residuo cuya contribución atractiva es mayor es la ASP86, este residuo es conservado dentro de las GPCRs y equivale al mismo que la ASP107 en el receptor H1. En este caso la cercanía que tiene la ASP86 con el nitrógeno cargado de la clozapina indica la posible formación de un puente salino, véase la parte 6.6 de la discusión donde se profundiza más en esta interacción. Otros residuos significativos son la VAL83, TRP358, PHE361 y PHE362.

Los resultados con MM/GBSA son contradictorios para la ASP86 con MM/PBSA, esto se debe a que la contribución repulsiva de la solvatación polar que es mayor que la electrostática atractiva de este residuo con la clozapina (Figura 57). Por otro lado, los resultados con ambos métodos son muy similares para la PHE362, el cual es un residuo no polar a diferencia de la ASP86 (Figuras 56 y 57). Otros residuos con interacción significativa son la VAL87, CYS90, PHE361.

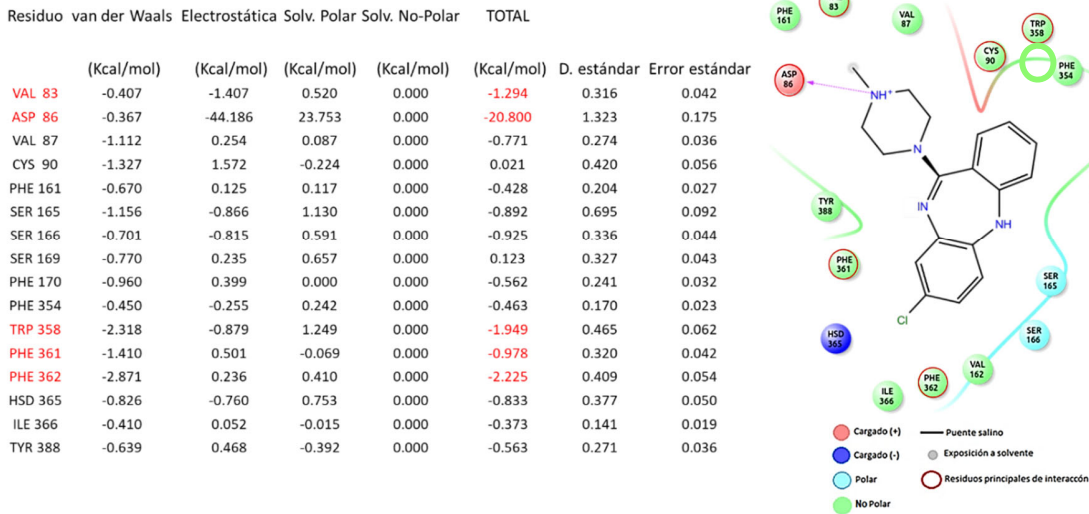


Figura 56. Resultados de las energías no enlazantes para el sistema D2R-E, de acuerdo al método de MM/PBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar.

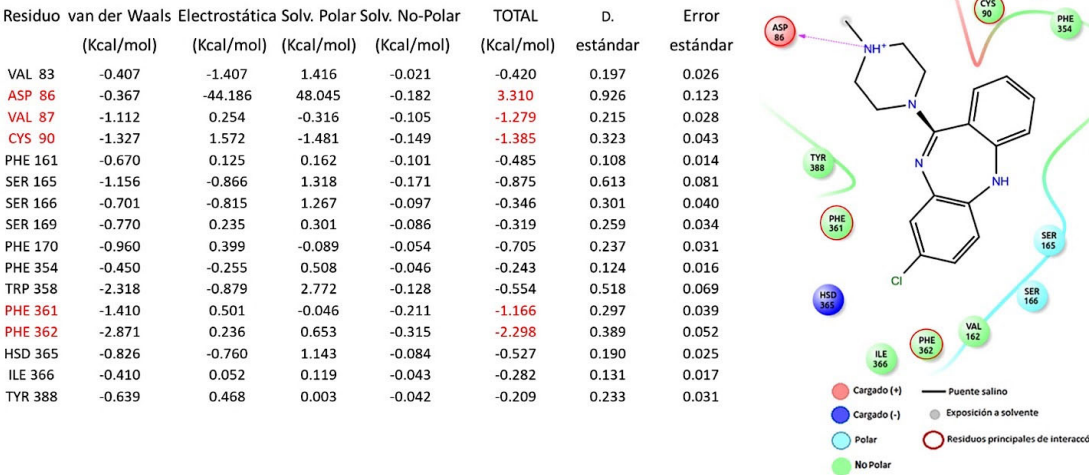


Figura 57. Resultados de las energías no enlazantes para el sistema D2R-E, de acuerdo al método de MM/GBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar.

Los resultados de MM/PBSA para el sistema D2R-A, indican más residuos que con el método de MM/GBSA. Esta aseveración se extiende, además, para los demás sistemas. La ASP86 es el residuo cuya contribución atractiva es mayor, pero a diferencia del sistema D2E, esta interacción no es tan negativa y no interacciona con el nitrógeno cargado, sino con la parte lateral de uno de los bencenos de la clozapina (Figura58). Otros residuos cuya interacción es significativa son la CYS90, SER165, SER166, PHE170, TRP358, PHE361 y la HSD365.

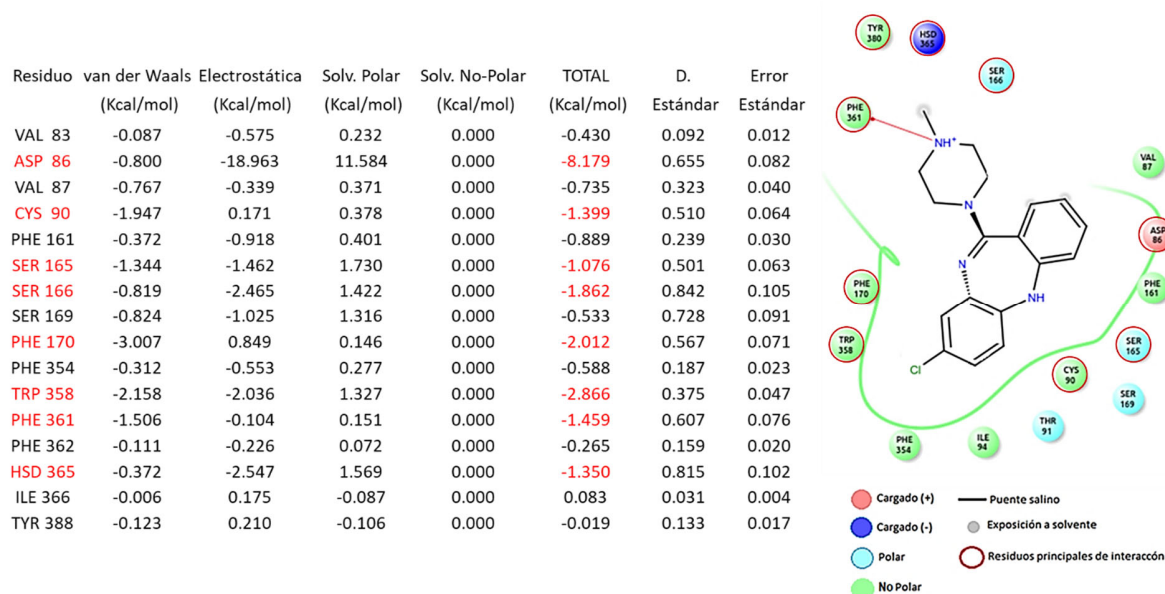


Figura 58. Resultados de las energías no enlazantes para el sistema D2R-A, de acuerdo al método de MM/PBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar.

Los resultados de MM/GBSA para residuos polares del sistema D2R-A (Figura 59), al igual que los resultados para el sistema D2E, muestran resultados contradictorios si se comparan con MM/PBSA. Por ejemplo, la contribución de solvatación polar de la ASP86 hace que la energía total de interacción sea repulsiva por MM/GBSA y atractiva para MM/PBSA (Figura 58 y 59). Por otro lado para el caso de la PHE170 ambos métodos lo señalan como significativo. Otros residuos significativos son la CYS90, SER165, TRP358 Y PHE361.

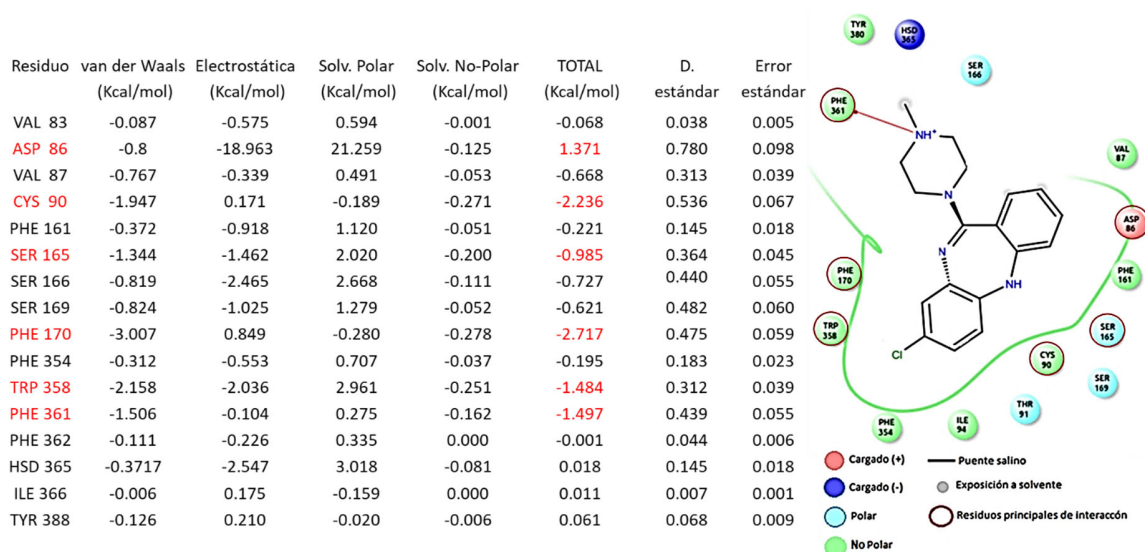


Figura 59. Resultados de las energías no enlazantes para el sistema D2R-A, de acuerdo al método de MM/GBSA. La primera columna indica el nombre y número de residuo, la segunda la energía de VDW, seguido de la energía electrostática, la energía de solvatación polar y no polar. La última columna indica la energía total con su respectiva desviación estándar y error estándar.

Como observación general, los resultados muestran valores mayores para los métodos de MM/PBSA, en consecuencia hay mayor número de residuos con valores de afinidad significativos. Por ejemplo para el caso del sistema H1-CLO los residuos de interacción más importantes con el método de MM/PBSA son la LEU104, ASP107, TYR108, LYS179, TYR185, VAL187, PHE190, LYS191 Y PHE435, mientras que por el método de MM/GBSA los residuos son la LEU104, TYR108, LYS191 Y PHE435.

Cabe mencionar que algunos de estos residuos son conservados entre los receptores D2 y H1, estos son la ASP107 del H1-CLO, que en el receptor D2 es la ASP86 y la PHE170 en el receptor D2 que en el H1-CLO es la PHE 190.

A continuación, se presentan los resultados de energía libre total para cada sistema con su respectivo método de cálculo. En la Tabla 6 se indica una proporción entre la afinidad del sistema D2R-E y H1-CLO, este dato es importante porque se reduce a un valor cuantificable la relación de afinidades entre un sistema y otro, esto se puede relacionar con la selectividad que tiene la clozapina por el receptor D2.

Tabla 6. Energías libres en Kcal/mol de la interacción clozapina con los receptores H1 y D2. La clozapina en las dos conformaciones de la piperazina solo se calculó para el receptor D2. La última columna es la razón entre las afinidades del sistema D2R-E/H1-CLO.

Método	H1-CLO	D2R-E	D2R-A	Proporción
MM/PBSA	-30.70±2.38	-39.25±2.30	-32.53±2.52	1.28
MM/GBSA	-26.85±2.11	-31.57±3.14	-31.93±2.85	1.17

Basados en la identificación de los residuos con interacciones más fuertes con la clozapina mediante métodos de solvatación en continuo, se ha identificado una zona en la que se puede buscar anular la afinidad por el receptor H1, sin anular la interacción con los residuos más importantes de la clozapina con el receptor D2. Esta se señala en la Figura 60 delimitada con un ovalo de color azul marino.

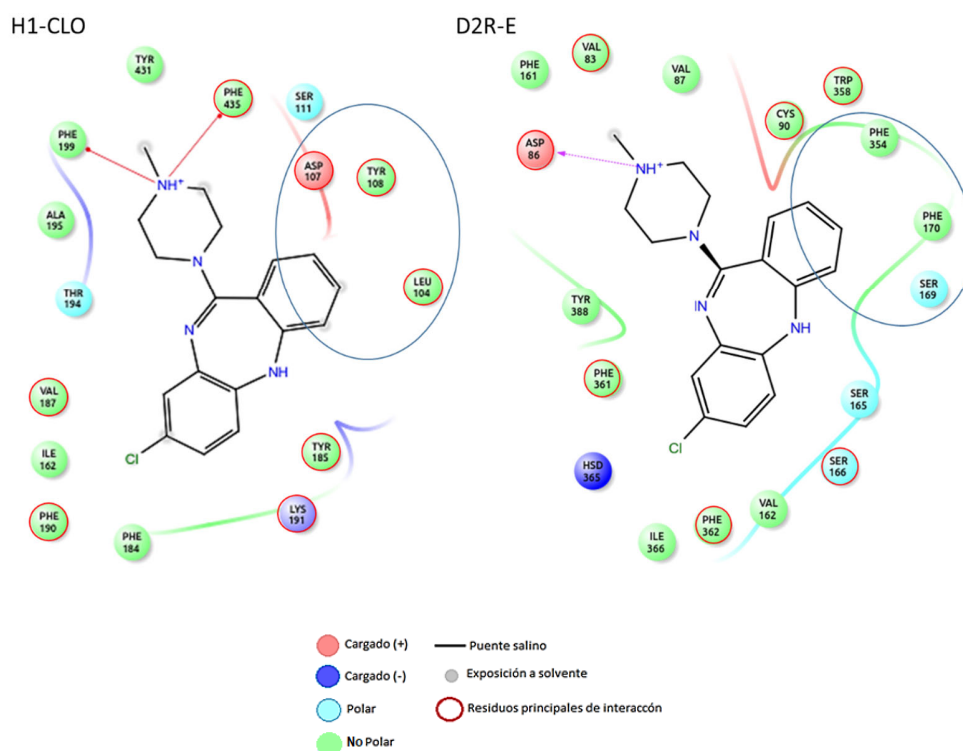


Figura 60. Diagramas de interacción entre la clozapina con la piperazina ecuatorial y los receptores D2 y H1. Estas poses son las más representativas a lo largo de la fase de producción. Circuladas en rojo se señalan los residuos que presentaron valores $\geq \pm 1$ Kcal/mol con el método de MM/PBSA. Circulado en azul se indica una zona en la que la interacción con el receptor H1 es fuerte, pero no lo es para el receptor D2.

A partir de la identificación de esta zona se probó con ADT4 la adición de un grupo metilo en el carbono 8 de la clozapina. Además, se probó el efecto en la afinidad por la variación del cloro por otros halógenos. En la Figura 61, se indican en rojo las modificaciones químicas de la clozapina estudiadas.

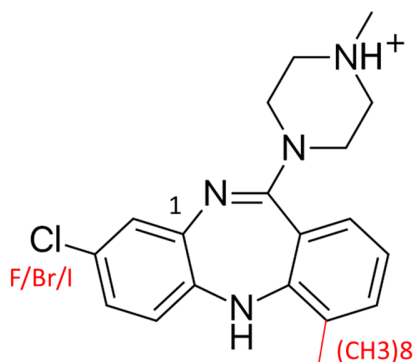


Figura 61. Diagrama en el que se señalan las modificaciones de la clozapina para calcular la energía libre asociada a la interacción con el receptor D2 y H1 con acoplamiento molecular. Las posiciones para cada derivado son las mismas que la clozapina. Las variaciones que se indican son los halógenos flúor, bromo e iodo y las metilaciones en la posición 8.

De los candidatos probados por acoplamiento molecular, fue la modificación química de cloro por el iodo en combinación con una metilación en el carbono 8 de la clozapina (C8-I), seguido de la combinación de la metilación en el carbono 8 y la sustitución de cloro por flúor, así como el cambio químico de cloro por el iodo, los que mostraron resultados alentadores. Esto se puede entender en la proporción D2/H1 que se obtiene con la resta del valor de la energía libre para el receptor D2 menos la energía libre de interacción de la clozapina con este receptor y dividiéndolo entre la misma recursión aritmética para el receptor H1. Los valores más cercanos a cero se acercan más al objetivo principal de este trabajo, que es reducir la afinidad por el receptor H1 sin afectar, en la medida de lo posible, la afinidad por el receptor D2.

$$\text{Proporción} \frac{\Delta\Delta G_{D2}}{\Delta\Delta G_{H1}}: \frac{\Delta G_{Deriv,D2} - \Delta G_{CLZ,D2}}{\Delta G_{Deriv,H1} - \Delta G_{CLZ,H1}} \quad (33)$$

En la Tabla 7 se resumen los resultados de afinidad y las proporciones, en las que entre menor es el valor mayor selectividad por el receptor D2. Aquí se observa que la modificación química de Cl a I genera una buena proporción con 0.60 unidades, mientras que el mejor candidato es la metilación en el carbono 8 en combinación de la sustitución de cloro por iodo con 0.39 unidades.

Tabla 7. Candidatos probados por acoplamiento molecular con ADT4. Las unidades están en Kcal/mol, el error es de ~2.4 Kcal/mol. En la última columna se muestra la razón entre afinidades por el receptor D2 y el H1, entre mayor es este valor, más selectivo es el derivado por el receptor D2.

Derivado	ADT4 D2 (Kcal/mol)	ADT 4 H1 (Kcal/mol)	Proporción D2/H1
Clozapina	-9.93	-9.34	1.06
F Cl->F	-8.91	-8.90	2.32
Cl->Br	-8.36	-9.05	5.41
Cl->I	-9.15	-8.07	0.61
C8 (H->CH3)	-8.38	-9.06	5.53
Cl->F, C8 (H->CH3)	-9.60	-8.79	0.6
Cl->I, C8 (H->CH3)	-9.50	-8.25	0.39

Los cálculos de acoplamiento molecular dan una buena relación sobre las modificaciones químicas de un ligante y su energía de afinidad. No obstante, el error de este método es grande debido a que los cálculos se hacen con una estructura proteica rígida, mientras que *in-vivo* las proteínas son dinámicas en el tiempo, además de los movimientos en los residuos debidos a la interacción con el ligante. Por otro lado, los métodos de perturbación de energía libre (FEP) tienen un margen de error menor, siempre y cuando las modificaciones del ligante sean mínimas, por lo que se recurrió a este, para calcular las energías libres de los candidatos probados con ADT4, con el fin de comparar ambos métodos, y además se probaron otros candidatos más, que fueron metilaciones en las posiciones de los carbonos 9 y 10 y la adición de cloro en la posición del carbono 10 (Figura 62). Los resultados de FEP se presentan en la Tabla 9.

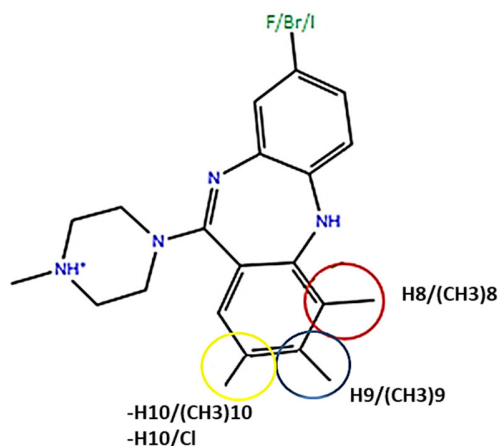


Figura 62. Modificaciones a la clozapina probadas con FEP en el programa NAMD. Se probaron los cambios del cloro por los halógenos flúor, bromo e yodo. También se probó con metilaciones en las posiciones de los carbonos 8, 9 y 10 y la adición de un cloro en la posición del carbono 10.

Para los cálculos de FEP, se tomó la pose más representativa, y se fueron ajustando valores de λ , pasos de equilibrado y producción para asegurar una convergencia de las simulaciones de ida y vuelta, Figura 63 para visualizar dicha convergencia, lo cual garantiza un error mínimo.

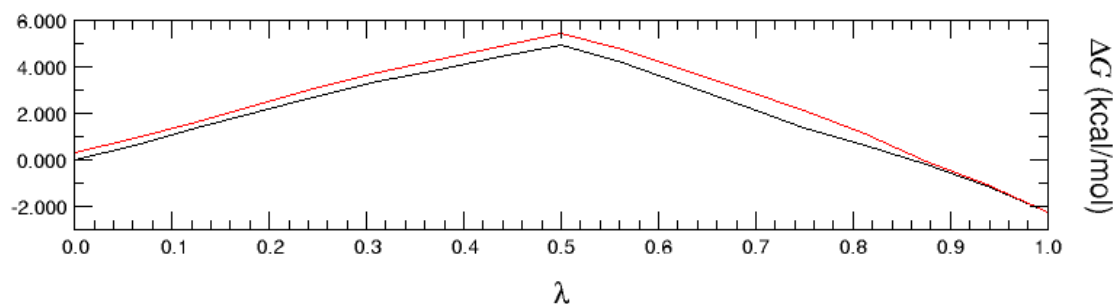


Figura 63. Resumen del cambio en la energía libre para la mutación del cloro en la clozapina por flúor, para el receptor H1. La línea en negro indica la energía libre para la simulación de ida, y en rojo la simulación de regreso, una convergencia al principio y final de las simulaciones asegura un error mínimo. Para este cálculo se utilizó una λ de 0.0625, con 100 pasos de equilibrado para cada paso y 400 pasos de muestreo con un tiempo de integración de 2 fs. Además se usaron potenciales de núcleo suave para las interacciones electrostáticas, a una λ de 0.5 y de VDW, con una λ de 0.6.

En la Tabla 8 se muestra un resumen de los resultados de energías libres para FEP y se muestran junto a los de acoplamiento molecular para su comparación. Para ayudar a la visualización de los mutantes de la clozapina puede servir de la figura 53.

Tabla 8. Resumen de las energías libres para cada derivado calculadas por acoplamiento molecular con el programa ADT4 y por método de FEP, efectuados en NAMD. Además, se muestran las proporciones D2/H1 para cada método.

Derivado	$\Delta\Delta G$ ADT4 D2 Error ± 2.4 (Kcal/mol)	$\Delta\Delta G$ ADT4 H1 Error ± 2.4 (Kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{D2}/$ $\Delta\Delta G_{H1}$ ADT	$\Delta\Delta G$ FEP D2 (Kcal/mol)	$\Delta\Delta G$ FEP H1 (Kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{D2}/$ $\Delta\Delta G_{H1}$ ADTFEP
F	1.02	0.44	2.32	-2.86 ± 0.1	-2.33 ± 0.16	1.23
Br	1.57	0.29	5.41	1.54 ± 0.1	2.02 ± 0.12	0.76
I	0.78	1.27	0.61	1.12 ± 0.1	2.71 ± 15	0.41
C8	1.55	0.28	5.53	5.19 ± 0.24	2.02 ± 0.45	2.56
C8-F	0.33	0.55	0.6	-1.50 ± 0.2	-0.92 ± 0.21	1.63
C8-Br				8.50 ± 0.21	3.30 ± 0.20	2.57
C8-I	0.43	1.09	0.39	7.18 ± 0.31	5.88 ± 0.37	1.22
C9					-3.15 ± 0.38	
C10					-13.01 ± 0.25	
Cl-9					-3.68 ± 0.23	

De los cálculos efectuados con FEP el mejor candidato es la modificación química del cloro por el yodo, seguido del cambio por bromo. . De los cálculos por acoplamiento molecular la modificación química del cloro por yodo también dio una proporción cercana a cero. No obstante, la mayoría de los candidatos mostraron poca correlación en las energías libres calculadas por acoplamiento molecular y FEP.

Capítulo 6. Discusión

6.1 Validación de la fase de equilibrado

Se logró alcanzar el equilibrio en todas las simulaciones a los 50 ns de equilibrado sin restricciones de ningún tipo. Esto se puede comprobar mediante los resultados de RMSD y energía potencial, en los que se hicieron ajustes lineales que resultaron en pendientes muy cercanas a cero.

No obstante, el RMSD de la fase de producción del sistema D2R presenta un comportamiento oscilatorio más pronunciado que el receptor D2 con la clozapina, de modo que en los primeros 5 ns de simulación el sistema pasa de 6.8 Å a 8.5 Å, para luego bajar a 7 Å (Figura 29), esto podría ser indicio de una conformación poco estable. Para comprobarlo, se tomó el RMSD de los carbonos α de la zona extracelular e intermembranal, es decir, se cortó la zona más flexible de la proteína que corresponde a la zona intracelular de la proteína, identificada por medio del cálculo de las fluctuaciones de los residuos (RMSF). El RMSD resultante varía muy poco a lo largo de la simulación (~ 0.5 Å), por lo que el sitio activo y las 7 alfa hélices se encuentran estables a lo largo de la fase de producción, mientras que la parte intracelular es altamente flexible (Figura 64).

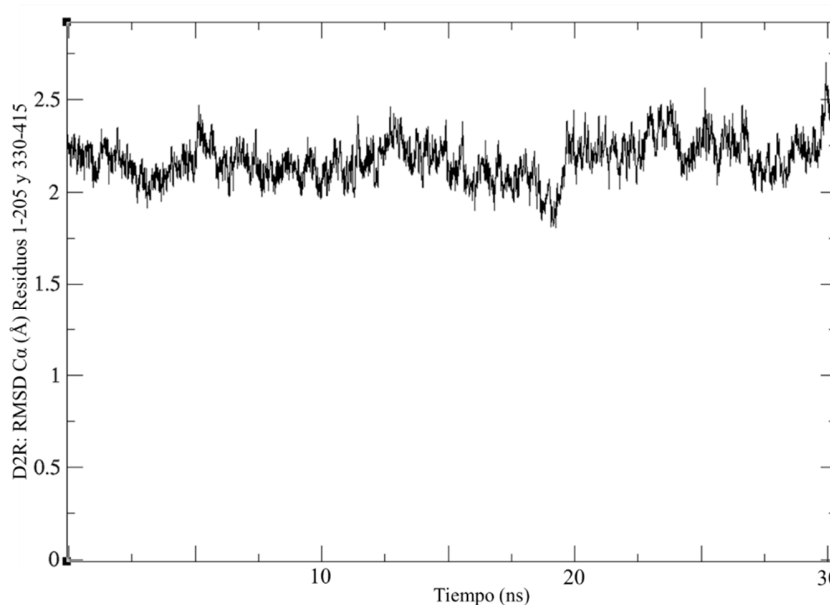


Figura 64. RMSD de los carbonos α del sistema D2R de los residuos 1-102 y 330 a 415 que corresponden a la parte intermembranal y extracelular del receptor.

Las energías potenciales promedio del sistema H1 sin ligante tiene un valor ligeramente menor que el sistema H1 con la clozapina (H1-CLO) (-3.9235×10^5 Kcal/mol y -3.859×10^5 Kcal/mol, respectivamente). Esto se debe a que el sistema H1 tiene 1813 átomos más que el sistema H1-CLO ya que los sistemas fueron contruidos de manera independiente en el programa CHARMM-GUI. Por otro lado, las energías potenciales promedio de los sistemas con el receptor D2 (-3.85×10^5 para el receptor solo, -3.85×10^5 para el D2R-E y -3.84×10^5 para el D2R-A) son muy similares entre sí, así como el número de átomos que conforman los sistemas.

Se calculó el RMSF para determinar el grado de flexibilidad de ambos Los sistemas mostraron que la región intracelular de ambos receptores es altamente flexible, tal como se observa en las figuras 30 y 33. No obstante, los receptores sin ligante muestran mayor flexibilidad en comparación con los receptores solos. Esto se puede deber a dos razones, una, que la clozapina impide por estericidad el libre movimiento de la TM5 y TM6, o dos, que induce a la proteína a una conformación distinta. Para investigar esto, se determinó el número de contactos nativos alrededor de $4.2 \text{ \AA}$, también el número de enlaces de hidrógeno y puentes salinos para todos los sistemas y sus réplicas (Tabla 9).

Tabla 9. Con el fin de determinar el efecto de la clozapina en la conformación intracelular de los receptores se calculó el número promedio de enlaces de hidrógeno, los puentes salinos y los contactos nativos entre los residuos 224 a 400 para los sistemas con el receptor H1 y los residuos 233 a 335 de los sistemas con el receptor D2. Para determinar los enlaces de hidrogeno, se tomaron distancias menores a $3.5 \text{ \AA}$ entre el donador y aceptores del enlace y un límite angular de 20° entre estos. Para determinar la formación de puentes salinos se tomaron distancias oxígeno-nitrógeno inferiores a $4.2 \text{ \AA}$ y se eligieron como válidos a las que presentaran dicha interacción por más del 30 % de la fase de producción. También se calcularon los contactos nativos a $3.5 \text{ \AA}$ con la herramienta *cpptraj*.

Replica No.	Sistema	E. Hidrógeno	Puentes salinos	Contactos nativos
1	H1-CLO	30	15	17714
2	H1-CLO	25	13	17853
3	H1-CLO	28	16	17367
1	H1R	27	17	17278
2	H1R	32	16	18062
3	H1R	28	13	17787
1	D2R	13	15	11840
2	D2R	14	11	11714
3	D2R	15	14	10853
1	D2R-E	14	13	11367
2	D2R-E	16	15	11278
3	D2R-E	14	13	11062
1	D2R-A	19	14	10787
2	D2R-A	15	15	11784
3	D2R-A	17	11	10844

Como se observa en la tabla 10, los conteos de los contactos nativos, enlaces de hidrógeno y puentes salinos no mostraron ninguna diferencia significativa, además de que las réplicas para cada sistema arrojaron resultados distintos. De modo que la explicación a la reducción de la flexibilidad se debe únicamente al choque estérico que provoca la clozapina en el sitio de unión, es decir, se descarta que la clozapina induzca a una conformación distinta, ya que de ser así, las diferencias entre los puentes salinos, contactos nativos y enlaces de hidrogeno entre los receptores solos y los que contienen al ligante serían muy pronunciadas. El sitio de unión, conformado por hélices α se relaciona con la zona intracelular porque están compuestos por las mismas hélices α , de modo que cuando se une una molécula grande provoca que ellas se separen entre sí en el sitio de unión, pero se junten en la zona intracelular lo que impide la unión de la proteína G, este mecanismo se puede comparar con un gancho de ropa, Figura 44. Considerando que la clozapina es considerablemente grande en comparación con la dopamina o la histamina, que son las moléculas endógenas, se puede concluir que es debido al gran tamaño que tiene la clozapina en comparación con estos ligantes endógenos el movimiento de las TM5 y TM6 se ve limitado, de modo que la flexibilidad de la zona entre estas dos hélices se reduce (Figura 44).

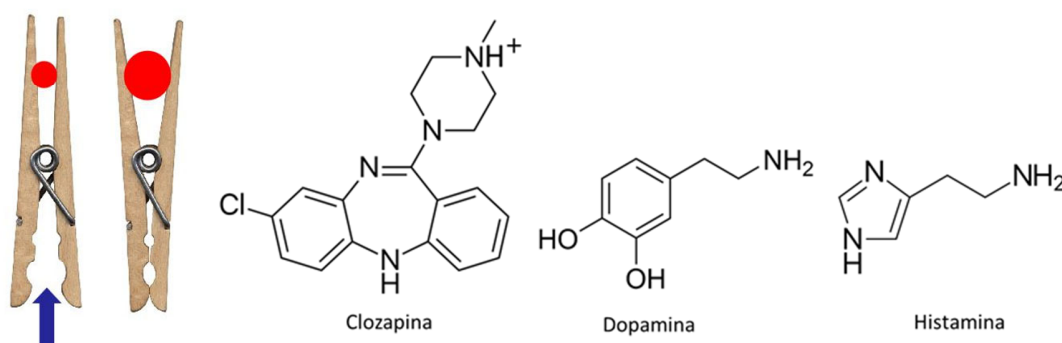


Figura 65. Moléculas de Dopamina, histamina y clozapina para comparar el tamaño de la clozapina con los ligantes endógenos de los receptores D2 y H1 que son la dopamina e histamina respectivamente.

Una interacción que se formó en algunas réplicas de los tres sistemas que incluyen al receptor D2 (D2R, D2-E y D2-A) es la interacción entre la ARG191 y la GLU340, que se encuentran en el TM5 y TM6, respectivamente. Esta interacción no está descrita en la literatura, ni tampoco se encontró en los cristales control que se usaron en los agrupamientos, Figura 39. Debido a que esa es una zona donde hay citoplasma, y otras moléculas que no se simularon en este trabajo, es difícil aseverar que esta interacción pueda ocurrir naturalmente. Sin embargo, el hecho de que se haya presentado en los sistemas con y sin

ligante comprueba que la clozapina no induce a una conformación inactiva distinta de la que adoptaría el receptor sin ligante, esto quiere decir que, aparentemente, la clozapina es un antagonista neutro.

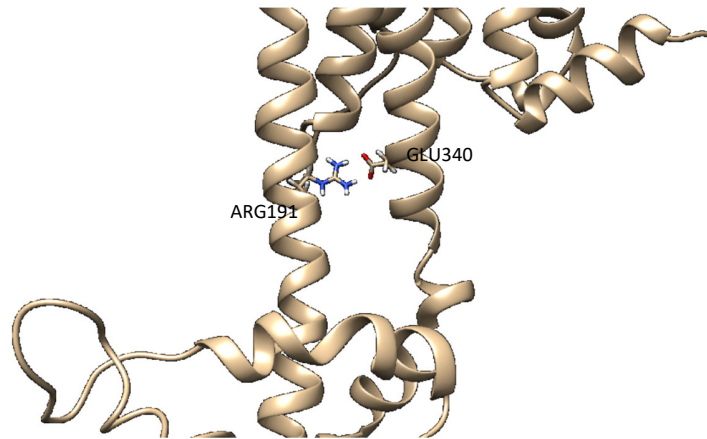


Figura 66. Residuos conservados en el receptor D2 que su interacción electrostática es un descriptor molecular del estado inactivo. La formación del puente salino entre los residuos ARG3.50 y GLU6.40 es un indicativo del estado inactivo en las GPCRs.

Las crestas en el RMSF de los residuos 275 al 300 y de los residuos del 360 al 450 para el receptor H1 se deben a movimientos en los segmentos proteicos no helicoidales que se acercan hacia la membrana plasmática e interactúan con ésta (Figura 46). Cabe mencionar que las interacciones con la membrana solo se presentan en la primera replica para los residuos 275 al 300 y en las primeras dos replicas para el segmento 360 a 400, esto explica por qué la cresta alcanzó casi 15 Å en el RMSF (Figura 47).

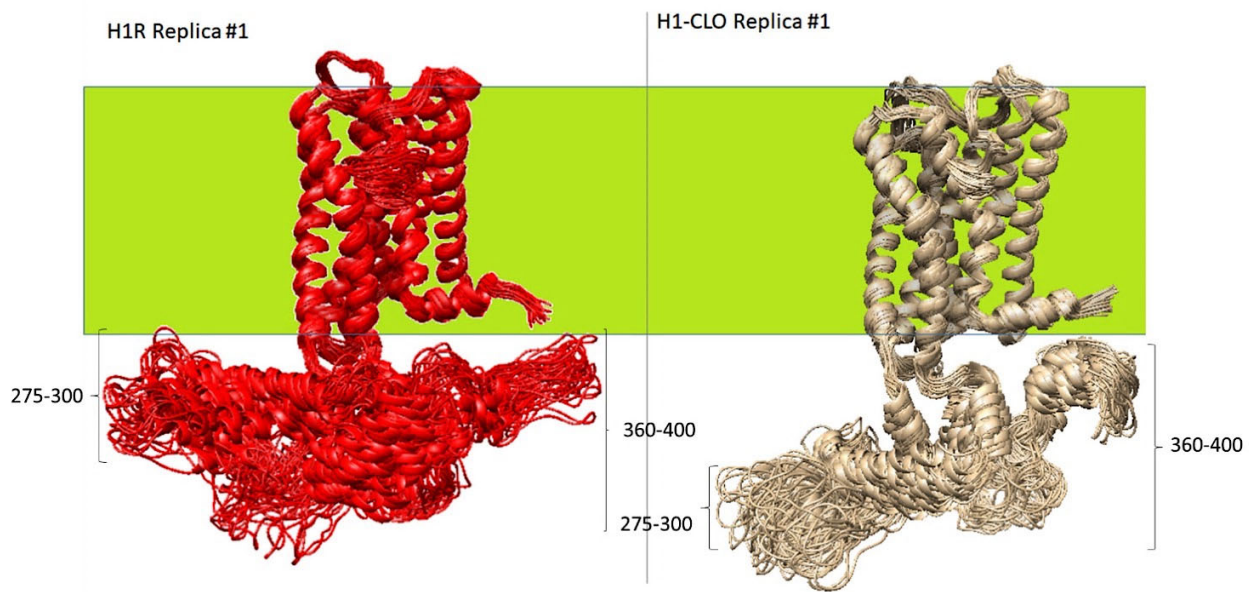


Figura 67. Estructuras proteicas alineadas con la herramienta MatchMaker de UCSF CHIMERA para la trayectoria de simulación del receptor H1 y el sistema H1-CLO. Se tomaron las estructuras cada 100 cuadros. Se indican las zonas donde se encuentran los residuos 275 al 300 y 360 al 400.

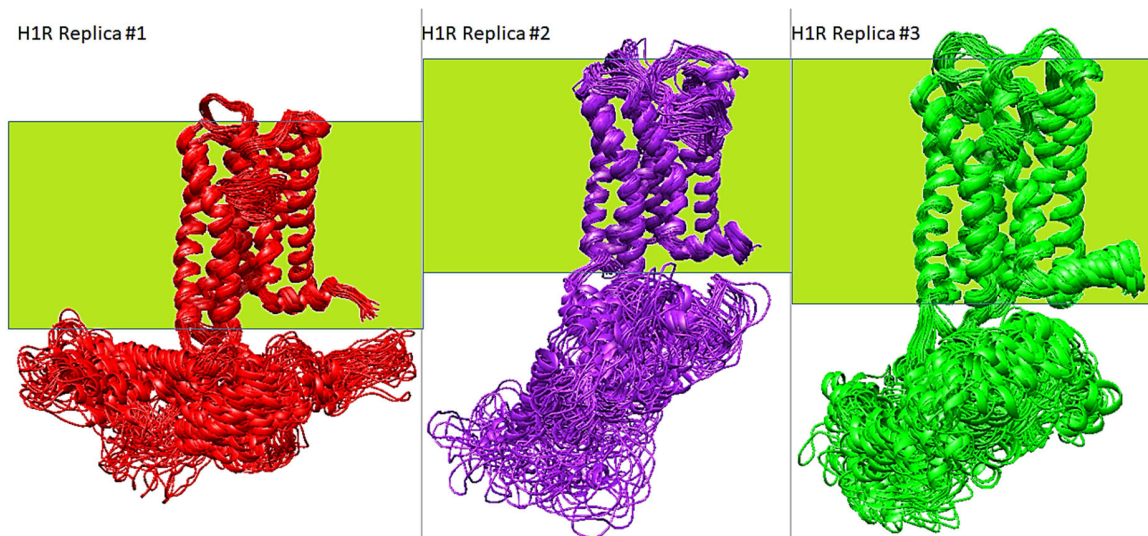


Figura 68. Estructuras proteicas alineadas con la herramienta MatchMaker de UCSF CHIMERA para la trayectoria de simulación de las tres réplicas del sistema H1-CLO. Se tomaron las estructuras cada 100 cuadros de simulación.

6.2 Caracterización de la bicapa lipídica

Debido a que el componente principal en la membrana era 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) con un 68%, se esperaba que la caracterización de ésta presentara valores similares a una membrana pura de fosfatidilcolina. Sin embargo, el área por lípido total fue $\sim 5 \text{ \AA}$ menor de lo esperado comparado los datos experimentales de membranas puras de POPC. A pesar de que los valores del área por lípido estuvieron dentro del rango esperado, si se consideran los datos experimentales de la POPE, el grosor de membrana en todas las simulaciones fue ligeramente mayor de lo esperado. Estos resultados cobran sentido al considerar el papel que juega el colesterol en las bicapas de fosfolípidos.

Existe un fenómeno que genera el colesterol, al que se le llama efecto de condensación, este efecto aumenta el grosor de las bicapas de fosfolípidos, además, este aumento está directamente correlacionado a un decremento en el área por lípido (Hung et al., 2007). En un estudio hecho por Meyer F. et. al., se simuló con dinámica de partículas disipativas a unas bicapas compuestas de dimiristoilfosfatidilcolina a distintas concentraciones de colesterol, con el fin de analizar el efecto de condensación. En este estudio se encontró que a mayores concentraciones de colesterol menor área por lípido y además observaron un ordenamiento y refuerzo en las colas lipídicas. Esto se debe a la estructura del colesterol el cual está conformado por anillos esteroides que pueden interaccionar, de manera atractiva, con los grupos metilos y metilenos de las colas hidrofóbicas de la POPC y POPE.

Con el fin de demostrar que el colesterol es el responsable por el engrosamiento de las bicapas lipídicas, se hicieron mapas de superficie con el grosor promedio de la bicapa lipídica y se superpusieron las posiciones de los colesteroles en ambos lados de la membrana (Anexo H). En estos se puede observar que donde hay mayor engrosamiento de la membrana se observa una localización de moléculas de colesterol en ambos lados de la bicapa lipídica. Sin embargo, no hay evidencia del engrosamiento de la membrana en aquellos lugares donde hay colesterol en un solo lado de la bicapa. Por lo tanto, el engrosamiento promedio que se encontró en las simulaciones está mediado por el entrecruzamiento de colesterol entre ambas colas hidrofóbicas de los lípidos cara a cara en la bicapa como se muestra en la Figura 72, en esta se observa que la distancia entre los fosfatos de los lípidos dispuestos cara a cara en la bicapa lipídica corresponde a los valores promedio del grosor de membrana a lo largo de la simulación. En conclusión, el alto porcentaje de colesterol relativo a los datos experimentales en las membranas compuestas de POPC y POPE es el responsable del engrosamiento y ordenamiento de los lípidos en las membranas de todos los sistemas simulados por efecto de condensación, al tomar esto en consideración todas las características medidas en esta simulación mostraron características dentro del rango esperado.

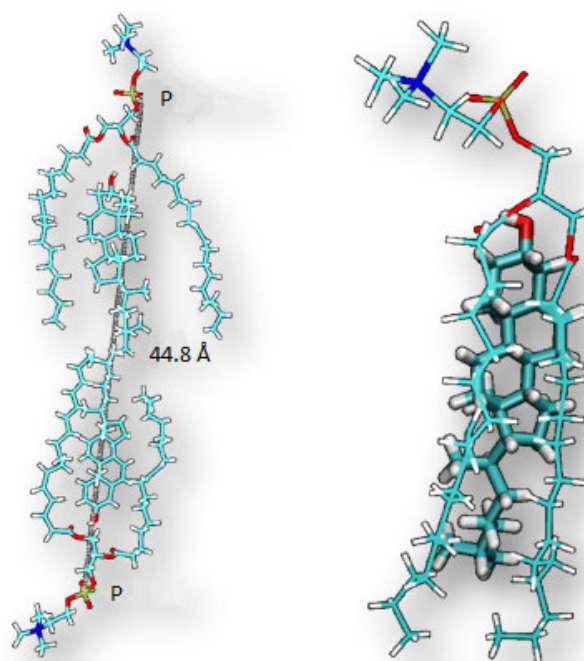


Figura 69. Estructuras de colesterol y POPC tomadas de la conformación más representativa de la dinámica de simulación del complejo D2R-E. Como se muestra en la imagen de la izquierda la distancia entre los fosfatos de los lípidos dispuestos cara a cara en la bicapa lipídica corresponde a los valores promedio medidos del grosor de membrana a lo largo de la simulación. A la derecha se puede observar a uno de los colesteroles en interacción con una molécula de fosfatidicolina, como muestra de la forma en la que estas moléculas pueden estar en interacción.

6.3 Determinación de los estados conformacionales en las dinámicas

Todas las conformaciones en las simulaciones estuvieron dentro de la categoría de inactivas, según la distancia entre la GLU6.30 y la ARG3.50, así como la energía interacción no enlazante y el RMSD de los motivos conservados NPxxY. No obstante, no todas se comportaron de la misma manera.

El puente salino característico de la fase inactiva se formó para los complejos D2R-E y D2R-A y un pequeño porcentaje del sistema H1-CLO. En los análisis del sistema H1-CLO se mostró un agrupamiento de estructuras que presentaron energía no enlazante inferior a los -120 Kcal/mol. Estas energías corresponden a una distancia inferior a los 4.2 Å entre las especies moleculares que conforman el puente salino GLU6.30-ARG3.50 (Figura 75).

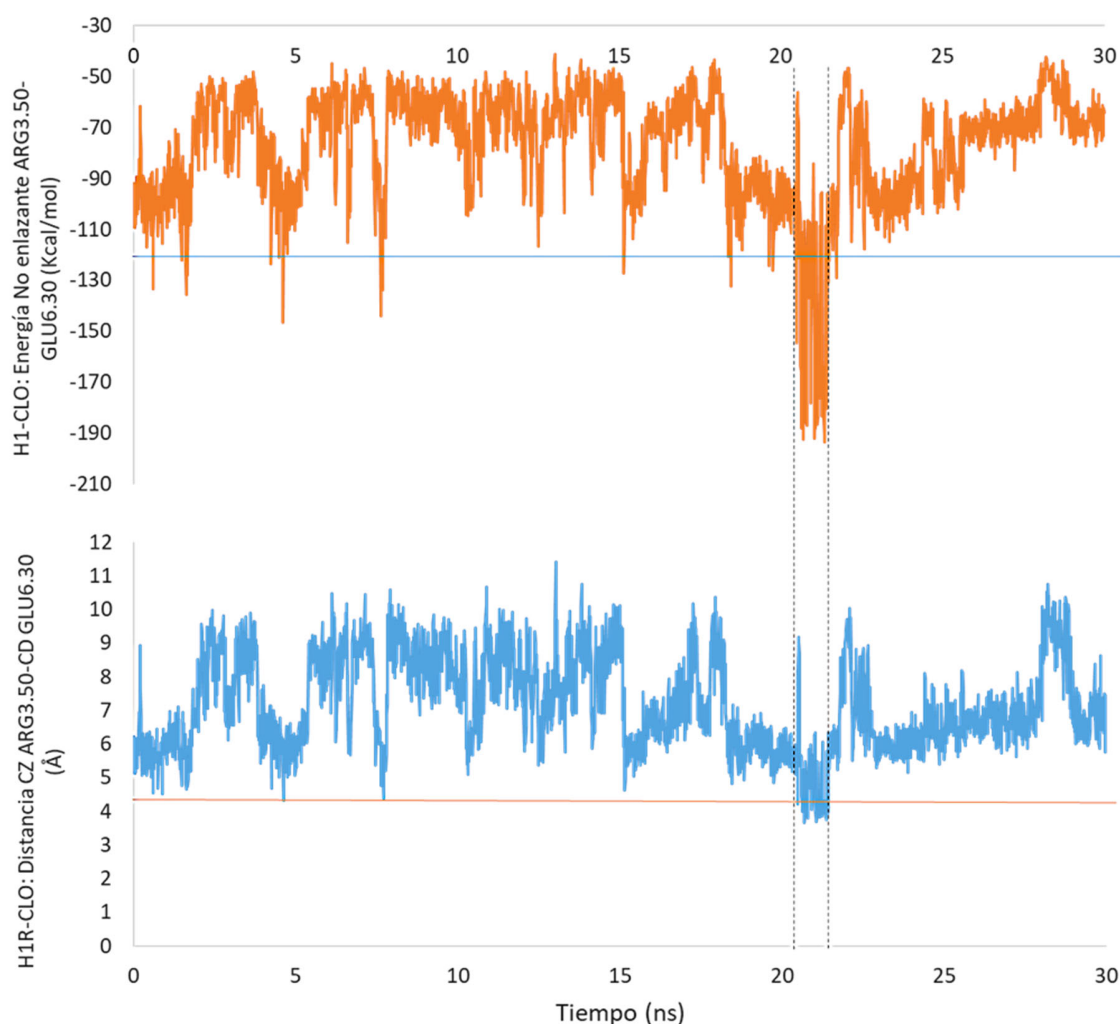


Figura 70. Correspondencia entre la energía no enlazante de los residuos ARG3.50 y GLU6.30 y la distancia entre los átomos CZ y CD de los residuos respectivos en la trayectoria de producción del sistema H1-CLO.

Además de lo anterior, se formó un enlace de hidrógeno entre la tirosina del motivo NPxxY y la D2.50 en los ensayos de dinámica molecular de los complejos D2R y H1-CLO, respectivamente. Esta interacción es característica de una conformación inactiva (Mahoney J., 2016), esto apoya los resultados de las figuras 35 y 49 que indican la inducción a la conformación inactiva clásica en los sistemas mencionados.

Para poder categorizar farmacológicamente la actividad que tiene la clozapina sobre estos receptores es necesario compararla con la actividad constitutiva de éstos, debido a que es el punto de referencia para dictaminar que tipo de actividad ejerce un ligante sobre el receptor. Por ejemplo, si un receptor se activa constitutivamente y la unión de una molécula lo induce a una conformación inactiva e impide que este se vuelva a activar, entonces dicha molécula es un agonista inverso, pues baja la actividad por debajo de la

basal. Los resultados en este trabajo muestran que ningún receptor entra en estado activo en ausencia de ligante. Los datos bibliográficos, por su parte, reportan una alta actividad constitutiva en el receptor H1, lo que implica que este receptor adopta distintas conformaciones intermedias entre un estado y otro (Bakker et al., 2000). Para el caso del receptor D2 existe evidencia contradictoria sobre su actividad basal, por lo que no hay información experimental concluyente (Zhang et al., 2014).

Los receptores no tuvieron estados activos ni transitorios debido a que a que la activación de las GPCRs requiere de una proteína G acoplada, esto se demuestra en cristales de GPCRs a los que se les unieron agonistas y aun así las estructuras preservan una conformación inactiva (e.gr. “receptor adrenérgico-2 unido a el BI167107”, “receptor adrenérgico-1 unido a isoproterenol”) (Gonzalez et al., 2014). En este trabajo no se incluyó a dicha proteína y es por esto que las conclusiones se limitan a aseverar que los receptores D2 y H1 no alcanzan un estado de activación en ausencia de ligante y proteína G acoplada.

Una interacción observada y que no ha sido descrita previamente en la literatura, es el enlace de hidrógeno entre la ARG3.50 y la TYR7.48 en la simulación del receptor H1 sin ligante. Para investigar que tan común es que se presente este tipo de interacciones se tomaron los 5 controles y se midieron las distancias entre estos residuos, Figura 76

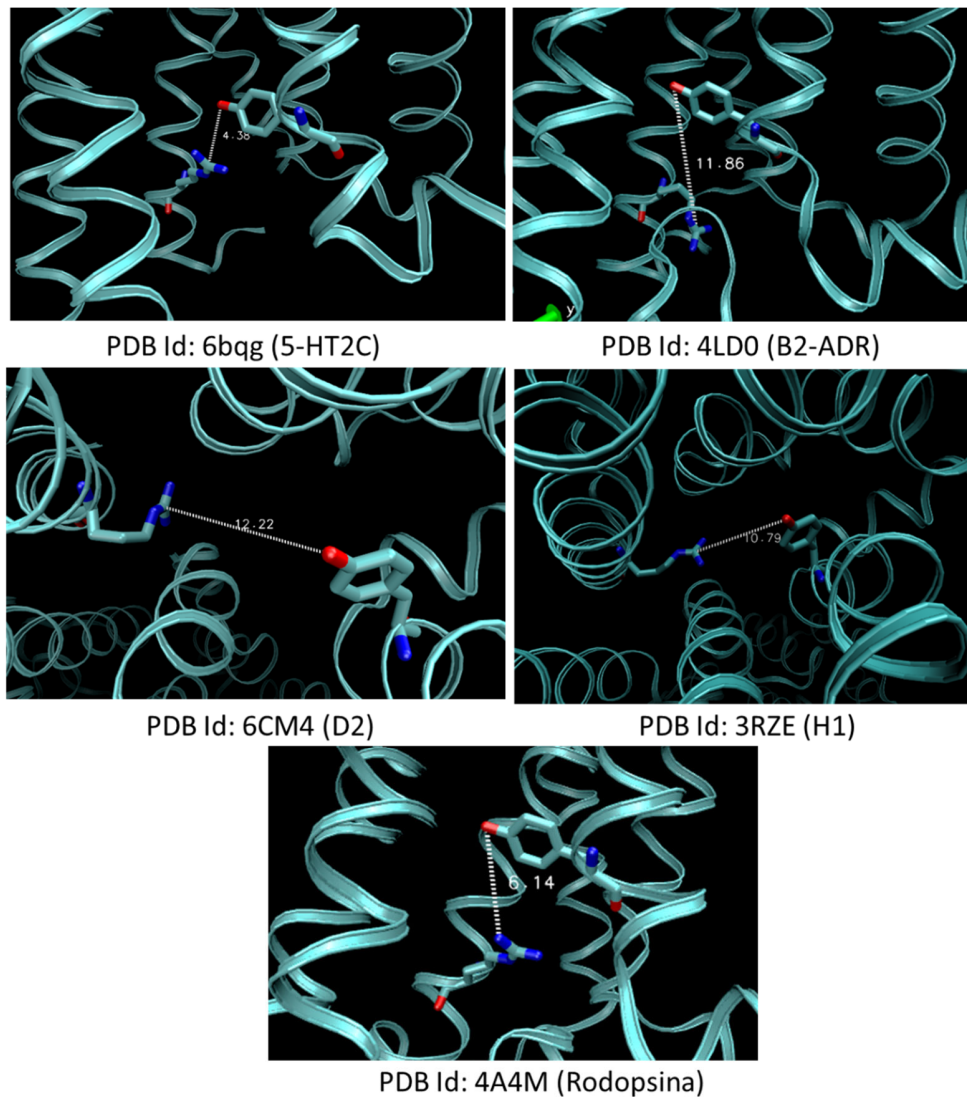


Figura 71. Distancias entre las especies atómicas involucradas en la formación de una interacción no enlazante entre los residuos ARG3.50 y TYR7.48 en cinco cristales de GPCRS de la clase A: El receptor D2, H1, Rodopsina, B2-ADR y 5-HT2C.

La corta distancia de la ARG3.50 y la TYR7.48 en los cristales de rodopsina activada con luz y el receptor 5-HT2C también en fase activa muestra la posible formación de enlaces de hidrógeno entre estos residuos. El hecho de que el receptor H1 haya presentado estas interacciones presentes en GPCRs activas, indica un posible estado intermedio. Esto apoya la idea de que el receptor H1 presente estados transitorios sin necesidad de un ligante. En conclusión, el receptor H1 presenta estados transitorios constitutivamente por lo que se puede considerar que la clozapina es un agonista inverso para el receptor H1, ya que lo induce a una conformación inactiva clásica. Por otro lado, la simulación del receptor D2 sin ligante mostró un estado clásico de inactivación, de igual manera a lo observado en la simulación del receptor D2 con la

clozapina. Este resultado, estaría sugiriendo que la clozapina es un antagonista neutro para el receptor D2.

6.4 Cálculos de energía libre por: MM/GBSA, MM/PBSA, ADT4 y FEP

El flujo de trabajo que se siguió para cumplir el objetivo general, que fue proponer un derivado de la clozapina sin efectos sobre el receptor H1, comenzó con cálculos de energía libre con solvatación en continuo para las simulaciones de los receptores con la clozapina, con la finalidad de identificar los residuos que contribuyen significativamente a la unión con el ligante, para de ahí proceder a los cálculos de acoplamiento molecular con ADT4 y finalmente calcular con el método de perturbación de energía libre (FEP) en NAMD las diferencias de afinidad con respecto a la interacción de cada receptor con la clozapina. La discusión estará estructurada en orden de acuerdo al flujo descrito.

El método de MM/PBSA mostró mayores diferencias de energía potencial no enlazante para cada residuo que el método de MM/GBSA. En consecuencia, hubo un mayor número de residuos que resaltaron dentro de la categoría de esenciales para la interacción de los ligantes con los receptores y las energías totales muestran una afinidad mayor de la clozapina por el receptor D2, en una proporción de 1.28 veces más que la afinidad para el receptor H1, en comparación de 1.17 por el método de MM/GBSA. De acuerdo a ADT4, la proporción de afinidad entre los receptores D2 y H1 tendió a ser similar (1.06 ~1). Al tomar en cuenta que los métodos de solvatación son más precisos que el acoplamiento molecular (Zhang J. et. al., 2017), entonces los resultados de ADT4 indican que, aparentemente, este método no es útil si se busca discriminar por energía de afinidad entre un mismo ligante y los receptores con gran similitud estructural. Además, para determinar que método de solvatación en continuo es mejor para este caso, la diferencia entre un método y otro se reduce en el cálculo de los términos de solvatación polar, ya que el cálculo del término de solvatación no polar no se incluyó para el método MM/PBSA. El método que se eligió para calcular MM/GBSA fue el desarrollado por Onufriev y Case con parámetros de α , β , y γ de 1.0, 0.8 y 4.85, el cual es el método que arroja valores más congruentes con MM/PBSA según el manual de amber16 (Case D.A. et. al., 2005). Diversos estudios han demostrado que MM/PBSA da valores más precisos que MM/GBSA, no obstante MM/GBSA es mejor discriminando cualitativamente entre ligantes muy distintos entre sí (Genheden & Ryde, 2015; Hou et al., 2011). En este trabajo se probó al mismo ligante con receptores muy similares, por lo que se optó por considerar a los resultados de MM/PBSA como más exactos. No obstante, debe considerarse una diferencia sustancial entre los métodos que es el radio de

prueba; este fue de 0.6 para MM/GBSA y 1.4 para MM/PBSA. Para poder precisar la diferencia de energía libre, debida al método como tal, debe usarse el mismo radio de prueba, además de no omitir el cálculo de la contribución polar para MM/PBSA. Para ello se corrió el programa MMPBSA.py con un radio de prueba de 1.4 para ambos métodos y se consideró la contribución no polar para el sistema D2R-E. Los resultados muestran una diferencia en el cambio de energía libre total de 0.11 al modificar el radio de prueba en MM/PBSA. Así mismo, la diferencia en el cambio de energía libre total con MM/GBSA fue de 0.021. Además, se pueden observar los resultados desglosados para cada residuo en la tabla 10. En esta se muestra que el radio de prueba no contribuye significativamente a la discordancia de contribuciones polares entre ambos métodos ya que la diferencia en los resultados de la solvatación polar entre un radio y otro, está en el orden de las centésimas.

Tabla 10. MM/GBSA del sistema D2E usando un radio de prueba de 1.4 en vez de 0.6 que fue el utilizado en el método. Se tomaron valores cada 50 cuadros de simulación.

Residuo	v. d. Waals	Electr.	Sol. polar	Sol. No Polar	TOTAL		
	Kcal/mol	Kcal/mol	Kcal/mol	Kcal/mol	Kcal/mol	De. Estdr.	Error
VAL 83	-0.417	-1.418	1.429	-0.021	-0.429	0.219	0.029
ASP 86	-0.366	-44.076	47.757	-0.182	3.135	1.024	0.136
VAL 87	-1.126	0.247	-0.323	-0.106	-1.309	0.229	0.030
CYS 90	-1.360	1.602	-1.515	-0.150	-1.423	0.284	0.038
PHE 161	-0.639	0.217	0.052	-0.099	-0.469	0.117	0.015
SER 165	-1.170	-0.853	1.209	-0.161	-0.975	0.377	0.050
SER 166	-0.679	-0.906	1.396	-0.107	-0.295	0.283	0.038
SER 169	-0.770	0.157	0.475	-0.090	-0.229	0.305	0.040
PHE 170	-0.961	0.370	-0.064	-0.055	-0.709	0.250	0.033
PHE 354	-0.432	-0.266	0.517	-0.046	-0.226	0.146	0.019
TRP 358	-2.377	-0.871	2.726	-0.128	-0.651	0.387	0.051
PHE 361	-1.327	0.534	-0.068	-0.208	-1.070	0.316	0.042
PHE 362	-2.833	0.243	0.647	-0.320	-2.262	0.377	0.050
HSD 365	-0.860	-0.848	1.269	-0.084	-0.524	0.181	0.024
ILE 366	-0.372	0.033	0.114	-0.045	-0.270	0.144	0.019
TYR 388	-0.662	0.508	-0.045	-0.040	-0.238	0.251	0.033

En conclusión, al menos para un ligante cargado como es la clozapina y un receptor GPCR con sitios activos medianamente ricos en residuos polares, el radio de prueba no aporta diferencias significativas en el cálculo de la contribución polar del solvente, esto se puede corroborar comparando la tabla en la figura

47 con los datos en la tabla 10. Así mismo, la contribución no polar del solvente está en el orden de las décimas. Esto indica que las diferencias entre las contribuciones polares de MM/GBSA y MM/PBSA se deben necesariamente a los métodos como tal.

A continuación, se describe cómo es la interacción de los residuos que presentaron mayores valores de afinidad o repulsión según ambos métodos. En las siguientes imágenes se muestran en amarillo los residuos significativos según MM/PBSA, en azul cian los de MM/GBSA, en verde los indicados por ambos métodos y en naranja a la clozapina. En las figuras 77 y 78 se presenta la vista de los residuos cercanos al halógeno, para el caso del sistema D2R-E, donde se puede ver que el anillo halogenado está cercano a la PHE362. De acuerdo a la posición de los anillos en la estructura más representativa, el tipo específico de interacción es de apilamiento π - π paralelo desplazado (Sponer J., et. al, 2006), Figura 77. Esto explica por qué la contribución de VdW fue de -2.833 Kcal/mol.

Es importante resaltar que las contribuciones a las interacciones π - π se han incluido implícitamente en los parámetros de VDW de los campos de fuerza de AMBER y son suficientes para reproducirlas debidamente (Yang Z., Wang Z., 2012).

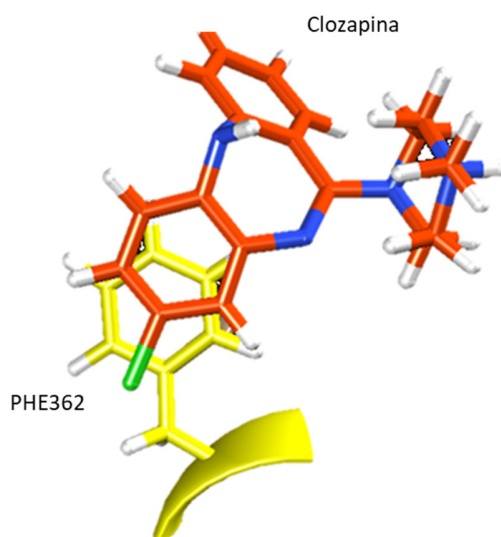


Figura 72. Apilamiento tipo paralelo desplazado entre unos de los anillos aromáticos de la clozapina y la cadena lateral de la fenilalanina 362, en el sistema D2E.

Por otro lado los halógenos pueden formar interacciones tipo π -halógeno (Wilcken et al., 2012). Este tipo de enlace es descrito como una interacción no covalente entre un halogenuro con una región electrofílica y una base de Lewis. Sin embargo, en dependencia del ángulo entre las especies atómicas, puede darse el caso opuesto, es decir que la región nucleofílica del halógeno interaccione con un ácido de Lewis (Lin F., Mackerell A., 2017). Este último caso es el único posible en las simulaciones hechas en este trabajo, pues no se incluyó el término correctivo para la carga σ , de modo que no hay polaridad en el halógeno, este actúa solo como nucleófilo. El tipo de fuerzas que originan la interacción de tipo X- π es la combinación de interacciones electrostáticas y de dispersión de London (Youn, S., Kim, D. Y, 2016). Existe gran discusión actualmente, sobre cuál de estas dos fuerzas es el que contribuye de manera más importante. De acuerdo a nuestros resultados, el principal aportador de la fuerza atractiva entre estas dos especies moleculares es la de VdW en donde se incluyen las fuerzas de London. Esto va de acuerdo a Matter et al. quienes informaron que la interacción de dispersión es la fuente principal de atracción (Matter, H. Nazar, M. et.al., 2009).

En conclusión, ambas interacciones, π - π y π -Cl están contenidas en el término de VdW para la PHE362 lo que explica por qué este residuo es esencial para poder comprender la afinidad de la clozapina por el receptor D2.

Para el caso de los residuos cercanos al halógeno en el sistema H1-CLO está la VAL187, la PHE190 y la TYR108 y la LEU104. La PHE190 forma una interacción π - π tipo T con el anillo aromático que contiene al cloro, la misma discusión de los párrafos anteriores aplica en este caso, así mismo la contribución según MM/PBSA está en su mayoría implícita en el término de VdW. Mientras que la suma de las aportaciones de la energía electrostática, de VdW y una baja contribución polar de solvatación hace que la VAL187 tenga una energía total atractiva sobre el cloro de la clozapina, específicamente son los hidrógenos con una carga ligera positiva las que interactúan con la carga negativa del cloro. La LEU104 contribuye, principalmente, por interacciones de VdW con el anillo aromático de la clozapina que contiene al halógeno. Finalmente, la TYR108 contribuye significativamente por VdW, debido a la cercanía que tienen los hidrógenos del anillo de la cadena lateral hacia algunos de los aminos de la clozapina se puede categorizar a esta como una interacción como dipolo-dipolo inducido.

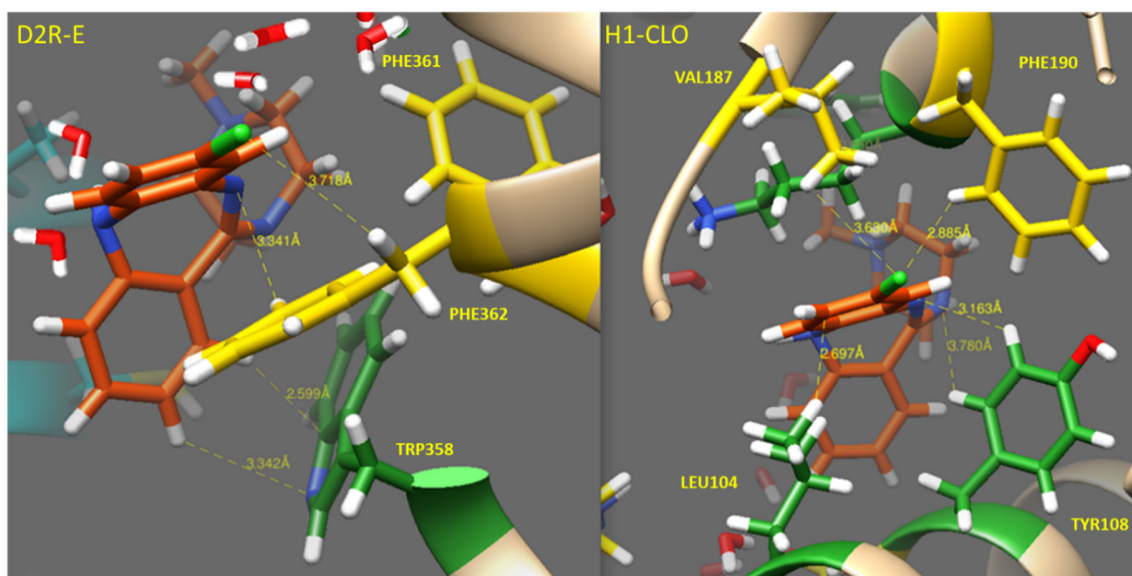


Figura 73. Residuos principales de interacción con la clozapina según los métodos de solvatación en continuo. Vista enfocada en el halógeno de la clozapina. En amarillo se indican los señalados según MM/PBSA, en azul cian por MM/GBSA y en verde por ambos métodos. La clozapina se indica en naranja. Las distancias son útiles como referencia.

En cuanto a los residuos principales alrededor del anillo de la piperazina en la clozapina, en el caso del sistema D2R-E, uno de los más interesantes es el residuo conservado ASP86, el cual forma un puente salino con el grupo amino cargado positivo de la piperazina. La diferencia total de energía de interacción para este residuo es de -20 Kcal/mol por el método de MM/PBSA y de 3.31 Kcal/mol por el método de MM/GBSA, esta discordancia se mantiene para los cálculos de este residuo en el sistema H1-CLO. En el caso del último sistema mencionado, el grupo carboxilo forma enlaces de hidrógeno con los protones de los carbonos 8 y 9 de la clozapina y la contribución total de energía según MM/PBSA es de -11.97 Kcal/mol y de tan solo 0.795 Kcal/mol con MM/GBSA; a partir de esto último se puede argumentar que es la forma en la que el método de PB y GB calculan la contribución polar del agua la que causa tal discordancia. Al observar de cerca a todas las especies moleculares que rodean al ácido aspártico, residuo conservado del sitio activo en ambos receptores, se encontraron determinadas moléculas de agua que causan interferencia en la interacción con el ligante, Figura 79. Aunque estas moléculas de agua interfieren transitoriamente, el programa MMPBSA.py se alimenta de cuadros cada determinado intervalo, algunos de estos contienen moléculas de agua en posiciones muy cercanas al ácido aspártico, por lo que el cálculo de la energía libre aparece como una interacción repulsiva para el ligante. Por eso el valor de la energía libre, para la solvatación polar, resulta positivo y se refleja en un aumento considerable a los términos de ΔG total que en el caso de MM/GBSA es mucho mayor que MM/PBSA, porque es más deficiente.

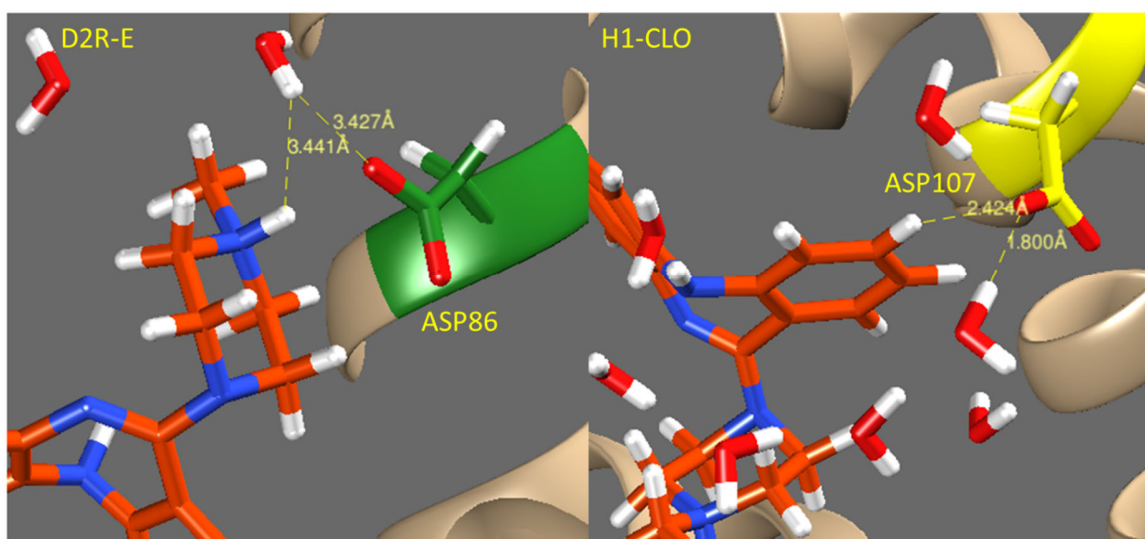


Figura 74. Interacción del residuo de aspartato con la clozapina, para los sistemas D2R-E a la izquierda y H1-CLO a la derecha. Además se pueden observar algunas moléculas de agua muy cercanas a los átomos que figuran en la interacción, las cuales pueden causar interferencia en la misma.

Otras interacciones que resaltan en la región de la piperazina en el sistema D2R-E son la VAL83 indicada por ambos métodos, cuya interacción principal es dipolo-dipolo inducido entre el carbonilo de la cadena principal de la valina y los hidrógenos del metilo unido a la piperazina. La CYS90 promovida como significativa únicamente por el método de MM/GBSA, contribuye negativamente por interacciones de VdW y la solvatación polar, forma un enlace de hidrógeno entre el azufre de la CYS90 con el protón del carbono 14 (Gregoret L. M, 1991). Otra interacción importante en el sistema D2R-E es la TRP358 en la que está involucrada la formación de interacciones dipolo-dipolo inducido entre el hidrógeno del carbono 5 del residuo y el grupo amino de la piperazina que une a la diazepina y el protón del carbono 9 y el grupo amino de la cadena lateral del triptófano, además de una interacción π - π tipo T entre el benceno del triptófano y el benceno de la clozapina que no contiene al cloro. Otro residuo es la PHE361, cuya cadena lateral forma interacciones de VdW con la piperazina del ligante. Además, la PHE170 que está colocada justo debajo de la diazepina forma una interacción π - π con esta (Figura 80).

En el sistema H1-CLO, la PHE435 contribuye significativamente por interacciones de VdW de la cadena lateral con el grupo metilo de la clozapina.

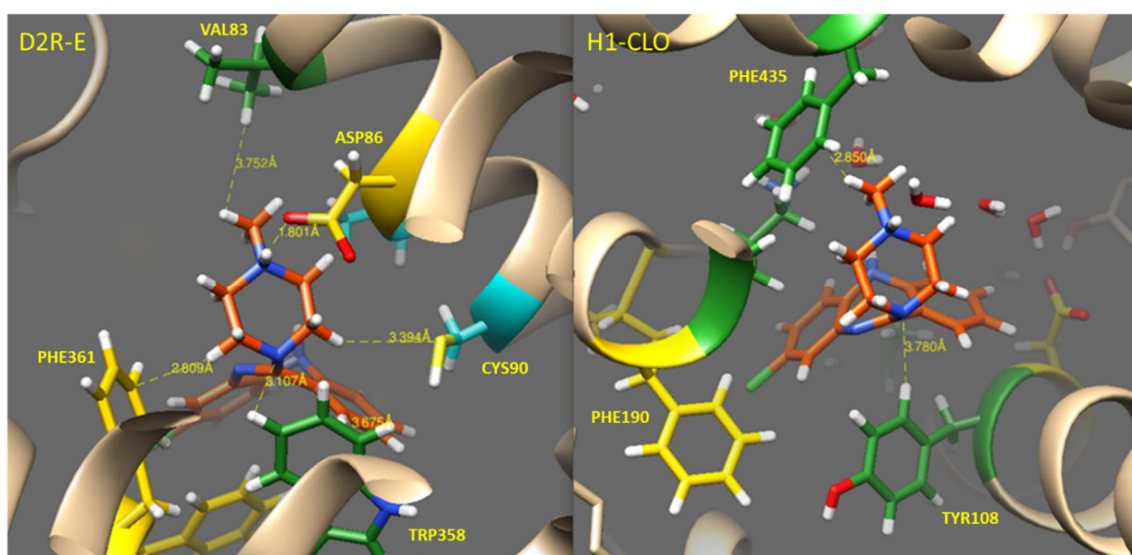


Figura 75. Residuos principales de interacción con la clozapina según los métodos de solvatación en continuo, vista enfocada en la piperazina de la clozapina. En amarillo se indican los señalados según MM/PBSA, en azul cian por MM/GBSA y en verde por ambos métodos. La clozapina se indica en naranja.

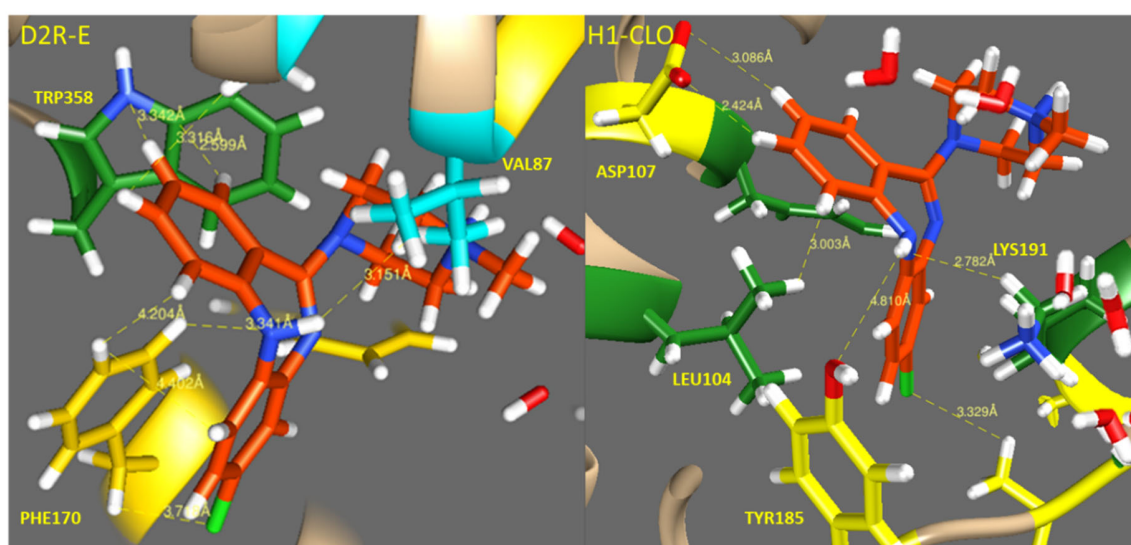


Figura 76. Residuos principales de interacción con la clozapina según los métodos de solvatación en continuo, vista enfocada en la diazepina de la clozapina. En amarillo se indican los señalados según MM/PBSA, en azul cian por MM/GBSA y en verde por ambos métodos. La clozapina se indica en naranja.

Como parte del método se identificaron zonas en la clozapina circundadas con ambientes químicos diferentes. Una de estas zonas fue aquella que rodea a los carbonos 8 al 10 de la clozapina, como se puede observar en la figura 52, los protones del carbono 9 y 10, en el sistema H1-CLO, forman enlaces de hidrógeno con el grupo carboxilo del ácido aspártico 107, un residuo polar, además de otros tres residuos polares a distancias de entre 4 y 5 Å, la TYR185, la LYS179 y la TYR458. Mientras que alrededor de estos

misimos carbonos en el sistema D2R-E, hay múltiples residuos aromáticos y un solo residuo polar cercano al carbono 8 que es la SER197, los residuos aromáticos más cercanos son la tripsina 358 cerca del carbono 10 y la fenilalanina 170 cercana al carbono 8, así mismo hay otros residuos no polares un poco más alejados como la PHE362, la PHE390 y la PHE198. Se decidió probar con metilaciones en los carbonos 8, 9 y 10 con el fin de disminuir la afinidad del ácido aspártico con el benceno del ligante en el sistema H1-CLO sin alterar la interacción con los residuos aromáticos del sitio activo del D2. Los resultados con ADT4 muestran afinidades que se acercan a este objetivo para la metilación en el carbono 8, pero los resultados de FEP no. Este último indica que, a pesar de la pérdida de afinidad por el receptor H1, la pérdida de afinidad es 1.5 veces mayor por el receptor D2 que el H1. Esto se debe a que el carbono del metilo agregado queda más cercano a las cadenas principales de la SER197 y la SER193 y es repelido principalmente por interacciones de VdW, específicamente con los hidroxilos de la cadena principal que están muy cercanos a este; el valor promedio de VdW entre el metilo y el hidroxilo de la SER197 es de +26 Kcal/mol y entre el metilo y el hidroxilo de la SER193 es de +11 Kcal/mol, de acuerdo a la herramienta *NAMD energy*.

Debido a la ubicación del halógeno en los sitios activos, en donde el extremo de la clozapina en el sistema D2 está orientado hacia afuera del grupo de hélices intermembranales, mientras que en el receptor H1 está rodeado por las hélices 3, 4 y 5, se da la posibilidad de modificar al halógeno libremente para modificar la afinidad por el receptor H1, sin afectar la que tiene por el D2, Figura 82. Por lo que se decidió probar con ADT4 y FEP las afinidades con los halógenos flúor, bromo e iodo.

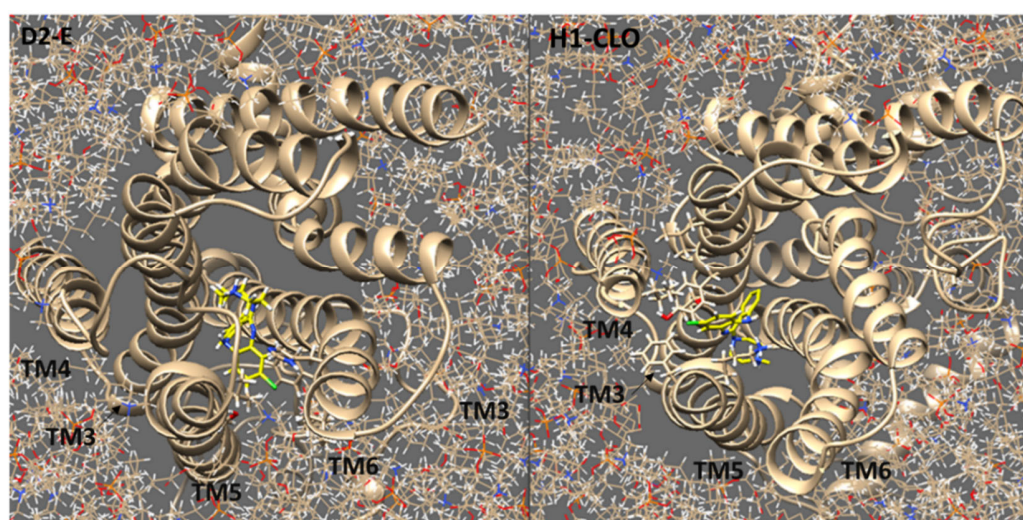


Figura 77. Vistas de profundidad de la posición de la clozapina en los receptores D2. A la izquierda, y al receptor H1, a la derecha, en verde se observa el átomo del cloro que está orientado hacia la membrana en el receptor D2, entre las hélices 5 y 6. Mientras que el halógeno se encuentra entre las hélices 3 al 5 en el receptor H1.

Los resultados para ADT4 muestran que el mejor candidato es la metilación en el carbono 8 en combinación con el cambio del cloro por el yodo. Por otro lado, el mejor candidato de acuerdo al método de perturbación química no es el mismo (FEP). Es importante considerar el cambio de posición para cada candidato en el sitio activo con ambos métodos, pues esta es determinante en el cálculo de energía libre. Las posiciones finales de los candidatos con ambos métodos, acoplamiento molecular y FEP, variaron muy poco para el caso del receptor H1. Sin embargo, los candidatos probados con el receptor D2 adoptaron posiciones distintas entre ambos métodos. Lo último provoca que los resultados entre FEP y ADT4 sean incongruentes entre sí. Por otro lado, si se clasifica a los candidatos probados en el receptor H1 de acuerdo a la pérdida de afinidad por este receptor con ADT4, se encuentra que ambos métodos indican que los mejores candidatos son el cambio del cloro por el yodo, seguido de la metilación en el carbono 8. No obstante, no existe concordancia entre el resto de los candidatos. Al considerar que los métodos de perturbación química son más confiables, además de que las diferencias de energía del resto de los candidatos están en el orden de decimales, se puede concluir que ADT4 es útil discriminando entre diferencias de energía libre complejo-ligante de por lo menos 1 Kcal/mol para sistemas donde los ligantes son similares.

Los resultados de FEP para los halógenos indican que el yodo se acerca más al objetivo de este trabajo, seguido del bromo y luego el flúor. Este orden va de acuerdo a la pérdida de electronegatividad de los halógenos, esto significa que conforme menor es la carga del halógeno mayor pérdida de interacción hay con el sitio activo del receptor H1.

Se midieron las energías de interacción entre el cloro y el yodo para cada residuo cercano al halógeno de las simulaciones de FEP para ambos receptores con la herramienta *NAMD energy* con el fin de identificar los residuos clave en la interacción. La herramienta de *NAMD energy* no está diseñada para simulaciones químicas, por lo que mide la interacción para ambos halógenos de principio a fin en la simulación y no toma en cuenta que en FEP los únicos datos útiles son la energía del átomo o los átomos a modificar en $\lambda = 0$ y las especies moleculares mutadas en $\lambda = 1$. Los datos útiles que arrojó esta herramienta son, por lo tanto, la energía de interacción del cloro en el primer cuadro de simulación y la del yodo al último cuadro de simulación. En la Tabla 11, se indican estos valores y la diferencia entre estos en total y desglosada en interacciones no polares y electrostáticas. Debe tenerse en cuenta que esta herramienta calcula la energía potencial de interacción y no la energía libre de afinidad, por lo que estos datos son útiles cualitativamente.

Tabla 11. Energías potenciales de interacción no enlazante entre residuos cercanos al átomo modificado en FEP para los sistemas H1 y D2.

H1									
Residuo	$E_{Cl/\lambda=0}$ Total	$E_{I/\lambda=1}$ Total	ΔE_T	$E_{Cl/\lambda=0}$ Elec.	$E_{I/\lambda=1}$ Elec.	ΔE_{Elec}	$E_{Cl/\lambda=0}$ vdW.	$E_{I/\lambda=1}$ vdW.	ΔE_{vdW}
VAL187	-0.35	1.71	1.36	0.069	-0.057	-0.12	-0.50	1.76	2.26
ILE162	-0.87	2.10	1.24	-0.10	-0.17	-0.07	-0.77	2.28	3.06
PHE190	-1.35	-2.0	-0.66	-0.75	-1.66	-0.91	-0.60	-0.34	0.25
LYS191	-3.63	-2.0	1.62	-3.35	-1.66	1.00	-0.28	-0.01	0.27
D2									
Residuo	$E_{Cl/\lambda=0}$ Total	$E_{I/\lambda=1}$ Total	ΔE_T	$E_{Cl/\lambda=0}$ Elec.	$E_{I/\lambda=1}$ Elec.	ΔE_{Elec}	$E_{Cl/\lambda=0}$ vdW.	$E_{I/\lambda=1}$ vdW.	ΔE_{vdW}
PHE362	0.25	-1.14	-1.39	1.31	0.88	-0.43	-1.06	-2.02	-0.96
HSD365	-2.08	-1.30	0.78	-1.61	-0.57	1.043	-0.47	-0.73	-0.26
SER166	0.59	0.00	-0.58	0.74	0.49	-0.25	-0.15	-0.49	-0.33
ILE366	-0.91	-1.25	-0.33	0.45	-0.28	-0.73	-0.46	-0.97	-0.50

Las primeras dos columnas muestran la energía total y en la tercera columna se muestra la diferencia entre la energía para el iodo menos la energía para el cloro. En las columnas siguientes están las energías electrostáticas y de VdW para el cloro y el iodo y sus diferencias. Las unidades están en Kcal/mol.

El residuo del receptor D2 cuya contribución fue la que interacciona más significativamente con el iodo fue la PHE362. Cabe mencionar que este residuo fue identificado como uno de los más significativos en la interacción de la clozapina con los datos de MM/PBSA y MM/GBSA de la simulación del D2E. De acuerdo a los resultados, el cambio del cloro por el iodo, causa un incremento en la afinidad. Este incremento se debe principalmente a un aumento en la energía de VdW. Esto era de esperarse ya que al reducir la carga parcial en el halógeno se incrementan las interacciones no polares.

El resultado opuesto en menor intensidad se obtiene con la HSD365, ya que la disminución en la carga parcial del iodo genera una disminución en la interacción electrostática con los nitrógenos de la cadena lateral de la histidina.

Este mismo caso se presenta en el residuo clave del receptor H1 que interactúa con el iodo para disminuir la afinidad por el sitio activo es la LYS191. La disminución de la carga parcial en el cambio del cloro por el iodo hace que las interacciones electrostáticas se reduzcan entre los grupos aminos de la cadena lateral de la lisina. Además, la pérdida de afinidad por este residuo, se suma a las pérdidas por la VAL187 e ILE162,

que presentan diferencias ~ 1.2 Kcal/mol cada uno. Estas contribuciones positivas en la diferencia de las energías libres totales en suma, hacen que el incremento de afinidad por la PHE190 (-1 Kcal/mol) sea marginado.

La repulsión por los residuos VAL187 e ILE162 se deben a que estos residuos están más cercanos al halógeno ($\sim r < 3$ Å), por lo que al incrementar el radio de VdW con el cambio por el iodo el término repulsivo ($1/r^{12}$) en el potencial de LJ tiene un valor mayor, dando un cambio en la energía neta positivo (Figura 83).

Para el caso de la PHE190, el átomo más cercano al halógeno está a ~ 4 Å, por lo que el incremento en el radio de VdW no afecta su interacción. En este caso el término atractivo del potencial de LJ ($1/r^6$) contribuye mayoritariamente, esto aunado a una disminución de la carga parcial hace que las contribuciones no polares incrementen, dando como resultado una energía potencial neta negativa.

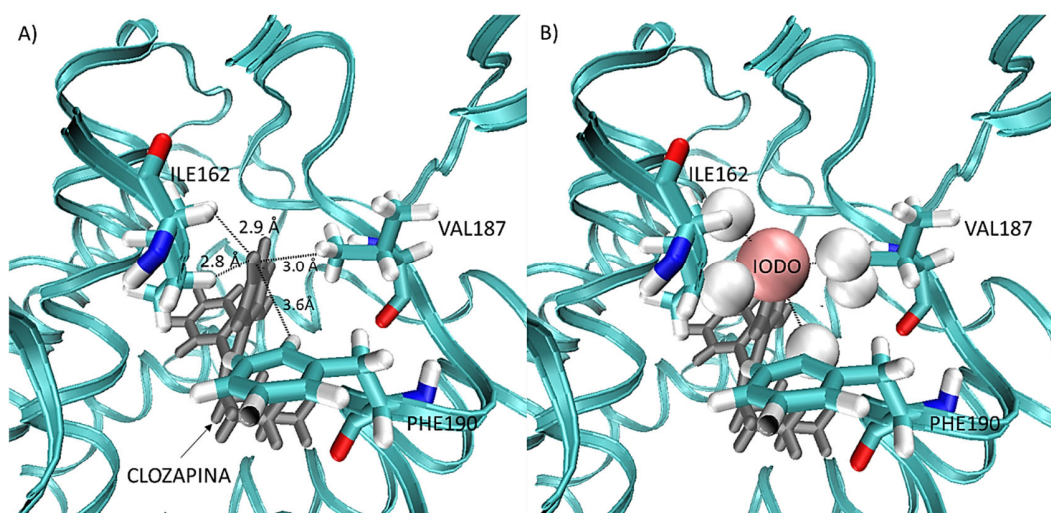


Figura 78. Residuos del receptor H1 más cercanos al átomo modificado en la clozapina. Al cambiar el cloro por el iodo, se aumenta el radio de VdW, esto causa que los átomos más cercanos sean repelidos, este es el caso de los hidrógenos en las cadenas laterales de la ILE162 y la VAL187, mientras que para átomos más alejados como los de la PHE190 el término atractivo del potencial que rige las interacciones no-polares es mayor.

En conclusión, este trabajo propone que para reducir los efectos cardiometabólicos adversos de la clozapina se debe reducir la electronegatividad del halógeno en esta, por lo que el mejor candidato es la sustitución del cloro por el iodo.

Esta sustitución garantiza la pérdida de afinidad por el receptor H1, al tiempo que se mantiene la afinidad por el receptor D2. Esto se debe a que el halógeno se posiciona hacia residuos polares en el sitio activo del H1, por lo que la reducción en la carga parcial disminuye la energía libre de afinidad. Por otro lado, el sitio activo del receptor D2 es rico en residuos no polares por lo que la disminución en la carga parcial del halógeno no afecta en la afinidad.

Además, se puede asegurar que los cálculos de FEP son altamente precisos por dos razones: la primera, es porque cumple con la *conditio sine qua non*, que demanda FEP sobre tener un sistema mutante muy similar al de referencia; la segunda, porque la distribución de probabilidades de la energía potencial ($U(x)$) para las transformaciones de ida y regreso en cada ventana de λ se superpone en la mayoría de estas para todas las modificaciones probadas en este trabajo.

Para explicar más a fondo lo anterior, en la práctica de FEP se monitorea la superposición y la varianza de los ensambles de configuraciones por cada intervalo de $\lambda \pm \partial\lambda$ (+, de ida y -, vuelta), también llamadas ventanas λ ; durante la transformación alquímica, dichos ensambles están incorporados en la densidad de estados $P_0[\Delta U(x)]$ y $P_1[\Delta U(x)]$, donde $\Delta U(x) = U_1(x) - U_0(x)$ denota la diferencia en la energía potencial de la modificación química y la estructura previa (Liu, P., et. al., 2012).

En las Figuras 84 y 85 se pueden observar las distribuciones de probabilidad para las 32 ventanas λ de las simulaciones de ida (indicadas en negro en la Figura 84 y 85) y vuelta (indicada en rojo en la Figura 84 y 85) de la modificación química del cloro por yodo en la clozapina para los receptores D2 y H1 respectivamente. Estas distribuciones son útiles para monitorear la varianza y la superposición de las distribuciones. Una varianza constante es indicio de resultados confiables, mientras que la superposición de las distribuciones a lo largo de la simulación permite identificar errores sistemáticos durante la simulación (Pohorille, A., et. al., 2010).

En la Figura 84 la varianza de las distribuciones de probabilidad es de ~ 0.2 Kcal/mol y se mantiene constante para la mayoría de las ventanas. Además, la superposición de las distribuciones incrementa considerablemente en las ventanas 9-32, lo que demuestra que no existen errores sistemáticos acarreados de ventanas anteriores. No obstante, en las ventanas 19 y 23 existe una superposición pobre tanto en la Figura 84, así como en la 85, esto se puede deber al acoplamiento de potenciales de suavizado en $\lambda=0.5$ y $\lambda=0.6$ que pudieron causar perturbaciones grandes en el sistema. Sin embargo, estas perturbaciones fueron estabilizadas conforme avanzó la simulación y esto se puede demostrar con superposiciones satisfactorios en las ventanas subsiguientes (20 y 24).

Para la distribución de probabilidades de la modificación química de cloro por yodo en el receptor H1 (Figura 85). Las distribuciones de ida y vuelta se superponen de forma satisfactoria a partir de la ventana 13. Las varianzas por otro lado no presentan un valor tan constante como las distribuciones para el receptor D2 y esto se refleja en el error asociado de ± 0.15 Kcal/mol para el H1 y ± 0.1 Kcal/mol para el D2. Lo anterior puede ser resultado del grado de perturbación que provocó la modificación química en el sitio activo del receptor H1, lo cual es reflejo del objetivo de este trabajo que es perder afinidad por este receptor, a diferencia de lo que se buscó en el receptor D2 que fue mantener la afinidad a pesar de la modificación química.

En conclusión, los cálculos de FEP para ambos receptores con la modificación química de cloro por el yodo en su ligante, tuvieron márgenes de error pequeños en ambos receptores, no existieron errores sistemáticos durante las simulaciones de FEP y las varianzas para cada ventana de λ oscilaron dentro de un rango de valores esperado. Por lo que se puede aseverar que los resultados son altamente confiables.

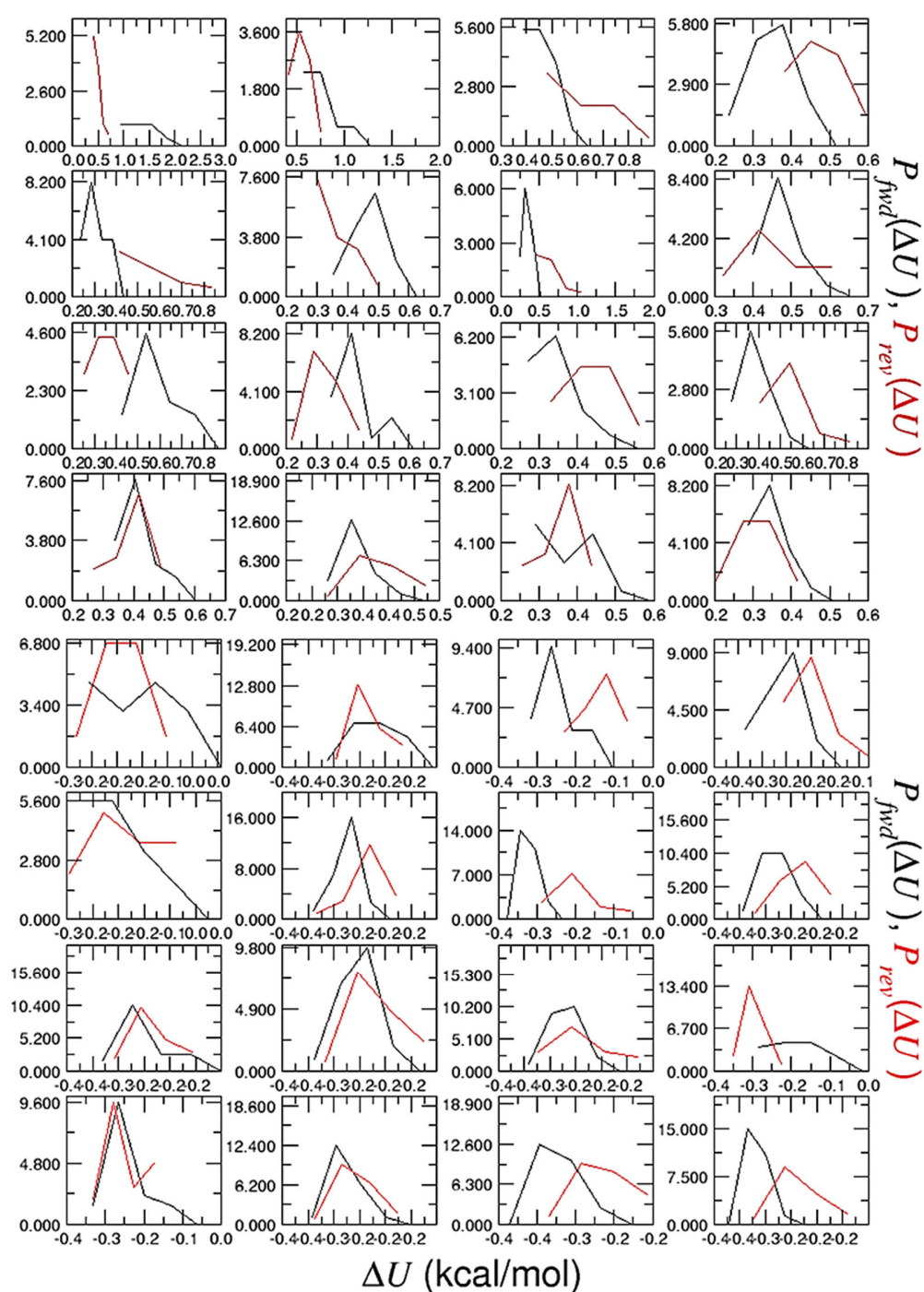


Figura 79. Distribución de probabilidades en función de la diferencia en energía potencial en Kcal/mol de los cálculos de FEP del cambio del cloro por yodo en la clozapina en unión con el receptor D2. En rojo se muestra la distribución para la simulación de regreso y en negro para la simulación de ida. Entre mayor es la sobreposición entre las distribuciones para cada cuadro, mayor precisión tendrá FEP.

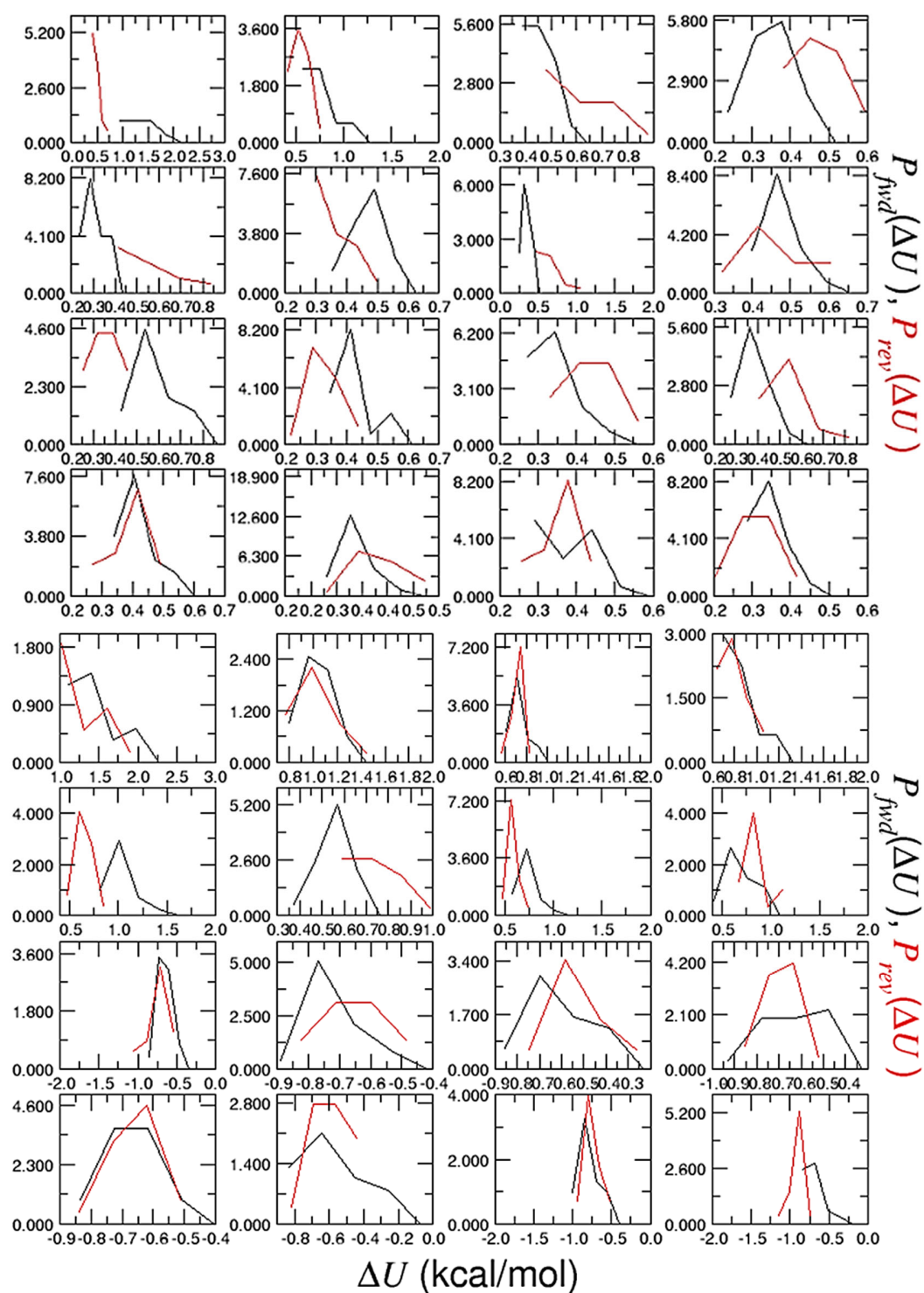


Figura 80. Distribución de probabilidades en función de la diferencia en energía potencial en Kcal/mol de los cálculos de FEP del cambio del cloro por yodo en la clozapina en unión con el receptor H1. En rojo se muestra la distribución para la simulación de regreso y en negro para la simulación de ida. Entre mayor es la sobreposición entre las distribuciones para cada cuadro, mayor precisión tendrá FEP.

Capítulo 7. Conclusiones

- El alto contenido de colesterol en los modelos, hizo que por efecto de condensación, la bicapa se volviera más gruesa y el área por lípido más chica para todos los componentes de la membrana.
- Todas las simulaciones mostraron conformaciones inactivas, no obstante, la clozapina indujo a los receptores D2 y H1 a adoptar conformaciones inactivas totales, es decir, se encontraron formaciones del puente salino DRY y la TYR7.48 se orientó hacia la TM2/TM7.
- Es posible que exista una conformación intermedia entre la fase activa e inactiva en el receptor H1 en la que la ARG3.50 forma un enlace de hidrogeno con la TYR7.48, esta posibilidad se sustenta en que la estructura en fase activa del receptor 5-HT2C presenta esta misma interacción.
- Los residuos principales de interacción de la clozapina ecuatorial y axial en el receptor D2 son la VAL87, ASP86, CYS90, TRP358, HIS365, PHE362; otros residuos de interacción importante para la clozapina ecuatorial son la VAL83, PHE354, PHE170, SER169, SER165, ILE366; y para la clozapina axial la TYR380.
- Los residuos principales de interacción de la clozapina para el receptor H1 son la LEU104, ASP107, ILE162, TYR185, VAL187, LYS191, THR194, y la TYR431.
- La modificación química de cloro por el yodo reduce la afinidad electrostática con la LYS191 del H1, al tiempo que incrementa la interacción no polar con la PHE362 y la ILE366.
- El cálculo en la diferencia de energía libre por acoplamiento molecular no arrojó valores congruentes con los de método de perturbación de energía libre para los candidatos probados en el receptor D2 debido a que los modos de unión fueron muy distintos entre estos métodos. No obstante debido a que los modos de unión de los candidatos en el receptor H1 fueron casi los mismos entre ambos métodos, ambos indicaron que la modificación química de cloro por yodo es el que pierde mayor afinidad por este receptor.
- La modificación del radio de prueba y la inclusión del cálculo del termino de solvatación no polar en los cálculos de MM/PBSA y MM/GBSA no contribuye significativamente en los cálculos de afinidad entre un ligante cargado y un receptor GPCR.

- La clozapina es un agonista inverso para el receptor H1 y un antagonista neutro para el receptor D2.
- La modificación química de cloro por yodo en la clozapina cumple el objetivo principal de este trabajo, que es reducir la afinidad por el receptor H1 y conservar en la medida de lo posible la afinidad por el receptor D2.

Literatura citada

- Alder, B. J., & Wainwright, T. E. 1957. Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of Chemical Physics*, 27(5), 1208–1209. <https://doi.org/10.1063/1.1743957>
- Axelsen, P. H., & Li, D. 1998. Improved convergence in dual-topology free energy calculations through use of harmonic restraints. *Journal of Computational Chemistry*, 19(11), 1278–1283. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199808\)19:11<1278::AID-JCC7>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199808)19:11<1278::AID-JCC7>3.0.CO;2-H)
- Bakker, R. A., Wieland, K., Timmerman, H., & Leurs, R. 2000. Constitutive activity of the histamine H1 receptor reveals inverse agonism of histamine H1 receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology*, 387(1), R5–R7. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00803-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00803-1)
- Brea, J., Rodrigo, J., Carrieri, A., Sanz, F., Cadavid, M. I., Enguix, M. J., Villazón, M., Mengod, G., Caro, Y., Masaguer, C. F., Raviña, E., Centeno, N. B., Carotti, A., & Loza, M. I. (2002). New serotonin 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, and 5-HT_{2C} receptor antagonists: Synthesis, pharmacology, 3D-QSAR, and molecular modeling of (aminoalkyl)benzo and heterocycloalkanones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(1), 54–71. <https://doi.org/10.1021/jm011014y>
- Brown, S., Kim, M., Mitchell, C., & Inskip, H. (2010). Twenty-five year mortality of a community cohort with schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*, 196(02), 116–121. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.109.067512>
- Carey, Francis, a., & Sundberg, Richard, J. (2000). *Carey Sandberg--Advanced Organic Chemistry A.pdf* (pp. 1–831).
- Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., & Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. In *Journal of Computational Chemistry* (Vol. 26, Issue 16, pp. 1668–1688). <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
- Chipot, C. (n.d.). *Free Energy Calculations in Biological Systems. How Useful Are They in Practice?* Retrieved July 29, 2018, from http://cermics.enpc.fr/~stoltz/ACI_CIRM/Chipot.pdf
- Chuhma, N., Mingote, S., Kalmbach, A., Yetnikoff, L., & Rayport, S. (2017). Heterogeneity in Dopamine Neuron Synaptic Actions Across the Striatum and Its Relevance for Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 81(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2016.07.002>
- Consumer Reports Best Buy Drugs. (2012). *Evaluating Prescription Drugs Used to Treat: Alzheimer's Disease*. 20. www.ConsumerReportsHealth.org/BestBuyDrugs.
- Crilly, J. (2007). The history of clozapine and its emergence in the US market: a review and analysis. *History of Psychiatry*, 18(1), 39–060. <https://doi.org/10.1177/0957154X07070335>
- Dundee, J. W. (1954). *Educational Supplement A REVIEW OF CHLORPROMAZINE HYDROCHLORIDE*. <https://doi.org/10.1093/bja/26.5.357>
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews*, 53(1), 1–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171937>

- Fredriksson, R. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the human genome form five main families. *Molecular Pharmacology*, 63(6), 1256–1272. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>
- Gago, F. (1994). Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 0(0). <https://doi.org/es/monoranf.v0i0.338>
- García Sainz, J. A. (2011). Revista odontológica Mexicana. In *Revista odontológica mexicana* (Vol. 15, Issue 4). Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-199X2011000400001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Gasteiger, J., & Marsili, M. (1980). Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, 36(22), 3219–3228. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(80\)80168-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(80)80168-2)
- Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(5), 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>
- Gonzalez, A., Cordoní, A., Matsoukas, M., Zachmann, J., & Pardo, L. (2014). *G Protein-Coupled Receptors - Modeling and Simulation* (M. Filizola (ed.); Vol. 796). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7423-0>
- González Morán, M. G. (2018). Comunicación celular. Transducción de señales acopladas a proteínas G heterotriméricas. *Educación Química*, 16(4e), 208. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2005.4e.66085>
- Hagler, A. T., Huler, E., & Lifson, S. (1974). Energy Functions for Peptides and Proteins. I. Derivation of a Consistent Force Field Including the Hydrogen Bond from Amide Crystals. *Journal of the American Chemical Society*, 96(17), 5319–5327. <https://doi.org/10.1021/ja00824a004>
- He, M., Deng, C., & Huang, X.-F. (2013). The Role of Hypothalamic H1 Receptor Antagonism in Antipsychotic-Induced Weight Gain. *CNS Drugs*, 27(6), 423–434. <https://doi.org/10.1007/s40263-013-0062-1>
- Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W. (2011). Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(1), 69–82. <https://doi.org/10.1021/ci100275a>
- Huang, W., & Levitt, D. G. (1977). Theoretical calculation of the dielectric constant of a bilayer membrane. *Biophysical Journal*, 17(2), 111–128. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(77\)85630-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(77)85630-0)
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). Software news and update a semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28(6), 1145–1152. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>
- Hung, W. C., Lee, M. T., Chen, F. Y., & Huang, H. W. (2007). The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 92(11), 3960–3967. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.099234>
- Jensen, F. (2007). *Introduction to Computational Chemistry* (2nd ed.). John Wiley & Sons Ltd

- Joost, P., & Methner, A. (2002). Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome Biology*, 3(11), research0063.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-11-research0063>
- Jorgensen, W. L., Baggett, A. W., Cournia, Z., Patargias, G., Glass, A. C., Liu, S.-Y., & Nolen, B. J. (2011). Efficient Drug Lead Discovery and Optimization. *WIREs Comput Mol Sci*, 1, 724–733. <https://pdfs.semanticscholar.org/b9fe/4c4f350fc059e8c2be332f3d57e2986dd3df.pdf>
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 531–556. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>
- Kesby, J. P., Eyles, D. W., McGrath, J. J., & Scott, J. G. (2018). Dopamine, psychosis and schizophrenia: The widening gap between basic and clinical neuroscience. *Translational Psychiatry*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-017-0071-9>
- Kobilka, B. K., & Deupi, X. (2007). Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(8), 397–406. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2007.06.003>
- Krishnan, A., Almén, M. S., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2012). The origin of GPCRs: identification of mammalian like Rhodopsin, Adhesion, Glutamate and Frizzled GPCRs in fungi. *PloS One*, 7(1), e29817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029817>
- Kučerka, N., Nieh, M.-P., & Katsaras, J. (2011). Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(11), 2761–2771. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.022>
- Latorraca, N. R., Venkatakrishnan, A. J., & Dror, R. O. (2017). GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chemical Reviews*, 117(1), 139–155. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00177>
- Leach, A. R. (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications* (2nd ed.). <https://www.bookdepository.com/Molecular-Modelling-Andrew-R-Leach/9780582382107>
- Leucht, S., Cipriani, A., Spineli, L., Mavridis, D., Örey, D., Richter, F., Samara, M., Barbui, C., Engel, R. R., Geddes, J. R., Kissling, W., Stapf, M. P., Lässig, B., Salanti, G., & Davis, J. M. (2013). Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *The Lancet*, 382(9896), 951–962. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60733-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60733-3)
- Liu, P., Dehez, F., Cai, W., & Chipot, C. (2012). A Toolkit for the Analysis of Free-Energy Perturbation Calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(8), 2606–2616. <https://doi.org/10.1021/ct300242f>
- Lozano Aponte, J., & Scior, T. (2014). ¿Qué sabe usted acerca de Dinámica Molecular? What do you know about ... Molecular Dynamics ? 45, 1(1), 86–88. <http://www.redalyc.org/pdf/579/57932293010.pdf>
- Martinez Tellez, A. (2009). *La Mecanica Cuantica*. <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com/2009/08/el-enlace-molecular.html>

- Mauri, M. C., Paletta, S., Maffini, M., Colasanti, A., Dragogna, F., Di Pace, C., & Altamura, A. C. (2014). Clinical pharmacology of atypical antipsychotics: An update. In *EXCLI Journal* (Vol. 13, pp. 1163–1191). Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors. <https://doi.org/10.17877/DE290R-7037>
- McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267(5612), 585–590. <https://doi.org/10.1038/267585a0>
- McGrath, J., Saha, S., Chant, D., & Welham, J. (2008). Schizophrenia: A Concise Overview of Incidence, Prevalence, and Mortality. *Epidemiologic Reviews*, 30(1), 67–76. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxn001>
- Miyata, T., Ikuta, Y., & Hirata, F. (2010). Free energy calculation using molecular dynamics simulation combined with the three dimensional reference interaction site model theory. I. Free energy perturbation and thermodynamic integration along a coupling parameter. *The Journal of Chemical Physics*, 133(4), 044114. <https://doi.org/10.1063/1.3462276>
- Montastruc, F., Palmaro, A., Bagheri, H., Schmitt, L., Montastruc, J.-L., & Lapeyre-Mestre, M. (2015). Role of serotonin 5-HT_{2C} and histamine H₁ receptors in antipsychotic-induced diabetes: A pharmacoepidemiological-pharmacodynamic study in VigiBase. *European Neuropsychopharmacology*, 25(10), 1556–1565. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26256010>
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1999). Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry*, 20(14), 1641–1662.
- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Morrisette, D. A. n., & Stahl, S. M. (2014). Modulating the serotonin system in the treatment of major depressive disorder. In *CNS spectrums* (Vol. 19, pp. 57–68). <https://doi.org/10.1017/S1092852914000613>
- Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin Receptors. *Chemical Reviews*, 108(5), 1614–1641. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>
- Nucifora, F. C., Mihaljevic, M., Lee, B. J., & Sawa, A. (2017). Clozapine as a Model for Antipsychotic Development. *Neurotherapeutics*, 14(3), 750–761. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0552-9>
- Ortega-Gutiérrez, S. (2013). Avances en el estudio de receptores acoplados a proteínas G. *Real Sociedad Española de Química*, 109(4), 276–284.
- Parsons, M. E., & Ganellin, C. R. (2006). Histamine and its receptors. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 147, Issue SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706440>
- Pluhackova, K., Kirsch, S. A., Han, J., Sun, L., Jiang, Z., Unruh, T., & Böckmann, R. A. (2016). A Critical Comparison of Biomembrane Force Fields: Structure and Dynamics of Model DMPC, POPC, and POPE Bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(16), 3888–3903. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.6b01870>

- Ricardo Bahena-Trujillo, Gonzalo Flores, J. A. A.-M. (1998). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 11, 1.
- Ring, A. M., Manglik, A., Kruse, A. C., Enos, M. D., Weis, W. I., Garcia, K. C., & Kobilka, B. K. (2013). Adrenaline-activated structure of β 2-adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody. *Nature*, 502(7472), 575–579. <https://doi.org/10.1038/nature12572>
- Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. . (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23(3), 327–341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)
- Schiff, D., & Verlet, L. (1967). Ground state of liquid helium-4 and helium-3. *Physical Review*, 160(1), 208–218. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.160.208>
- Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1–2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.12.018>
- Sebastián Yagüe, Á., Pascual-García, A., Abascal, F., Aguirre, J., Bajic, D., Baú, D., Bueren-Calabuig, J. A., Cortés Cabrera, Á., Dotu, I., Fernández, J. M., Santos, H. G. dos, García-Jiménez, B., Guantes, R., Irisarri, I., Jiménez-Lozano, N., Klett, J., Méndez, R., Morreale, A., Perona, A., ... Andrés-León, E. (2015). “Bioinformática con Ñ”: a collaborative project of young Spanish scientists to write a complete book about Bioinformatics.
- Seeman, P., & Kapur, S. (2000). Schizophrenia: more dopamine, more D2 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 7673–7675. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884398>
- Shen, W. W. (1999). A history of antipsychotic drug development. In *Comprehensive Psychiatry* (Vol. 40, Issue 6, pp. 407–414). [https://doi.org/10.1016/S0010-440X\(99\)90082-2](https://doi.org/10.1016/S0010-440X(99)90082-2)
- Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G. W., Kobayashi, T., Stevens, R. C., & Iwata, S. (2011). Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature*, 475, 65–70. <https://doi.org/10.2210/PDB3RZE/PDB>
- Smith., D. R., Nutt, J. C. (2007). Molecular dynamics simulations of proteins: can the explicit water model be varied? *J. Chem. Theory Comput.*, 3(4), 1550'1560.
- Stroup, T. S., A Lieberman, J., S Swartz, M., & McEvoy, J. P. (2000). Comparative effectiveness of antipsychotic drugs in schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2(4), 373–379. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22033808>
- Thomas, T., Fang, Y., Yuriev, E., & Chalmers, D. K. (2015). *Ligand Binding Pathways of Clozapine and Haloperidol in the Dopamine D 2 and D 3 Receptors*. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00457>
- Tikhonova, I. G., Selvam, B., Ivetac, A., Wereszczynski, J., & McCammon, J. A. (2013). Simulations of biased agonists in the β (2) adrenergic receptor with accelerated molecular dynamics. *Biochemistry*, 52(33), 5593–5603. <https://doi.org/10.1021/bi400499n>

- Tornberg, A. K. (2016). The Ewald sums for singly, doubly and triply periodic electrostatic systems. *Advances in Computational Mathematics*, 42(1), 227–248. <https://doi.org/10.1007/s10444-015-9422-3>
- Trzaskowski, B., Latek, D., Yuan, S., Ghoshdastider, U., Debinski, A., & Filipek, S. (2012). Action of Molecular Switches in GPCRs - Theoretical and Experimental Studies. *Current Medicinal Chemistry*, 19(8), 1090–1109. <https://doi.org/10.2174/092986712799320556>
- Tuckerman, M. E. (2007). *Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology Springer Series in Chemical Physics, 86 Edited by Christophe Chipot (Université Henri Poincaré Vandoeuvre-lès-Nancy, France) and Andrew Pohorille (University of California, San Francisco, USA). Springer: Berlin, Heidelberg, New York. 2007. xviii + 518 pp. \$199.00. ISBN 978-3-540-38447-2.* <https://doi.org/10.1021/JA076952N>
- Van Rossum, J. (1967). In: Neuropsychopharmacology, Proceedings Fifth Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum. In B. P. B. Brill H, Cole J, Deniker P, Hippus H (Ed.), *Amsterdam: Excerpta Medica* (Vol. 5, pp. 321–329).
- Wallace Chan, Y. Z. et. al. (2018). *GPCR-EXP: A semi-manually curated database for experimentally-solved and predicted GPCR structures*. <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/GPCR-EXP/>
- Wang, G. J., Volkow, N. D., Thanos, P. K., & Fowler, J. S. (2009). Imaging of brain dopamine pathways: Implications for understanding obesity. In *Journal of Addiction Medicine* (Vol. 3, Issue 1, pp. 8–18). <https://doi.org/10.1097/ADM.0b013e31819a86f7>
- Wang, J., Deng, Y., & Roux, B. (2006). Absolute Binding Free Energy Calculations Using Molecular Dynamics Simulations with Restraining Potentials. *Biophysical Journal*, 91(8), 2798–2814. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.106.084301>
- Wang, S., Che, T., Levit, A., Shoichet, B. K., Wacker, D., & Roth, B. L. (2018). Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone. *Nature*, 555(7695), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature25758>
- Warshel, A., & Karplus, M. (1972). Calculation of Ground and Excited State Potential Surfaces of Conjugated Molecules.1 I. Formulation and Parametrization. *Journal of the American Chemical Society*, 94(16), 5612–5625. <https://doi.org/10.1021/ja00771a014>
- Warshel, A., & Levitt, M. (1976). Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 103(2), 227–249. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90311-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90311-9)
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), 897–919. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>
- White, K. L., Eddy, M. T., Gao, Z.-G., Han, G. W., Lian, T., Deary, A., Patel, N., Jacobson, K. A., Katritch, V., & Stevens, R. C. (2018). Structural Connection between Activation Microswitch and Allosteric Sodium Site in GPCR Signaling. *Structure*, 26(2), 259–269.e5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.12.013>
- Wilcken, R., Zimmermann, M. O., Lange, A., Joerger, A. C., & Boeckler, F. M. (2012). *Principles and Applications of Halogen Bonding in Medicinal Chemistry and Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1021/jm3012068>

- Zhang, B., Albaker, A., Plouffe, B., Lefebvre, C., & Tiberi, M. (2014). Constitutive activities and inverse agonism in dopamine receptors. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 70, pp. 175–214). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417197-8.00007-9>
- Zucchi, R., Chiellini, G., Scanlan, T. S., & Grandy, D. K. (2006). Trace amine-associated receptors and their ligands. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 149, Issue 8, pp. 967–978). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706948>
- Zwanzig, R. W. (1954). High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *The Journal of Chemical Physics*, 22(8), 1420–1426. <https://doi.org/10.1063/1.1740409>

Anexo A. Minimizado en Amber

```

&cntrl
  imin=1,      ! Enciende minimización
  maxcyc=27000, ! Número máximo de ciclos de minimización
  ncyc=1500,   ! Pasos de steepest-descent

  ! Opciones del potencial de energía
  cut=12.0,    ! Cutoff de no enlace en Angstroms
  fswitch=10.0, ! Switch de fuerzas inducido

  ! Control de frecuencia de impresión de información
  ntp=100,     ! Imprime energías cada 100 pasos
  ntpr=2,      ! Escribe información en formato NetCDF

  ! Opciones de restricción
  ntr=1,       ! Restricción de posición para proteínas, carbohidratos, ligandos, y cabezas de fosfolípidos
  nmropt=1,    ! Restricción de diedros para azúcares y lípidos.

  ! Nombramiento de átomos y residuos de agua
  watnam='WAT', ! Residuos de agua se nombran WAT
  owtnm='O',   ! átomos de oxígeno en agua se nombran O
/

&ewald
  vdwmeth = 0,
/

&wt
  type='END'
/
DISANG=step6.0_minimization.rest
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT
&end
Protein posres
10.0
RES 1 416
END
Membrane posres
2.5
FIND
O3 * * CHL1
P * * POPC
P * * POPE
SEARCH
RES 1 37784
END
END

```

Anexo B. Calentamiento en Amber

! Simulación NVT

&cntrl

imin=0, ! Sin minimización
 irest=0, ! Esta simulación no es un reinicio
 ntx=1, ! El archivo .nc no contiene velocidades

! Control de temperatura

ntt=3, ! Dinámicas Langevin
 gamma_ln=1.0, ! Coeficiente de fricción (ps^{-1})
 tempi=0, ! Temperatura inicial
 temp0=53.15, ! Temperatura final

! Control de energía potencial

cut=12.0, ! Cutoff de no enlace en Armstrongs
 fswitch=10.0, ! Switch de fuerza inducido

! Ajustes de dinámica molecular

nstlim=250000, ! Numero de pasos
 dt=0.001, ! Paso de tiempo (ns)

! SHAKE

ntc=2, ! Constricción de enlaces que contienen hidrogeno
 ntf=2, ! No calcula fuerzas de enlaces que contienen hidrogeno

! Controla que tan seguido se imprime la información

ntpr=1000, ! Imprime energías cada 1000 pasos
 ntwx=1000, ! Imprime coordenadas cada 1000 pasos en la trayectoria
 ntwr=10000, ! Imprime un archivo de reinicio cada 10K pasos
 nt xo=2, ! Escribe coordenadas en formato NETCDF
 ioutfm=1, ! Escribe en formato NETCDF
 ! Envuelve coordenadas en una sola celda unidad
 iwrap=0,

! Opciones de restricción

ntr=1, ! Restricción de posición para proteínas, carbohidratos, ligandos, y cabezas de fosfolípidos
 nmropt=1, ! Restricción de diedros para azúcares y lípidos

! Nombramiento de átomos y residuos de agua

watnam='WAT', ! Residuos de agua se nombran WAT
 owtnm='O', ! átomos de oxígeno en agua se nombran O

/

&ewald

vdwmmeth = 0,

/

&wt

type='TEMPO',
 istep1=0,
 istep2=150000,
 value1=0.0,

```
value2=53.15 /  
&wt type='END'/  
/  
DISANG=step6.1_equilibration.rest  
LISTIN=POUT  
LISTOUT=POUT  
&end  
Protein posres  
10.0  
RES 1 416  
END  
Membrane posres  
2.5  
FIND  
O3 * * CHL1  
P * * POPC  
P * * POPE  
SEARCH  
RES 1 37784  
END  
END
```

Anexo C. Equilibrado en Amber

!Simulacion NPR

&cntrl

imin=0, ! Sin minimización
 irest=1, ! Esto es un reinicio de una simulación
 ntx=5, ! Por lo que el archivo .nc contiene velocidades

! Control de temperatura

ntt=3, ! Dinámica de Langevin
 gamma_ln=1.0, !Coeficiente de fricción (ps⁻¹)

tempi=303.15 ! Temperatura inicial

temp0=303.15, ! Temperatura objetivo

!Control de energía potencial

cut=12.0, ! Cutoff de energías de no enlace, en Angstroms
 fswitch=10.0, ! Switch de fuerza inducido

! MD settings

nstlim=250000, ! Numero de pasos
 dt=0.001, ! Paso de integración (ns)

! SHAKE

ntc=2, ! Constricción de enlaces que contienen hidrogeno
 ntf=2, ! No calcula fuerza de enlaces que contienen hidrogeno

! Controla la frecuencia de impresión de información

ntpr=1000, ! Imprime energías cada 1000 pasos
 ntwx=1000, ! Imprime coordenadas cada 1000 pasos en el archivo .nc
 ntwr=10000, ! Imprime archivo de reinicio cada 10K pasos
 nt xo=2, ! Escribe coordenadas en formato NetCDF
 ioutfm=1, ! Escribe en formato NetCDF

! Envuelve coordenadas en una sola celda unidad

iwrap=0,

! Opciones de restricción

ntr=1, ! Restricción de posición para proteínas, carbohidratos, ligandos, y cabezas de fosfolípidos
 nmropt=1, ! Restricción de diedros para azúcares y lípidos

! Nombramiento de átomos y residuos de agua

watnam='WAT', ! Residuos de agua se nombran WAT
 owtnm='O', ! átomos de oxígeno en agua se nombran O

!Control de presión constante

barostat=1, ! Baróstato de Berendsen


```

ntp=2,      ! Anisotrópico
pres0=1.0,  ! Objetivo de Presión externa
gamma_ten=0.0, ! Tensión superficial (dyne/cm).
ninterface=2, ! Numero de interfaces, 2 para bicapas.
!Opciones de restriccion
ntr=1,      ! Restricción de posición para proteínas, carbohidratos, ligandos, y cabezas de fosfolípidos
nmropt=1,   ! Restricción de diedros para azúcares y lípidos

! Nombramiento de átomos y residuos de agua
watnam='WAT', ! Residuos de agua se nombran WAT
owtnm='O',   ! átomos de oxígeno en agua se nombran O
/

&ewald
  vdwmeth = 0,
/

&wt
  type='END'
/
DISANG=step6.5_equilibration.rest
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT
&end
Protein posres
3.0
RES 1 416
END
Membrane posres
1.0
FIND
O3 * * CHL1
P * * POPC
P * * POPE
SEARCH
RES 1 37784
END
END

```

Anexo D. Producción en Amber

&cntrl

```

imin=0,      ! Sin minimización
irest=1,      ! Esto es un reinicio de una simulación
ntx=5,        ! Por lo que el archivo .nc contiene velocidades
              ! Control de temperatura
ntt=3,        ! Dinámica de Langevin
gamma_ln=1.0, ! Coeficiente de fricción (ps^-1)
tempi=303.15 ! temperatura inicial
temp0=303.15, ! Temperatura objetivo

! Control de energía potencial
cut=12.0,     ! Cutoff de energías no enlazantes en Armstrongs
fswitch=10.0, ! Switch de energía forzado
! Ajustes de dinámica molecular
nstlim=5000000, ! Numero de pasos
dt=0.002,     ! Paso de tiempo (ns)

! SHAKE
ntc=2,        ! Constricción en los enlaces que contienen hidrogeno
ntf=2,        ! Sin calculo de fuerzas de enlace que contienen hidrogeno

! Control de la frecuencia con el que las energías son impresas
ntpr=5000,    ! Imprime energías cada 5000 pasos
ntwx=5000,    ! Imprime coordenadas cada 5000 pasos al archivo .nc
ntwr=200000,  ! Imprime un archivo de reinicio cada 200K pasos
ntxo=2,       ! formato NetCDF para coordenadas
ioutfm=1,     ! Escribe formato NetCDF
              ! Envuelve las coordenadas en la misma celda unidad
iwrap=1,
              ! Control de la presión
barostat=1,   ! Baróstato de Berendsen
ntp=2,        ! 1 Anisotrópico
pres0=1.0,    ! Presión objetivo externa, en Bars
              ! Presión de superficie constante
gamma_ten=0.0, ! Tensión de superficie (dyne/cm).
ninterface=2, ! Numero de interfaces, 2 para una bicapa
! Establece los nombres de los átomos del agua
watnam='WAT', ! Los residuos de agua se nombran WAT
owntnm='O',   ! Los átomos de oxígeno del agua se nombran O

```

/

&ewald

```

vdwmeth = 0,

```

Anexo E. Análisis de las dinámicas en CPPTRAJ

Script para el sistema D2R

```

1  ../step5_charmm2amber.parm7
2  trajin ../step7.6_production.nc
3  trajin ../step7.7_production.nc
4  trajin ../step7.8_production.nc
5  rms 1 :5-413@CA out rmsd_prot_CA.dat
6  run
7  rms 2 :394-398 out rmsd_npxxy.dat
8  run
9  rms 3 :5-194,336-413@CA out rmsd_helix_CA.dat
10 run
11 atomicfluct out rmsf_H1_A_Ca.dat :1-415@CA byres
12 atomicfluct out rmsf_H1_A_Cb.dat :1-415@CB byres
13 distance a :104@CZ :340@CD out 104_340.dat
14 distance b :398@CB :394@CB out 398_394.dat
15 pairwise c :104@HH12 :340@OE1 out ionico_H12_OE1.dat
16 pairwise d :104@HH11 :340@OE1 out ionico_H11_OE1.dat
17 pairwise e :104@HH21 :340@OE1 out ionico_H21_OE1.dat
18 pairwise f :104@HH22 :340@OE1 out ionico_H22_OE1.dat
19 pairwise g :104@NH1 :340@OE1 out ionico_N1_OE1.dat
20 pairwise h :104@NH2 :340@OE1 out ionico_N2_OE1.dat
21 pairwise i :104@HH12 :340@OE2 out ionico_H12_OE2.dat
22 pairwise j :104@HH11 :340@OE2 out ionico_H11_OE2.dat
23 pairwise k :104@HH21 :340@OE2 out ionico_H21_OE2.dat
24 pairwise l :104@HH22 :340@OE2 out ionico_H22_OE2.dat
25 pairwise m :104@NH1 :340@OE2 out ionico_N1_OE2.dat
26 pairwise n :104@NH2 :340@OE2 out ionico_N2_OE2.dat
27 pairwise o :398@HB1 :394@OH out energia_398HB1_394OH.dat
28 pairwise o :398@OD1 :394@HN out energia398OD1_394HN.dat
29 Nativecontacts :233-380 distance 3.5 out CN_D2_intra.dat

```

Scripts para el Sistema D2R-E

```

1  ../step5_charmm2amber.parm7
2  trajin ../step7.6_production.nc
3  trajin ../step7.7_production.nc
4  trajin ../step7.8_production.nc
5  rms 1 :5-413@CA out rmsd_prot_CA.dat
6  run
7  rms 2 :394-398 out rmsd_npxxy.dat
8  run
9  rms 3 :5-194,336-413@CA out rmsd_helix_CA.dat
10 run
11 atomicfluct out rmsf_H1_A_Ca.dat :1-415@CA byres
12 atomicfluct out rmsf_H1_A_Cb.dat :1-415@CB byres
13 distance a :104@CZ :340@CD out 104_340.dat
14 distance b :398@CB :394@CB out 398_394.dat
15 pairwise c :104@HH12 :340@OE1 out ionico_H12_OE1.dat
16 pairwise d :104@HH11 :340@OE1 out ionico_H11_OE1.dat

```

```

17 pairwise e :104@HH21 :340@OE1 out ionico_H21_OE1.dat
18 pairwise f :104@HH22 :340@OE1 out ionico_H22_OE1.dat
19 pairwise g :104@NH1 :340@OE1 out ionico_N1_OE1.dat
20 pairwise h :104@NH2 :340@OE1 out ionico_N2_OE1.dat
21 pairwise i :104@HH12 :340@OE2 out ionico_H12_OE2.dat
22 pairwise j :104@HH11 :340@OE2 out ionico_H11_OE2.dat
23 pairwise k :104@HH21 :340@OE2 out ionico_H21_OE2.dat
24 pairwise l :104@HH22 :340@OE2 out ionico_H22_OE2.dat
25 pairwise m :104@NH1 :340@OE2 out ionico_N1_OE2.dat
26 pairwise n :104@NH2 :340@OE2 out ionico_N2_OE2.dat
27 pairwise o :52@OD2 :398@HH out energia398OD1_51OD2.dat

```

Script para el Sistema D2R-A

```

1 ../step5_charmm2amber.parm7
2 trajin ../step7.6_production.nc
3 trajin ../step7.7_production.nc
4 trajin ../step7.8_production.nc
5 rms 1 :5-413@CA out rmsd_prot_CA.dat
6 run
7 rms 2 :394-398 out rmsd_npxxy.dat
8 run
9 rms 3 :5-194,336-413@CA out rmsd_helix_CA.dat
10 run
11 atomicfluct out rmsf_H1_A_Ca.dat :1-415@CA byres
12 atomicfluct out rmsf_H1_A_Cb.dat :1-415@CB byres
13 distance a :104@CZ :340@CD out 104_340.dat
14 distance b :398@CB :394@CB out 398_394.dat
15 pairwise c :104@HH12 :340@OE1 out ionico_H12_OE1.dat
16 pairwise d :104@HH11 :340@OE1 out ionico_H11_OE1.dat
17 pairwise e :104@HH21 :340@OE1 out ionico_H21_OE1.dat
18 pairwise f :104@HH22 :340@OE1 out ionico_H22_OE1.dat
19 pairwise g :104@NH1 :340@OE1 out ionico_N1_OE1.dat
20 pairwise h :104@NH2 :340@OE1 out ionico_N2_OE1.dat
21 pairwise i :104@HH12 :340@OE2 out ionico_H12_OE2.dat
22 pairwise j :104@HH11 :340@OE2 out ionico_H11_OE2.dat
23 pairwise k :104@HH21 :340@OE2 out ionico_H21_OE2.dat
24 pairwise l :104@HH22 :340@OE2 out ionico_H22_OE2.dat
25 pairwise m :104@NH1 :340@OE2 out ionico_N1_OE2.dat
26 pairwise n :104@NH2 :340@OE2 out ionico_N2_OE2.dat

```

Script para el sistema H1-CLO

```

1 parm ../step5_charmm2amber.parm7
2 trajin ../step7.6_production.nc
3 trajin ../step7.7_production.nc
4 trajin ../step7.8_production.nc
5 rms 1 :5-483@CA out rmsd_prot_CA.dat
6 run
7 rms 2 :464-468 out rmsd_npxxy.dat
8 run
9 rms 3 :29-216,410-483@CA out rmsd_helix_CA.dat
10 run

```

```

11 atomicfluct out rmsf_H1_A_Ca.dat :1-487@CA byres
12 atomicfluct out rmsf_H1_A_Cb.dat :1-487@CB byres
13 distance a :125@CZ :410@CD out 125_410.dat
14 distance b :468@HH :73@OD2 out 468_73.dat
15 pairwise c :125@HH12 :410@OE1 out ionico_H12_OE1.dat
16 pairwise d :125@HH11 :410@OE1 out ionico_H11_OE1.dat
17 pairwise e :125@HH21 :410@OE1 out ionico_H21_OE1.dat
18 pairwise f :125@HH22 :410@OE1 out ionico_H22_OE1.dat
19 pairwise g :125@NH1 :410@OE1 out ionico_N1_OE1.dat
20 pairwise h :125@NH2 :410@OE1 out ionico_N2_OE1.dat
21 pairwise i :125@HH12 :410@OE2 out ionico_H12_OE2.dat
22 pairwise j :125@HH11 :410@OE2 out ionico_H11_OE2.dat
23 pairwise k :125@HH21 :410@OE2 out ionico_H21_OE2.dat
24 pairwise l :125@HH22 :410@OE2 out ionico_H22_OE2.dat
25 pairwise m :125@NH1 :410@OE2 out ionico_N1_OE2.dat
26 pairwise n :125@NH2 :410@OE2 out ionico_N2_OE2.dat
27 pairwise o :468@HH :73@OD2 out energia_468_73.dat

```

Script para el Sistema H1R

```

1 ../step5_charmm2amber.parm7
2 trajin ../step7.6_production.nc
3 trajin ../step7.7_production.nc
4 trajin ../step7.8_production.nc
5 rms 1 :29-483@CA out rmsd_prot_CA.dat
6 run
7 rms 2 :464-468 out rmsd_npxxy.dat
8 run
9 rms 3 :29-216,410-483@CA out rmsd_helix_CA.dat
10 run
11 atomicfluct out rmsf_H1_A_Ca.dat :1-487@CA byres
12 atomicfluct out rmsf_H1_A_Cb.dat :1-487@CB byres
13 distance a :125@CZ :410@CD out 125_410.dat
14 distance b :468@HH :125@NH1 out 468_125.dat
15 pairwise c :125@HH12 :410@OE1 out ionico_H12_OE1.dat
16 pairwise d :125@HH11 :410@OE1 out ionico_H11_OE1.dat
17 pairwise e :125@HH21 :410@OE1 out ionico_H21_OE1.dat
18 pairwise f :125@HH22 :410@OE1 out ionico_H22_OE1.dat
19 pairwise g :125@NH1 :410@OE1 out ionico_N1_OE1.dat
20 pairwise h :125@NH2 :410@OE1 out ionico_N2_OE1.dat
21 pairwise i :125@HH12 :410@OE2 out ionico_H12_OE2.dat
22 pairwise j :125@HH11 :410@OE2 out ionico_H11_OE2.dat
23 pairwise k :125@HH21 :410@OE2 out ionico_H21_OE2.dat
24 pairwise l :125@HH22 :410@OE2 out ionico_H22_OE2.dat
25 pairwise m :125@NH1 :410@OE2 out ionico_N1_OE2.dat
26 pairwise n :125@NH2 :410@OE2 out ionico_N2_OE2.dat
27 pairwise o :468@HH :125@NH1 out energia_468_125.dat

```

Anexo F. Protocolo para MM/PBSA y MM/GBSA en Amber

Script para el sistema D2R-E y D2R-A

```

1  &general
2  use_sander=1,
3  startframe=0,
4  endframe=3800,
5  interval=50,
6  keep_files=1,
7  debug_printlevel=2,
8  strip_mask=":SOD,WAT,CLA,POPC,POPE,CHL1,BGLC",
9  receptor_mask=":1-415",
10 /
11 &gb
12 igb=5,
13 saltcon=0.15,
14 probe=0.6,
15 /
16 &pb
17 inp=1,
18 radiopt=0,
19 indi=2,
20 istrng=0.150,
21 bcopt=10,
22 prbrad= 1.4,
23 cutnb=0,
24 memopt=1,
25 emem=2.2,
26 mthick=38.0,
27 poretype=1,
28 /
29 &decomp
30 idecomp=2,
31 print_res="86,358,90,166,169,362,165,170,87,361,161,388,354,365,83,366,416"
32 dec_verbose=1,
33 /

```

Script para el sistema H1-CLO

```

1  &general
2  use_sander=1,
3  startframe=0,
4  endframe=3000,
5  interval=50,
6  keep_files=1,
7  debug_printlevel=2,
8  strip_mask=":SOD,WAT,CLA,POPC,POPE,CHL1,BGLC",
9  receptor_mask=":1-487",
10 /

```

```
11 &gb
12 igb=5,
13 saltcon=0.15,
14 probe=0.6,
15 /
16 &pb
17 inp=1,
18 radiopt=0,
19 indi=2,
20 istrng=0.150,
21 bcopt=10,
22 prbrad= 1.4,
23 cutnb=0,
24 memopt=1,
25 emem=2.2,
26 mthick=38.0,
27 poretype=1,
28 /&decomp
29 idecomp=2,
30 print_res="107,108,191,104,190,185,187,162,194,431,184,199,179,111,435,195,488"
31 dec_verbose=1,
32 /
```

Anexo G. Protocolo para FEP en NAMD

```

timestep          2.0
numsteps          1
# CELDA FLEXIBLE
useflexiblecell   no
# ENTRADA
structure         ./prueba_lig.psf
parameters        ../clz.prm
parameters        ../lig_F_Cl.prm
parameters        ../par_all36m_prot.prm
parameters        ../par_all36_na.prm
parameters        ../par_interface.prm
parameters        ../par_all36_cgenff.prm
parameters        ../par_all36_carb.prm
parameters        ../par_all36_lipid.prm
parameters        ../toppar_water_ions.str
parameters        ../toppar_all36_carb_glycopeptide.str
parameters        ../toppar_all36_carb_glycolipid.str
parameters        ../toppar_all36_carb_imlab.str
parameters        ../toppar_all36_label_fluorophore.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_cholesterol.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_miscellaneous.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_hmmm.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_lps.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_ether.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_prot.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_model.str
parameters        ../toppar_all36_prot_na_combined.str
parameters        ../toppar_all36_prot_d_aminoacids.str
parameters        ../toppar_all36_label_spin.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_detergent.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_bacterial.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_cardiolipin.str
parameters        ../toppar_all36_label_spin.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_inositol.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_pyrophosphate.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_sphingo.str
parameters        ../toppar_all36_lipid_yeast.str
parameters        ../toppar_all36_na_nad_ppi.str
parameters        ../toppar_all36_na_rna_modified.str
parameters        ../toppar_all36_prot_fluoro_alkanes.str
parameters        ../toppar_all36_prot_heme.str
parameters        ../toppar_all36_prot_retinol.str
parameters        ../toppar_dum_noble_gases.str
paraTypeCharmm    on
coordinates        min.coor
temperature        303.15
extendedSystem     min.xsc

```


SALIDA

```

outputenergies      100
outputtiming         100
outputpressure      100
binaryoutput        yes
dcdfreq             100
outputname          forward-noshift
restartname          forward-noshift
restartfreq         100
binaryrestart        yes
XSTFreq             100

```

PME

```

PME                 yes
PMETolerance        10e-6
PMEInterpOrder      4
PMEGridSpacing      1.0

```

ENVUELVE TODO EN UNA CELDA UNIDAD

```

wrapAll             on

```

TEMPERATURA CONSTANTE

```

langevin            on
langevinTemp        303.15
langevinDamping     1.0

```

PRESION CONSTANTE

```

LangevinPiston      on
LangevinPistonTarget 1
LangevinPistonPeriod 75
LangevinPistonDecay  25
LangevinPistonTemp   303.15
StrainRate           0.0 0.0 0.0
useGroupPressure     yes

```

#PARTICIONADO DE ESPACIO

```

splitpatch          hydrogen
hgroupcutoff         2.8
stepspercycle        20
margin               1.0

```

CUT-OFFS

```

switching           on
switchdist          10.0
cutoff              12.0
pairlistdist        14.0

```

RESPA

```

fullElectFrequency   2

```

```
nonbondedFreq      1
# 1-4 NO-ENLAZANTE
exclude             scaled1-4
1-4scaling          1.0
# COM
commotion           no
# SHAKE
rigidbonds          all
rigidtolerance      0.000001
rigiditerations     400
# PARAMETROS DE FEP
source              ../fep.tcl
alch                on
alchType            FEP
alchFile            min.fep
alchCol             B
alchOutFile         forward-noshift.fepout
alchOutFreq         10
alchVdwLambdaEnd    1.0
alchElecLambdaStart 0.5
alchVdWShiftCoeff   0.6
alchDecouple        yes
alchEquilSteps      200
set numSteps        400
runFEP 0.0 1.0 0.03125 $numSteps
```

Anexo H. Mapas de superficie del grosor de membrana y posición de moléculas de colesterol

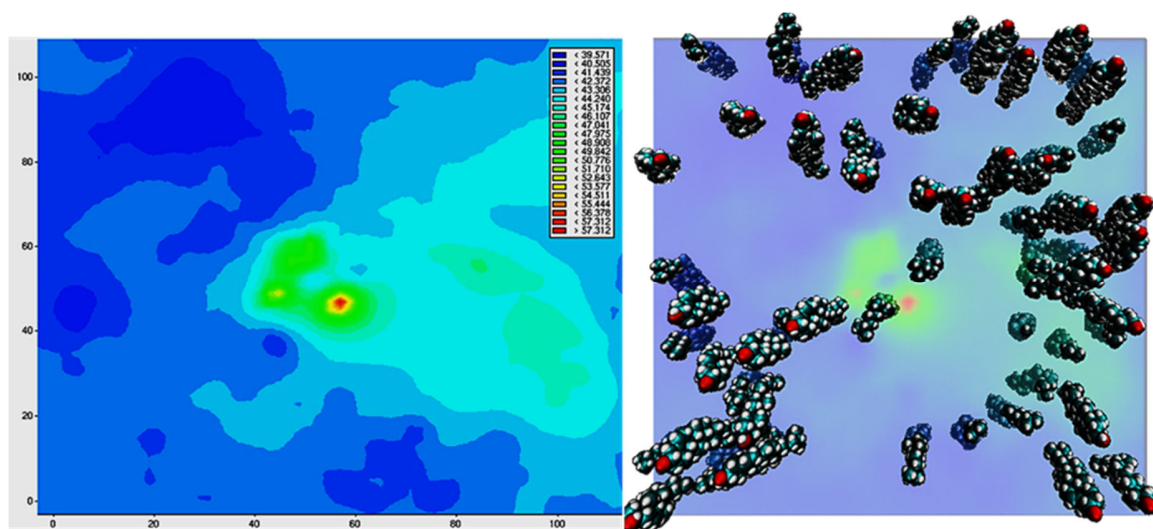


Figura 81. Mapas de superficie del grosor membranal y la posición de los colesteroles en el sistema D2R.A. A la izquierda, mapa de superficie del grosor de la membrana promedio a lo largo de la simulación del receptor D2R, los valores azules indican valores de grosor menores, mientras que los rojos valores mayores. La imagen de la derecha, por su parte indica las posiciones de las moléculas de colesterol en la estructura más representativa durante la fase de producción.

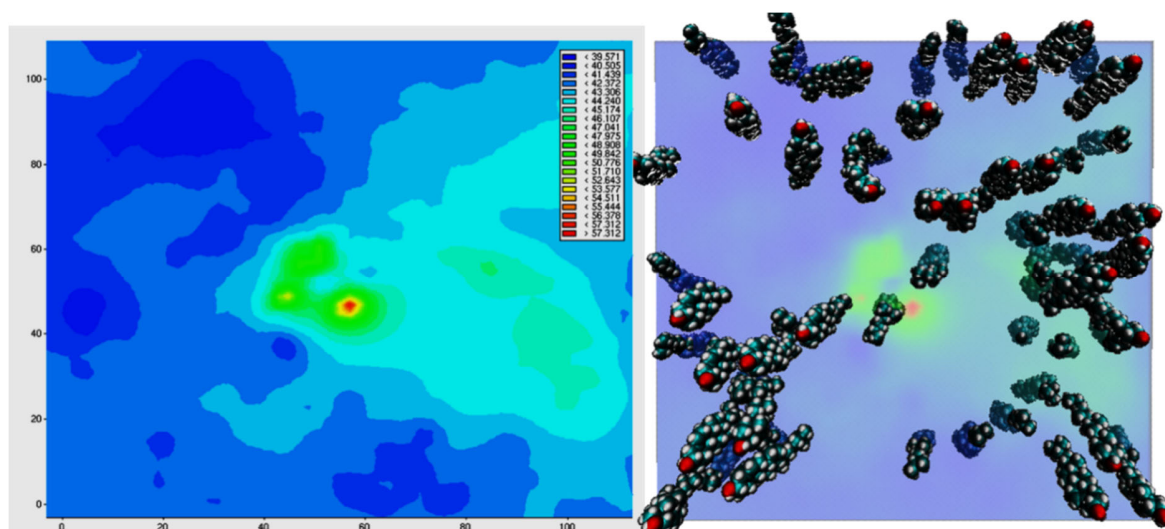


Figura 82. Mapas de superficie del grosor membranal y la posición de los colesteroles en el sistema D2R-E. A la izquierda, mapa de superficie del grosor de la membrana promedio a lo largo de la simulación del complejo D2R-E, los valores azules indican valores de grosor menores, mientras que los rojos valores mayores. La imagen de la derecha, por su parte indica las posiciones de las moléculas de colesterol en la estructura más representativa durante la fase de producción.

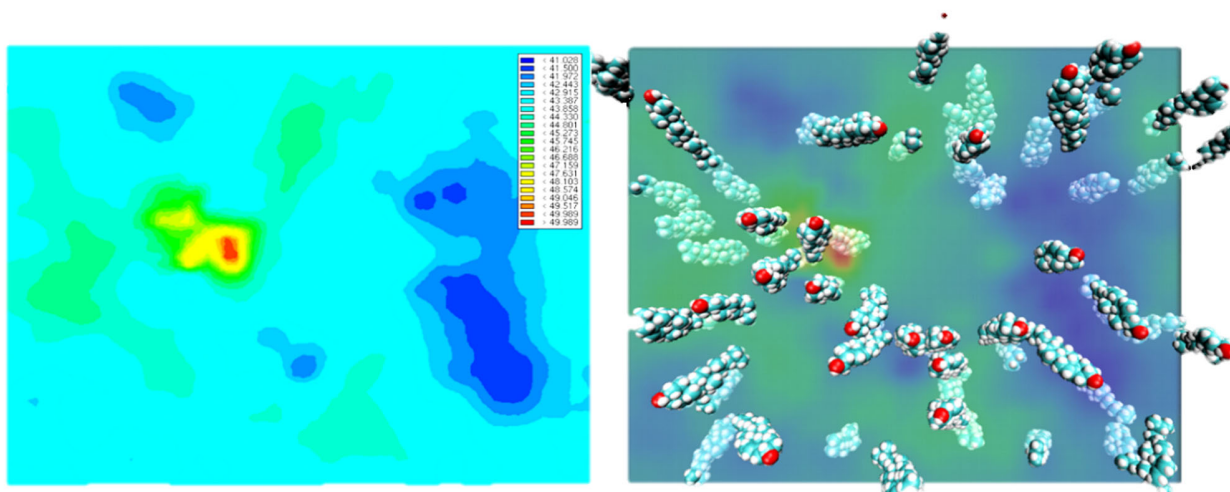


Figura 83. Mapas de superficie del grosor membranal y la posición de los colesteroles en el sistema D2R-A. A la izquierda, mapa de superficie del grosor de la membrana promedio a lo largo de la simulación del complejo D2R-A, los valores azules indican valores de grosor menores, mientras que los rojos valores mayores. La imagen de la derecha, por su parte indica las posiciones de las moléculas de colesterol en la estructura más representativa durante la fase de producción.

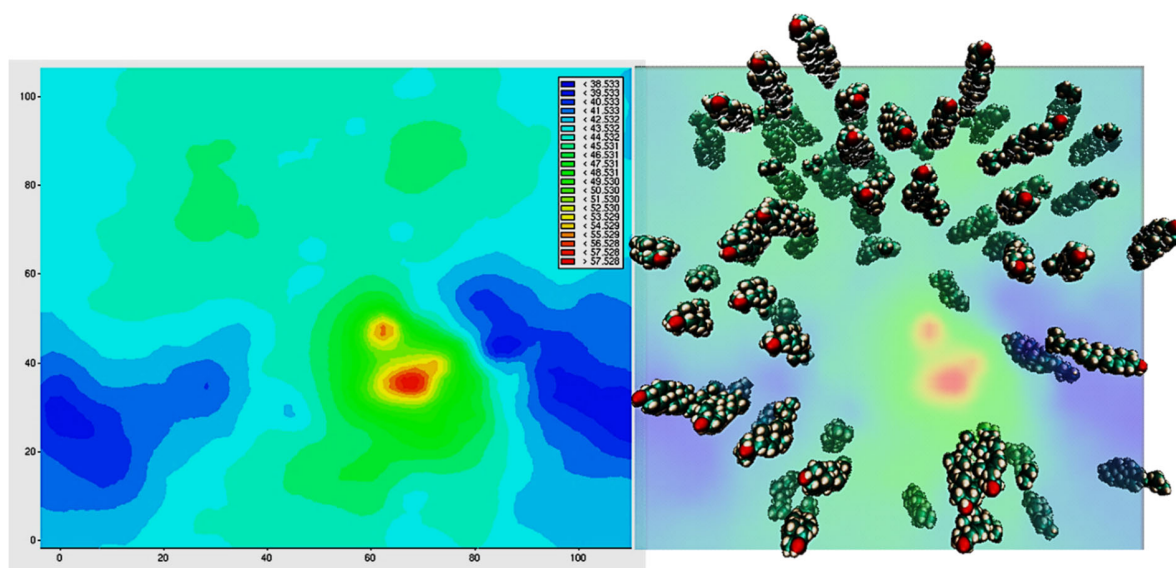


Figura 84. Mapas de superficie del grosor membranal y la posición de los colesteroles en el sistema H1R. A la izquierda, mapa de superficie del grosor de la membrana promedio a lo largo de la simulación del sistema H1R, los valores azules indican valores de grosor menores, mientras que los rojos valores mayores. La imagen de la derecha, por su parte indica las posiciones de las moléculas de colesterol en la estructura más representativa durante la fase de producción.

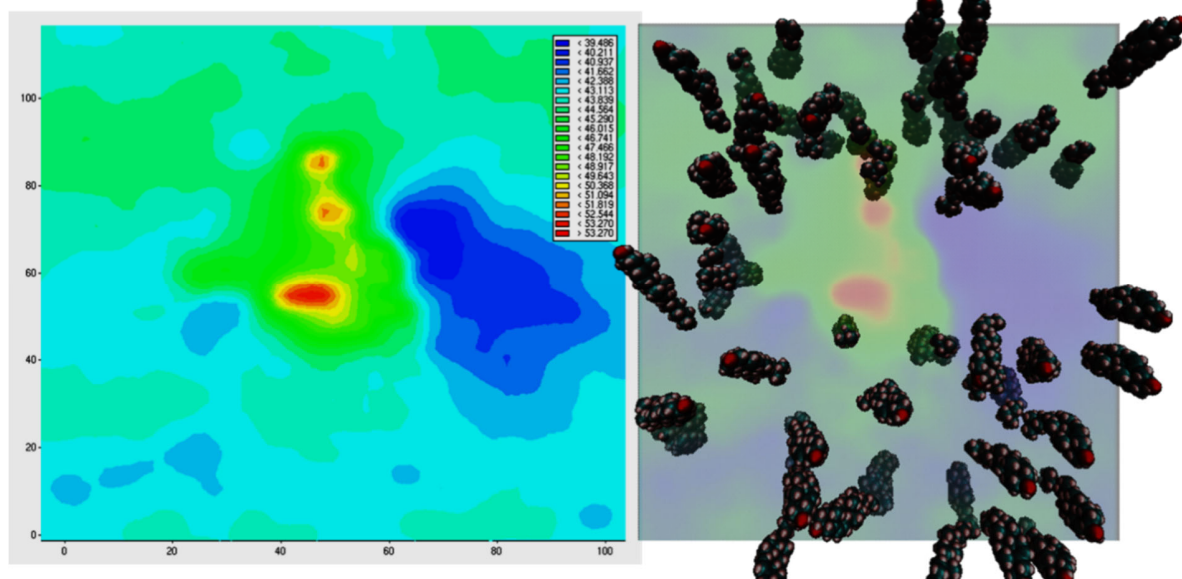


Figura 85. Mapas de superficie del grosor membranal y la posición de los colesteroles en el sistema H1R-CLO. A la izquierda, mapa de superficie del grosor de la membrana promedio a lo largo de la simulación del complejo H1R-CLO, los valores azules indican valores de grosor menores, mientras que los rojos valores mayores. La imagen de la derecha, por su parte indica las posiciones de las moléculas de colesterol en la estructura más representativa durante la fase de producción.